

Université Louis Pasteur de Strasbourg I

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse présentée par :

Stella SUZANNE

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 facteur clé dans l'établissement de la latence transcriptionnelle post-intégrative du VIH-1.

Soutenue le 27 Mars 2008 devant la commission d'examen :

Dr Dominique AUNIS

Président du jury et examinateur

Pr Olivier ROHR

Directeur de Thèse

Dr Jean-christophe PAILLART

Rapporteur Interne

Dr Gianfranco PANCINO

Rapporteur externe

Dr Yves COLLETTE

Rapporteur externe

A mes Parents...

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres de mon jury qui ont accepté d'évaluer mon travail et dont j'ai apprécié l'esprit critique lors de nos discussions le jour de la soutenance ; et merci au Dr Aunis et au Pr. Rohr pour m'avoir accueilli dans l'U575 pendant ces 4 ans et demi.

Je remercie le personnel et les étudiants du Centre de Neurochimie avec qui j'ai passé d'agréables moments tout au long de ma thèse, et plus particulièrement mes comparses des sorties Rollers (Patrice, Delphine et Elise) avec qui j'ai passé des pauses de midi sportives mais sympathiques. Je tiens, de même, à remercier l'ensemble du personnel de l'Institut de Virologie (personnel statutaire et étudiants) qui nous a accueilli avec tant de gentillesse lors du déménagement de l'équipe il y a quelques mois, ainsi que pour leur soutien dans les derniers temps difficiles avant la soutenance.

Ma thèse aurait été beaucoup plus compliquée sans les qualités hors pairs de négociations de Dominique, son écoute et ses conseils tout au long de ses années ; et je le félicite tout particulièrement pour avoir su négocier des supers chocolats tous les ans auprès de ces pauvres commerciaux qui ont bien du courage pour venir l'affronter avec leurs catalogues et leurs réductions.

Un grand merci à Thomas, mon spécialiste FACS (cytométrie en flux pour les incultes) qui a permis de mettre quelques figures sympas dans mon dernier article....Bonne chance pour la fin de ta thèse et la suite...et, attention aux « Gastro »!!

Laetitia... depuis le début nous nous sommes toujours épaulées et soutenues pour faire en sorte que l'on tienne jusqu'au bout quoi qu'il arrive, nous avons su profiter de nos temps libres pour avoir des discussions de filles et de franches rigolades dans le labo....tiens bon !! ...et merci pour ton bouquin il est vraiment génial ;-)

Un merci particulier à Christian Schwartz et Gérard Cremel pour avoir relu mon manuscrit lors de leur temps libre et pour leurs précieux conseils qui m'ont permis de l'améliorer et de préparer ma soutenance.

Et enfin ... mes remerciements très personnels....

Tout d'abord à Hassan, qui même s'il ne participe plus à mon quotidien, a partagé bon nombre de mes années et a contribué à ce que j'en arrive à devenir Docteur...je

remercie également ses parents, Fatmé et Samir, qui m'ont toujours soutenue et encouragée et qui j'espère ne douteront jamais de mon affection pour eux.

Je suis, par ailleurs, à tout jamais redevable à Yves et Magali pour leur soutien, leur aide, leurs invitations à dîner ou à sortir dans les moments difficiles ...je reviens quand vous voulez pour les lasagnes !...C'est dans ces moments là que l'on reconnaît ses vrais amis et je pense pouvoir dire aujourd'hui qu'ils sont les meilleurs que j'ai jamais eu !!

Je remercie le grand Jacques Brel pour sa chanson "La Quête" qui m'a donné du courage tout au long des derniers mois et qui a bercé quelques unes de mes nuits.....

J'offre ensuite une petite caresse de remerciement à ma bête à poils qui m'a prouvé que la ronron-thérapie a vraiment des vertus apaisantes et qui a su me distraire de ma rédaction quand il le fallait en squattant mon clavier.

Et pour finir, le plus important à mes yeux, mes parents qui m'ont toujours guidés dans la bonne direction, pour réussir et faire les choix les plus judicieux, sans eux je ne serais pas ce que je suis aujourd'hui et j'espère qu'ils seront toujours fiers de moi.

Sommaire

TABLE DES FIGURES	6
LISTE DES ABREVIATIONS.....	8

INTRODUCTION	12
---------------------------	-----------

I - LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE	13
--	-----------

1- L'HISTOIRE DU VIH : DE SES ORIGINES A NOS JOURS.	14
2- LE VIH AUJOURD'HUI DANS LE MONDE.	15
3- LES ORIGINES DU VIRUS ET SON EVOLUTION	16
4- DESCRIPTION GENERALE DU VIH.....	18
4.1- L'enveloppe.....	18
4.2- La matrice.....	19
4.3- La capsid.....	19
4.4- La nucléocapsid.....	19
4.5- Les protéines encapsidées.....	19
4.6- Le génome viral.....	20
4.6.1- Les régions non codantes du génome ARN.....	20
4.6.1.1- La région non codante en 5'.....	20
4.6.1.2- La région non codante en 3'.....	21
4.6.2- Les régions codantes.....	21
5- LE CYCLE REPLICATIF DU VIH-1.....	24
5.1- La phase pré-intégrative.....	24
5.1.1- L'attachement et l'entrée du virus.....	25
5.1.1.1- Récepteurs et co récepteurs mis en jeu.....	25
5.1.1.2- Les récepteurs alternatifs d'attachement.....	25
5.1.1.3- Le mécanisme de fusion des membranes.....	26
5.1.1.4 - L'entrée par endocytose.....	27
5.1.2- La transcription inverse et la décapsidation.....	27
5.1.2.1- La transcription inverse.....	28
5.1.2.2- La décapsidation.....	30
5.1.3- Le transport nucléaire.....	30
5.1.4- L'intégration au génome de la cellule hôte.....	31
5.2- La phase post-intégrative.....	33
5.2.1- La transcription des gènes viraux.....	34
5.2.2- La production des nouveaux virions.....	34
5.2.2.1- L'assemblage et le bourgeonnement.....	34
5.2.2.2- La maturation des virions.....	35

II - LA PATHOGENESE VIRALE	37
---	-----------

1- LES DIFFERENTES VOIES D'ENTREE DU VIRUS DANS L'ORGANISME.....	38
1.1- La transmission par voie sexuelle.....	38
1.2- La transmission par le sang.....	38
1.3- La transmission materno-foetale.....	38
2- LES CIBLES CELLULAIRES.....	40
2.1- Le système immunitaire.....	40
2.1.1- Les cellules dendritiques.....	41
2.1.2- Les lymphocytes.....	42
2.1.2.1- Les lymphocytes T CD4 ⁺	42
2.1.2.2- Les lymphocytes T CD8 ⁺	43
2.1.2.3- Les lymphocytes B.....	43

2.1.3- Les monocytes/macrophages	44
2.2- <i>Le système nerveux central</i>	45
2.2.1- L'entrée du VIH-1 dans le SNC	46
2.2.2- Les cibles cellulaires.....	47
2.2.2.1- Les cellules microgliales	47
2.2.2.2- Les astrocytes.....	49
2.2.2.3- Les oligodendrocytes.....	50
2.2.2.4- Les neurones.....	50
3- L'HISTOIRE DE LA MALADIE.....	52
3.1- <i>La phase d'invasion virale ou primo-infection</i>	52
3.2- <i>La phase de latence ou asymptomatique</i>	53
3.3- <i>Le stade SIDA</i>	54
4- LES THERAPIES.....	54
4.1- <i>Les inhibiteurs de la transcriptase inverse</i>	55
4.1.1- Les Inhibiteurs Nucléosidiques (INTI).....	55
4.1.2- Les Inhibiteurs Non Nucléosidiques (INNTI)	56
4.2- <i>Les inhibiteurs de la protéase</i>	57
4.3- <i>Les inhibiteurs de fusion</i>	57
4.4- <i>Les traitements du futur</i>	58
4.5- <i>Les limites des traitements</i>	58

III - LA TRANSCRIPTION VIRALE..... 60

1- PRESENTATION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION IMPLIQUES DANS LA MODULATION DE LA TRANSCRIPTION VIRALE.....	61
1.1- <i>Les facteurs de transcription cellulaire</i>	61
1.1.1- La structure des facteurs de transcription.....	61
1.1.2- Description des facteurs de transcription cellulaires impliqués.....	62
1.1.2.1- La famille des facteurs à motif crémaillère à leucine.....	62
1.1.2.2- La famille des facteurs à motif Hélice-Boucle-Hélice.....	63
1.1.2.3- La famille des facteurs à motif Hélice-Tour-Hélice.....	64
1.1.2.4- La famille des facteurs à motif doigt de zinc.....	64
1.1.2.5- La famille des facteurs à motif NF-κB.....	66
1.1.2.6- La famille des facteurs à HMG Box.....	67
1.1.2.7- Famille des facteurs LSF (Late simian virus 40 Factor).....	67
1.1.2.8- La famille des facteurs CSL (CBF-1, Su(H) and Lag-1).....	68
1.2- <i>Le facteur de transcription viral : Tat</i>	68
1.3- <i>Les protéines virales impliquées dans la régulation de la transcription</i>	70
1.3.1- Vpr (Viral protein r).....	70
1.3.2- Nef.....	70
2- LES MODIFICATIONS DE LA CHROMATINE INFLUENÇANT LA TRANSCRIPTION CELLULAIRE.....	70
2-1- <i>Structure de la chromatine</i>	70
2.1.1- Les différents niveaux de compaction de l'ADN.....	70
2.1.1- Les variants d'histones.....	71
2-2- <i>Les mécanismes de remodelage de la chromatine</i>	72
2-2-1- Les modifications post-traductionnelles des histones : le code histone.....	73
3-2-1-1- L'acétylation des histones.....	73
2-2-1-2- La méthylation des histones.....	76
2-2-1-3- La phosphorylation des histones.....	79
2-2-1-4- Les autres modifications des histones.....	80
2.2.2- Les facteurs de remodelage de la chromatine ATP dépendants.....	82
2.2.2.2- La famille ISWI (Imitation of switch1).....	84
2.2.2.3- La famille MI2/NuRD.....	84
2.2.2.4- La famille Ino (Inositol).....	85
2.2.3- Les méthylations de l'ADN.....	85
2.2.3.1- Généralités.....	85
2.2.3.2- Les ADN méthyltransférases.....	86
2.2.3.3- La déméthylation.....	87
3- LES MECANISMES DE MODULATION DE L'EXPRESSION DU VIH-1.....	88
3.1- <i>Les mécanismes de régulation de la phase initiale (ou phase précoce)</i>	89
3.2- <i>Les mécanismes de régulation de la phase tardive</i>	90
3.2.1- Initiation de la transcription.....	90
3.2.2- Elongation.....	91

3.3- <i>L'impact des modifications de la chromatine au cours de la transcription virale</i>	92
3.3.1- Les modifications des histones influençant la transcription virale.....	92
3.3.2- Les facteurs de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP.....	92
3.3.3- Les méthylations de l'ADN.....	93
3.4- <i>Le mécanisme d'action des ARNs interférents : des régulateurs post-transcriptionnelle inducteurs de latence</i>	93
3.4.1- L'origine des ARN interférents.....	93
3.4.2- ARN interférents et VIH-1.....	95

IV - LA PROTEINE VPR : UNE PROTEINE VIRALE PARTICULIERE AUX ACTIVITES MULTIPLES..... 97

1- GENERALITES.....	98
2- STRUCTURE.....	98
3- LES DIFFERENTS EFFETS DE VPR AU COURS DU CYCLE VIRAL.....	99
3.1- <i>Les effets au cours de la transcription inverse</i>	99
3.2- <i>Les effets sur l'entrée nucléaire du virus</i>	100
3.2.1- L'entrée par les pores nucléaires.....	101
3.2.2- Autre mécanisme d'entrée dans les cellules quiescentes ou différenciées.....	103
3.3- <i>Les effets sur le cycle cellulaire et l'apoptose</i>	103
3.3.1- Généralités sur le cycle cellulaire.....	104
3.3.2- Vpr et les voies de régulation du cycle cellulaire.....	105
3.3.2.1- Les effets sur la voie ATR (Rad3-related protein).....	105
3.3.2.2- Les effets directs sur CDC25.....	106
3.3.2.3- Les effets transcriptionnels sur les modulateurs du cycle cellulaire.....	106
3.3.3- Vpr, un facteur apoptotique ?	108
3.3.3.1- Les effets pro-apoptotiques de Vpr.....	108
3.3.3.1- Les effets anti-apoptotiques de Vpr.....	110
3.4- <i>Les Effets de Vpr sur la transcription virale</i>	111

PRESENTATION DU PROJET 114

PUBLICATIONS..... 118

PUBLICATION 1 119

PUBLICATION 2 134

PUBLICATION 3 (NON ENCORE SOUMISE A PUBLICATION) 154

DISCUSSION..... 180

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 194

ANNEXE 1 : NOUVELLE NOMENCLATURE DES ENZYMES DE MODIFICATION DE LA CHROMATINE CHEZ L'HOMME..... 199

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 201

Table des Figures

FIGURE 1 : LE VIH DANS LE MONDE.	16
FIGURE 2 : LES ORIGINES DU VIH-1.....	17
FIGURE 3 : SCHEMA EN COUPE D'UNE PARTICULE VIRALE.....	18
FIGURE 4 : REPRESENTATION DU GENOME VIRAL.....	20
FIGURE 5 : LE CYCLE VIRAL : DE L'INFECTION A L'INTEGRATION DU GENOME VIRAL DANS LA CELLULE HOTE.	24
FIGURE 6 : MECANISME D'ENTREE PAR FUSION <i>VIA</i> LES PROTEINES DE L'ENVELOPPE VIRALE ET LES RECEPTEURS CD4 ET CORECEPTEURS PRESENTS A LA SURFACE DES CELLULES CIBLES.	27
FIGURE 7 : LES ETAPES DE LA TRANSCRIPTION INVERSE.	30
FIGURE 8 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PIC.....	30
FIGURE 9 : LE MECANISME D'INTEGRATION DU GENOME VIRAL AU GENOME CELLULAIRE.	32
FIGURE 10 : LE CYCLE VIRAL DE L'INTEGRATION A LA PRODUCTION DES NOUVEAUX VIRIONS.....	34
FIGURE 11 : STRUCTURE ET ROLE DES DIFFERENTS PRODUITS DU PRECURSEUR GAG-P55.....	35
FIGURE 12 : LA MATURATION DES PARTICULES VIRALES	36
FIGURE 13 : LES MECANISMES DE TRANSMISSION DU VIH IN UTERO.....	39
FIGURE 14 : LES DIFFERENTES ETAPES DE LA PROPAGATION DU VIRUS DANS L'ORGANISME.	40
FIGURE 15 : L'INFECTION DES CELLULES DENDRITIQUES.....	41
FIGURE 16 : L'INFECTION DES LYMPHOCYTES CD4+.....	43
FIGURE 17 : L'INFECTION DES MACROPHAGES.....	45
FIGURE 18 : LES MODES DE PASSAGE DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE PAR LE VIH.	47
FIGURE 19 : LES EFFETS DU VIH SUR LES CELLULES MICROGLIALES.	48
FIGURE 20 : LES EFFETS DE L'INFECTION DES ASTROCYTES PAR LE VIH.	50
FIGURE 21 : LES EFFETS DE L'INFECTION DES NEURONES PAR LE VIH.....	51
FIGURE 22 : COURBES MOYENNES D'EVOLUTION DE LA CHARGE VIRALE PLASMATIQUE ET DU TAUX DE LYMPHOCYTES T CD4+ AU COURS DU TEMPS APRES L'INFECTION.	52
FIGURE 23 : LES THERAPIES ANTI VIH.....	55
FIGURE 24 : LES MECANISMES D'ACTION DES INHIBITEURS NUCLEOSIDIQUES (INTI)	56
FIGURE 25 : LE MECANISME D'ACTION DES INHIBITEURS NON NUCLEOSIDIQUES (INNTI).....	56
FIGURE 26 : LE MECANISME D'ACTION DES INHIBITEURS DE LA PROTEASE.....	57
FIGURE 27 : LE MECANISME DES INHIBITEURS DE FUSION : EXEMPLE DU T-20.....	58
FIGURE 28 : L'INTERACTION TAT/TAR.....	69
FIGURE 29 : LES DIFFERENTS NIVEAUX DE COMPACTION DE L'ADN CELLULAIRE.....	71
FIGURE 30 : LES DIFFERENTES MODIFICATIONS DES HISTONES : LE CODE HISTONE.....	73
FIGURE 31 : LE MECANISME D'ACETYLATION ET DE DEACETYLATION DES HISTONES.....	74
FIGURE 32 : LES REACTIONS DE METHYLATION DES HISTONES.....	78
FIGURE 33 : REACTION DE METHYLATION DES LYSINES.....	79

FIGURE 34 : LA CASCADE REACTIONNELLE D'UBIQUITINATION DES HISTONES	80
FIGURE 35 : CASCADE REACTIONNELLE DE SUMOYLATION DES HISTONES.....	81
FIGURE 36 : L'ISOMERISATION DES HISTONES	82
FIGURE 37 : LES MECANISMES D'ACTION DES FACTEURS DE REMODELAGE DE LA CHROMATINE ATP DEPENDANTS.	83
FIGURE 38 : LES MECANISMES DE METHYLATION DE L'ADN.	85
FIGURE 39 : MECANISMES HYPOTHETIQUES DE DEMETHYLATION DE L'ADN.....	88
FIGURE 40 : L'INSERTION PARTICULIERE DU PROMOTEUR VIRAL.....	88
FIGURE 41 : LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION LIES AU PROMOTEUR VIRAL DANS LES CELLULES MICROGLIALES.	90
FIGURE 42 : LA TRANSCRIPTION VIRALE EN PRESENCE DE TAT	91
FIGURE 43 : MODELE DE L'ACTIVATION DU PROMOTEUR DU VIH-1 PAR LA PROTEINE VIRALE TAT.....	93
FIGURE 44 : ORIGINE ET MECANISMES D'ACTION DES ARN INTERFERENTS.....	95
FIGURE 45 : STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE LA PROTEINE VPR	99
FIGURE 46 : LE PASSAGE DU PIC PAR LE COMPLEXE DE PORE NUCLEAIRE.	101
FIGURE 47 : LE MECANISME GENERAL D'ACTION DU PORE NUCLEAIRE.	102
FIGURE 48 : L'ENTREE DU PIC PAR DESTABILISATION DE L'ENVELOPPE NUCLEAIRE PAR VPR.....	103
FIGURE 49 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CYCLE CELLULAIRE.	104
FIGURE 50 : LES COMPLEXES CDK / CYCLINE IMPLIQUES DANS LES TRANSITIONS ENTRE LES DIFFERENTES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE.	105
FIGURE 51 : LES DIFFERENTES VOIES DE REGULATION DE LA TRANSITION G2/M ET LES DIFFERENTES ACTIONS DE VPR SUR CETTE TRANSITION.....	107
FIGURE 52 : LE COMPLEXE DDB1- DCAF1-E3 LIGASE.	110
FIGURE 53 : LES DIFFERENTS MECANISMES D'ACTION DE VPR SUR LES VOIES APOPTOTIQUES	111
FIGURE 54 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PROTEINES CTIP1 ET CTIP2	115
FIGURE 55 : REPRESENTATION DES PROMOTEURS DU VIRUS ET DU GENE DE p21, INTERACTION <i>VIA</i> LES SITES Sp1 ?	117
FIGURE 56 : LES DIFFERENTES ETAPES DE LA MISE EN PLACE D'UN ENVIRONNEMENT HETEROCHROMATINIEN AUTOURS DU PROMOTEUR VIRAL GRACE A CTIP2.....	195
FIGURE 57 : L'EXTINCTION DE L'EXPRESSION DE p21 PAR CTIP2	196
FIGURE 58 : CTIP2 CONTRE-CARRE LES EFFETS DE VPR SUR LE PROMOTEUR DE p21	197

Liste des Abréviations

aa	A mino a cide
ADA	A da a cetyl t ransferase
ADN	A cide D esoxiribo N ucléique
ADNc	A DN c omplémentaire
Ago	A rgonaute 2
ALT	A symptomatique à L ong T erme (=LNTTP)
AMPC	C yclic A denosine M ono P hosphate
ANT	translocase des nucléotides adényliques mitochondriale
AP-1	A ctivating P rotein 1
APOBEC 3G	a polopoprotein B mRNA editing enzyme, c atalytic polypeptide-like 3G
ARN	A cide R ibo N ucléique
ARN Pol	ARN P olymerase
ARNm	ARN m essenger
ARNsb	ARN s imple b rin
ARNt	ARN d e t ransfert
ATM	A taxia T elegiectascia M utated
ATR	Rad3-Related protein
AZT	a zidothymidine
BAF	B arrier to A utointegration F actor
BER	B ase E xcision R epair
BHE	B arrière H émo- E ncéphalique
BRE	T FII- B R esponsive E lement
BRG1	b rahma-related g ene 1
b-ZIP	b asic-leucine Z IPper transcription factor
C/EBP	C CAAT/ E nhancer B inding P rotein
CA	c apside
CAD	C ontext dependant A ctivation D omain
CaMK	Calcium/Calmodulin dependent protein kinase
CARM	C oactivator A ssociated a rginine M ethyltransferase
CCR2b	C hemokine (C-C motif) R eceptor 2
CCR5	C hemokine (C-C motif) R eceptor 5
CD	C luster d ifferentiation
CDK	C yclin d ependent k inase
CENP-A	C ENtromeérique p rotein A
CHD	C hromodomain- H elicase A TPase D N A binding protein
ChIP	C hromatine I mmuno P recipitation
Chk1	C heckpoint K inase 1
CMH	C omplexe M ajeur d' H istocompatibilité
Co-REST	R E1- S ilencing T ranscription F actor C orepressor
COUP-TF	C hicken O valbumin U pstream P romotor- T ranscription F actor
cpz	c himpanzé
CRE	C yclic A MP R esponse E lement
CREB	C yclic A MP R esponse E lement B inding P rotein
CRM1	
CRT	C omplex of R etrotranscription
CSL	C BF-1, S u(H) and I ag-1
CTD	C arboxy T erminal D omain

CTIP	COUP-TF Interacting Protein
CTL	Cytotoxic T Lymphocytes
CTS	Central Termination Signal
Cul4-DDB1-ROC1	ubiquitin ligase complex
CX3CR1	Chemokine (C-X3-C) motif Receptor 1
CXCR4	Chemokine CXC motif Receptor 4
DC-SIGN	recepteur des lectines de type C
DDB1	Damage specific DNA Binding protein 1
Dnases	DéoxyriboNucléAses
Dnmt	DNA méthyltransférase
Dot 1	disruptor of telomeric silencing 1
DSIF	DRB Sensitivity Inducing Factor
env	enveloppe
Ets-1	E26 Transformation Specific-1
FG	Phenylalanine-Glycine
gag	group-specific antigen
GCN5	general control of amino acid synthesis 5
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GNAT	Gcn5-related N-acetyltransferases
gp	glycoprotein
GR	Glucocorticoid Receptor
GRH	GRainyHead
gsn	cercopithèque hocheur
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
HAT	Histone Acetyl Transferase
hCG1	Human Nucleoporin CG1
HDAC	histone deacetylase
HK	Histones Kinases
HLH	Helix Loops Helix
HMBP	Histone Methyl-Bonding Protein
HMG	High Mobility Group
HMG(Y)	High Mobility Group protein (non histone chromosomal) isoform I and Y
HMT	Histone MethylTransferase
HP 68	ATP binding cellular protein
HP1	Heterochromatin Protein 1
hRIP	human rev interacting protein
HTLV	Human T-Lymphotropic Virus
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
IkB	Inhibitor of kappa B
IN	integrase
ISWI	Imitation of SWITCH
KHMT	Lysine histone methyltransferase
LAP2alpha	Lamina Associated Polypeptide 2 alpha
LAV	Lymphadenopathy-associated virus
LB	Lymphocyte B
LEDGF	Lens-Epithelium-Derived Growth Factor
LEF	Lymphoid Enhancer binding Factor
LFA	Leukocyte Function-associated Antigen
LSD	Lysine Specific Demethylase
LSF	Late Simian virus 40 Factor
LSF-CP2	LSF-CCAAT binding Protein 2
LT	Lymphocytes T

LTR	Long terminal repeat
LysRS	Lysil tRNA synthétase
LZ	Leucine Zipper
MA	Matrice
MAP	Mitogen Activating Protein
MDB	Methyl CpG Binding protein
miARN	microARN
MK2	MAPKAP kinase 2
MORF	MYST4
Moz	MYST3
MPF	Mitosis Promoting Factor
MPF	Mitosis Promoting Factor = Cdc2/CyclinB
MVB	Multivesicular bodies
MYST	MOZ, Ybf2/sas3, Sas2 Tip60
NC	Nucléocapside
N-CoR	nuclear receptor co -receptor
nef	negativ factor
NELF	Negative E longation factor
NES	Nuclear E xport S ignal
NF-AT	Nuclear F actor of A ctivated T Cells
NF-IL6	Nuclear factor of Interleukine 6 = CEBP beta
NF-kB	Nuclear factor-kappa B
NLS	Nuclear Localisation S equence
NPC	Nuclear P ore C omplex
NRRE	Nuclear R eceptor R esponsive E lement
nuc	nucleosome
Nup	nucleoporin
NurD	Nucleosome R emodeling and D eacetylating complex
OMS	Office Mondial de la Santé
ONU	Organisation des Nations Unies
ONUSIDA	programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA
p	peptide
PADI4	Peptidylarginine deminase 4
PBMC	P eripheral B loob M ononuclear C ell
PBS	primer binding site
PCAF	p300/CEBP Associating Factor
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase C hain R eaction
PIC	P re I ntegration C omplexe
PKA	Protein K inase A
PP2A	Protein P hosphatase 2A
PPT	PolyPurine T ract
PPTc	PolyPurine T ract central
PR	protease
PRMT	Protein Arginine MethylTransferase
PTD	Protein T ransduction D omain
P-TEFb	Positive-Transcription E longation F actor b
Ptt	Pan troglodytes troglodytes
RAR	R etinoic A cid R eceptor
rcm	mangabey à tête rousse
Région R	Région Répétée
Région U3	région unique en 3'
Région U5	région unique en 5'
rev	regulator of e xpression v irion

RISC	RNA Induced Silencing Complex
RMN	Raisonnance Magnétique Nucléaire
RRE	Rev Response Element
RSF	Remodeling and Spacing Factor
RT/TI	Reverse Transcriptase
RXR	Retinoic X Receptor
SAGA	Spt Ada Gcn5 Acetyltransferase
SAM	S-Adenosyl -Methionine
SANT	SWI3, ADA2, N-CoR, TFIIB
siARN	petit ARN interférent
SIDA	Syndrôme de l'ImmunoDéficiency Aquisse
SIRT	Silent Information Regulator
SIV	Simien Immunodeficiency Virus
Skp1	S-phase kinase-associated protein 1
SMRT	Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptors
SNC	Système Nerveux Central
Sp1/3	Specific Protein 1/3
STAT-1	Signal Transducers and Activator of Transcription -1
SU	surface
SUMO	Small Ubiquitin Related Modifier
SUV	Supressor of Variegation
SWI/SNF	SWITCh/ Suchrose Non Fermenting
TAK	Tat Associated Kinase
TAR	TransActivation Responses element
Tat	transactivator of transcription
TBP	TATA Binding Protein
TCF-1/LEF1	T Cell Factor/ Lymphoid Enhancer binding Factor 1
TCR	T Cell Receptor
TFII	Transcription Factor of RNA polymerase II
TGF	Transforming Growth Factor
TM	Trans Membranaire
TNF	Tumor Necrosis Factor
TR	récepteur de l'hormone thyroïdienne
TRBP	HIV-1 TAR RNA Binding Protein
TRE	TPA Responsive Element
TSA	trichostatine A
Tsg101	Tumor susceptibility gene 101
UAS	Upstream Activating Sequence
UNG / UDG	Uracyl DNA Glycosylase
URS	Upstream Reressing Sequence
USF-1	Upstream Stimulating Factor-1
V-ATPase	vesicular ATPase
V-CAM	vascular cell adehsion molecule
Vif	viral infectivity factor
VIH	Virus de l'Immunodéficiency Humaine
Vpr	viral protein r
Vpu	viral protein u
WCRF	WSTF related Chromatin Remodeling Factor
YY1	Ying Yang-1

INTRODUCTION

I - Le Virus de l'Immunodéficience Humaine ...

1- L'histoire du VIH : de ses origines à nos jours.

- 1981 : Le « gay syndrome », appelé ainsi car tout d'abord observé que dans la communauté homosexuelle aux USA, est décrit pour la première fois. Il se traduit par une immunodéficience sévère accompagnée d'une pneumonie rare due à *Pneumocystis carinii* (Gottlieb et al., 1981).
- 1982 : Les premiers cas sont décrits en France. L'observation de la maladie chez des hémophiles fait penser à la présence d'un virus ou d'un rétrovirus (1982). Les chercheurs français cherchent à mettre en évidence la présence d'une activité transcriptase inverse et observent pour la première fois l'effet cytopathogène du virus sur des cellules ganglionnaires en culture.
Dans un premier temps, aux USA, l'équipe du Pr Gallo pense que le virus responsable du SIDA serait un mutant ou un variant du HTLV1 (Gallo et al., 1983).
- 1983 : Le virus est isolé et les premières preuves qu'il s'agit d'un rétrovirus différent des HTLV1 et 2 sont découvertes (Barre-Sinoussi et al., 1983). Le virus est baptisé LAV (Lymphadenopathy-associated virus).
- 1985 : Le LAV est séquencé (Wain-Hobson et al., 1985) et le premier test de dépistage est commercialisé. En France, le test est obligatoire pour tous les donneurs de sang.
La première conférence internationale sur le SIDA a lieu à Atlanta aux USA. Le LAV-2 est isolé dans un prélèvement sanguin d'un malade originaire de l'Afrique de l'ouest (Clavel et al., 1986).
- 1986 : Le virus est rebaptisé VIH dans un souci d'homogénéisation entre les différentes équipes qui travaillent sur le sujet et publient sous des noms différents (LAV, HTLV-III, ARS).
L'activité antivirale de l'AZT est mise en évidence.
- 1987 : La séquence du VIH-2 est publiée (Franchini et al., 1987) et son test de dépistage est développé par l'Institut Pasteur.
- 1990 : La multi-thérapie voit le jour afin d'éviter l'apparition de souches virales résistantes aux médicaments.
- 1993 : Les premiers tests de vaccins chez l'homme sont un échec, ils ne parviennent pas à arrêter la prolifération virale.

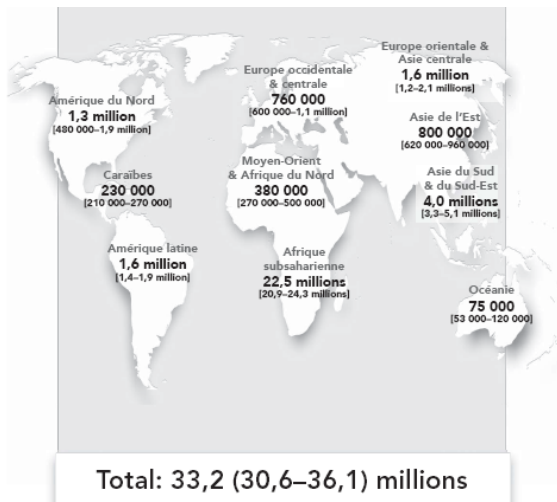
- 1995 : L'efficacité des inhibiteurs de protéases ainsi que l'effet positif sur les patients des bi et trithérapies sont publiés (Danner et al., 1995; Markowitz et al., 1995). L'existence des réservoirs latents dans les cellules T-CD4+ est mise en évidence *in vivo* (Chun et al., 1995).
- 1996 : Les corécepteurs CCR5 nécessaires à l'infection par le VIH sont découverts (Cohen, 1996; Deng et al., 1996).
- 1997 : La présence de foyers d'infections persistants malgré les thérapies est mise en évidence (Chun et al., 1997b; Finzi et al., 1997; Wong et al., 1997).
Le premier inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse apparaît (Genin et al., 1996).
- 1998 : Découverte de la précocité de la mise en place des réservoirs au cours de l'infection (Chun et al., 1998).
- 1999 : Début des essais cliniques avec un inhibiteur de fusion, le T20 (1999b).
- 2001 : Les produits génériques sont commercialisés dans les pays en voie de développement et des accords de réduction de prix sont signés avec les firmes pharmaceutiques.
- 2006 : Découverte du VIH-1 du groupe O chez des Gorilles Sauvages pouvant constituer un intermédiaire entre l'homme et le chimpanzé qui est un des réservoirs permettant l'adaptation et la transmission du SIV à l'homme sous la forme du VIH (Van Heuverswyn et al., 2006).
- 2007 : Mise sur le marché du Maraviroc, bloqueur d'entrée du virus *via* les corécepteurs CCR5, c'est la première nouvelle classe de médicament approuvée depuis 10 ans.
Les essais en phase II du vaccin V520, considéré comme un des plus prometteur du moment, sont arrêtés par Merck. Les sujets traités avec le vaccin semblent plus sensibles à l'infection que ceux traités avec le placebo (Cohen, 2007; Sekaly, 2008).

2- Le VIH aujourd'hui dans le monde.

Comme le montre ce petit historique non exhaustif, de nombreuses avancées scientifiques ont été réalisées au cours des 25 dernières années, et le monde entier s'est mobilisé face à l'épidémie. Malgré cela, le VIH-1 reste un problème mondial de santé publique.

Lors de son dernier rapport, l'ONU faisait état de 33,2 millions de personnes vivant avec le VIH en 2007 dans le monde soit 1% de la population (figure 1A). Si les pays développés voient la situation se stabiliser grâce aux campagnes de prévention et à l'accès des patients aux thérapies, les pays à revenus faibles et moyens tels que ceux de l'Afrique Subsaharienne continuent de subir les effets dévastateurs de la maladie. Ils représentent 95% des nouveaux cas du fait du manque d'information de la population sur les dangers de la maladie, les moyens de s'en prémunir et surtout le coût trop important des thérapies. D'après un rapport de l'OMS et ONUSIDA en mars 2006, moins de 10% de la population atteinte a accès à une thérapie en Afrique subsaharienne (figure 1B).

A] Adultes et enfants vivant avec le VIH estimation en 2007



B] L'accès aux médicaments contre le sida dans le monde en 2005

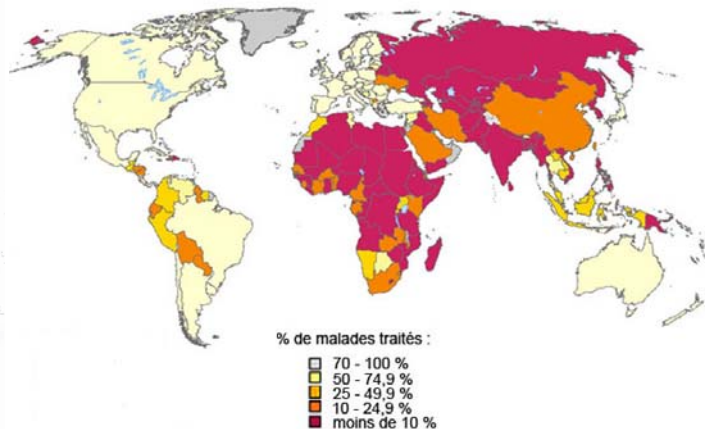


Figure 1 : Le VIH dans le monde.

A] Carte de répartition des personnes vivant avec le VIH dans le monde. D'après Unaid.

B] Carte de répartition de l'accès aux thérapies des personnes infectées dans le monde. D'après l'OMS.

Les pays sous développés et en voie de développement représente les pays les plus touchés par le VIH mais sont également ceux où l'accès aux thérapies est le plus limité.

3- Les origines du virus et son évolution

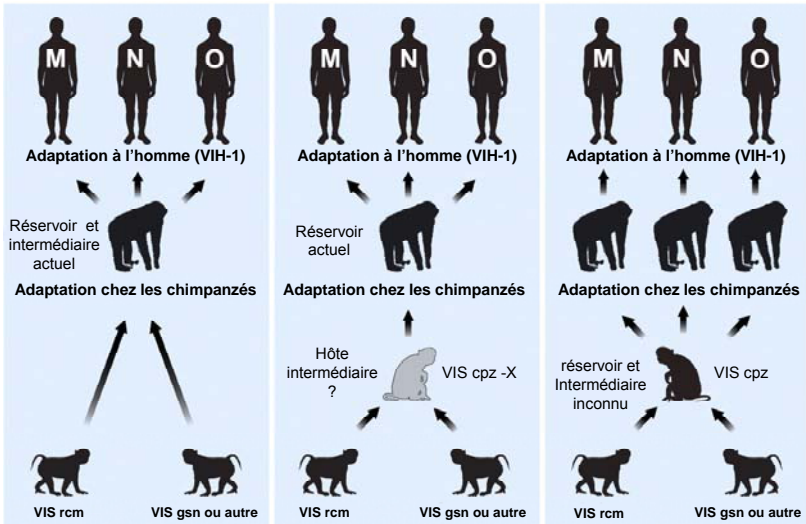
L'origine géographique du virus VIH-1 se situerait dans la république démocratique du Congo (ex Zaïre). En effet, le VIH-1 a pu être détecté dans des échantillons sanguins datant de 1959 et c'est également là, que l'on observe la plus grande variabilité génétique des souches virales. Tous les sous types connus du virus y sont présents (M, N, O : figure 2B), ce qui traduit la présence du virus depuis de nombreuses années et qui définit l'Afrique Centrale comme l'épicentre de la pandémie.

L'apparition du virus chez l'homme proviendrait du braconnage de chimpanzés contaminés par le SIV (Virus Immunodéficient Simien) et plus précisément lors du dépeçage et de la consommation de la viande. (Gao et al., 1999). Le virus aurait ensuite subi des étapes de mutation et d'adaptation jusqu'à ce que l'Homme devienne un hôte favorable à sa multiplication et à sa propagation (figure 2A).

Ces singes auraient eux mêmes été contaminés lors de leur consommation d'autres petits singes atteints du SIV ou de deux virus immunodéficients différents qui se seraient ensuite recombinaisonnés pour donner le SIV (Bailes et al., 2003; Heeney et al., 2006)

De plus, la découverte récente du VIH-1 du groupe O chez des Gorilles Sauvages montre qu'ils pourraient constituer également un intermédiaire entre l'homme et le chimpanzé (Van Heuverswyn et al., 2006).

A]



B]

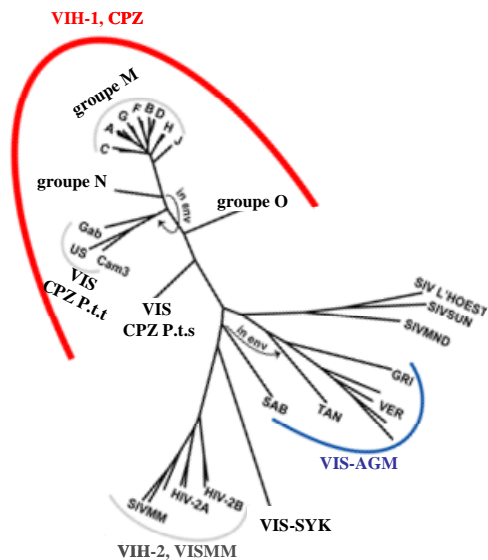


Figure 2 : Les origines du VIH-1.

A] Les différentes hypothèses d'évolution du SIV au VIH-1. Les singes constituent des réservoirs et des intermédiaires qui ont permis au virus d'évoluer jusqu'à devenir pathogène pour l'homme. D'après (Heeney et al., 2006) modifiée
rcm = mangabey à tête rousse ; gsn = cercopithèque hocheur ; cpz= chimpanzé (en captivité)

B] Arbre phylogénétique des différents types de VIH et de SIV. Ptt = Pan troglodytes troglodytes
D'après Kuiken et al, Los Alamos National laboratory : theoretical biology and biophysics group
ptt

Le SIV aurait trouvé chez l'homme un hôte favorable à sa multiplication et à sa propagation dans la population et aurait muté pour finalement devenir le VIH avec tous ses types et sous types (VIH-1 : N, M, O, VIH-2) (figure 2B).

4- Description générale du VIH.

Le virus de l'immunodéficience humaine, qui est l'agent étiologique du SIDA, fait partie de la famille des *Retroviridae* dont il possède les caractéristiques communes à tous ses membres :

- I) une capsid en forme de cône,
- II) la présence d'une transcriptase inverse,
- III) une bicouche lipidique semblable à la membrane plasmique de la cellule hôte,
- IV) une structure membrane/capsid permissive à l'ancrage de protéines étrangères.

De plus c'est un *Retroviridae* du genre *lentivirus* qui, comme son nom l'indique, peut engendrer des maladies persistantes chroniques à évolution lente induisant des désordres immunologiques et neurologiques.

Sa particule virale d'un diamètre de 80-120 nm, est constituée d'une enveloppe dans laquelle sont enchâssés des spicules. L'enveloppe contient une matrice et une capsid qui renferme la nucléocapsid avec l'ARN et les protéines virale (figure 3).

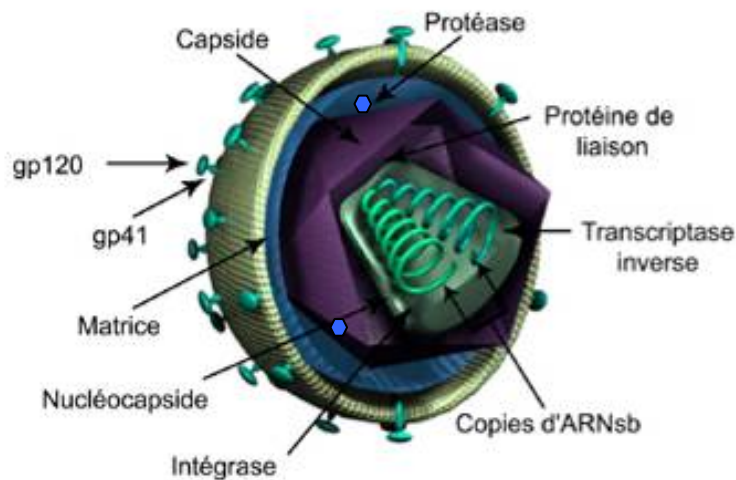


Figure 3 : Schéma en coupe d'une particule virale.

D'après (Ott et al., 2003) modifié

La particule virale porte à sa surface les protéines gp120 et gp41 nécessaire à sa fusion avec les cellules cibles. Elle contient au sein de la capsid l'ARN viral (Sb = simple brin), ainsi que différentes protéines nécessaire aux premières phases du cycle cellulaire

4.1- L'enveloppe.

Elle est d'origine cellulaire, composée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont enchâssées 72 spicules constitués de trois glycoprotéines transmembranaires (gp41) liées

à trois glycoprotéines de surfaces (gp120) (pour revue (Roux and Taylor, 2007)). C'est par l'intermédiaire de ces glycoprotéines que le virus pourra se lier à la membrane des cellules de l'hôte fusionner et y libérer son contenu (Moore et al., 1991; Moore and Nara, 1991) (cf partie I-5.1.1).

4.2- La matrice.

Elle tapisse la face interne de l'enveloppe et est constituée de protéines p17 oligomérisées. Elle joue différents rôles au cours du cycle de réplication du virus : Elle est nécessaire à l'import nucléaire (Haffar et al., 2000), et à l'incorporation des protéines d'enveloppe, gp120 et gp41, dans l'enveloppe des virions matures. (Yu et al., 1992). Ces différentes étapes seront détaillées plus loin dans ce manuscrit.

4.3- La capsid.

De forme conique, elle est constituée majoritairement de la protéine CA p24 et renferme la nucléocapside ainsi que diverses protéines virales et cellulaires nécessaires au cycle viral (Frankel, 1996).

4.4- La nucléocapside.

Les protéines p7 entourent les deux brins d'ARN simple brin qui constituent le génome viral pour former la nucléocapside (Poon et al., 1998). Elle réunit les deux brins d'ARN entre eux et les protège de l'activité des enzymes cellulaires. Elle est également essentielle à l'assemblage des particules virales (Dawson and Yu, 1998; Zhang and Barklis, 1997).

4.5- Les protéines encapsidées.

Lors de l'infection, les premières étapes du cycle répliatif nécessitent un certain nombre de protéines et d'enzymes que le virus transporte dans sa capsid. Certaines sont d'origine virale : la transcriptase inverse (RT, p66 et p51), la protéase (PR, p11), l'intégrase (IN, p32), la protéine p6, les peptides p1 et p2, et les protéines dites accessoires Vpr, Vif, Nef ; et d'autres sont des molécules de la cellule hôte d'origine de la particule virale (ARNt synthétase, actine, ARNt lys³, cyclophiline A, ubiquitine...). Les rôles de ces facteurs seront abordés lors de la description du cycle répliatif.

4.6- Le génome viral.

Il est composé de deux brins d'ARN (+) homologues d'environ 9,4 kB chacun, comprenant (McCune, 1991) :

- 3 gènes rétroviraux ou gènes de structure qui codent des protéines du virus (gag, pol, env),
- 6 gènes codant pour des protéines régulatrices (tat, rev) et des protéines dites auxiliaires (vif, vpr, vpu, nef).

Le génome du VIH, après rétrotranscription, est encadré en 5' et en 3' de deux régions non codantes longues et répétées portant le nom de LTR pour « long terminal repeat » (figure 4).

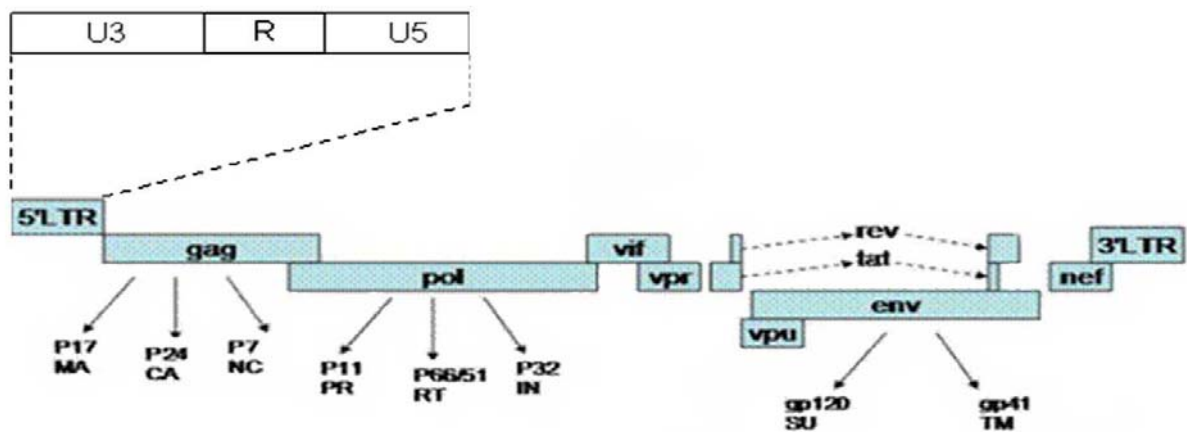


Figure 4 : Représentation du génome viral.

D'après (Costin, 2007) modifiée

Le génome viral, entouré par deux séquences régulatrices LTR (long terminal repeat), code pour les différents gènes de structures nécessaire au virus ainsi que pour différentes protéines et enzyme permettant sa répllication au sein des cellules. Les séquences LTR contiennent différentes régions particulières non codantes : U3, R et U5.

4.6.1- Les régions non codantes du génome ARN.

4.6.1.1- *La région non codante en 5'.*

Elle contient différentes régions caractéristiques (figure 4) (pour revue (Al-Harhi and Roebuck, 1998)) :

- Comme les ARNm au sein de la cellule, l'extrémité 5' comporte une coiffe qui empêche la dégradation de l'ARN par les exonucléases.
- Une région R (pour Répétée), d'une centaine de nucléotides, nécessaire à la transcription des gènes viraux. Elle contient une région dénommée TAR

(TransActivation Response element), qui permet la transactivation des gènes viraux suite à l'interaction avec la protéine virale Tat (Feng and Holland, 1988).

- Une région U5
- Une région PBS (pour Primer Binding Site) de 18 nucléotides qui sert d'amorce lors de la transcription inverse en fixant l'ARN-t3 lys cellulaire (Isel et al., 1993).

4.6.1.2- *La région non codante en 3'.*

Elle est constituée d'une région U3 contenant un signal de polyadénylation, AAUAAA, permettant de stabiliser l'ARN (Valsamakis et al., 1992) et qui après rétrotranscription constituera un site de fixation pour des facteurs de transcription, comme par exemple AP-1, NF-κB, NF-AT, Sp1 (pour revue (Van Lint et al., 1997)). et d'une région R identique à celle située en 5' (figure 4).

4.6.2- Les régions codantes.

L'ARN viral contient les séquences codant pour trois gènes communs à tous les rétrovirus (figure 4) :

- gag : il est à l'origine du précurseur p55 (Gag) des protéines structurales internes de tous les rétrovirus. Le clivage du précurseur par la protéase virale, qui a lieu lors de la maturation des particules virales à l'extérieur de la cellule, donne naissance à la protéine p6 ainsi qu'aux protéines de la matrice (MA p17), de la capsid (CA p24) et de la nucléocapsid (NC p7) (Henderson et al., 1990) (cf partie I-5.2.2).

- pol : il code à partir du précurseur p180 (gag-pol), pour les trois protéines enzymatiques virales nécessaires au cycle répliatif : la reverse transcriptase (RT, p66 et p51) qui possède une activité additionnelle Rnase H, l'intégrase (IN, p32) et la protéase (PR, p12) (Oroszlan and Luftig, 1990).

- env : Ce gène code pour la gp160 qui est le précurseur de deux protéines différentes : la protéine de surface (gp120) et la protéine transmembranaire (gp41), toutes deux constitutives de l'enveloppe et nécessaire à la fusion de la particule virale à la cellule hôte lors de l'infection (cf partie I-5.1.1).

Le génome viral code également pour six protéines régulatrices essentielles à la propagation du virus dont quatre seront encapsidées lors de la formation des particules virales.

- Tat : Transactivator of Transcription (p14). (*ce facteur et son mode d'action seront décrits plus en détail dans la partie III*). Sa fixation à la séquence TAR de la région 5' de l'ARN (Berkhout et al., 1989) va permettre le recrutement de complexes contenant des enzymes possédant une activité acétyl transférase. Elles vont conduire à la modification de la chromatine au niveau du site d'intégration du provirus, le rendant plus accessible à la transcription. Tat va également permettre d'ajuster l'activité de la polymérase II par le recrutement du complexe P-TEFb (Benkirane et al., 1998; Bres et al., 2002; Marzio et al., 1998).

En plus de son rôle transcriptionnel, Tat possède de nombreux autres effets au niveau cellulaire : il induit la production de cytokines, provoque des effets neurotoxiques (Buscemi et al., 2007; Neri et al., 2007; Price et al., 2005), et est à l'origine de phénomènes d'apoptose (Clark et al., 2000; Poggi and Zocchi, 2006).

- Vpr : Viral Protein r (p15). (*Cette protéine fera l'objet d'un chapitre à part entière : Partie IV*) Elle agit au niveau de différentes étapes clefs du cycle répliatif viral dont la transcription inverse, le transport nucléaire du génome viral dans le noyau, la transcription ainsi que le niveau de production virale en agissant sur le cycle cellulaire des cellules infectées. (Pour revue (Le Rouzic and Benichou, 2005)

- Rev : Regulator of Expression Virion (p19). La protéine issue de ce gène régule l'épissage des ARNm viraux et permet leur transport vers le cytoplasme pour la traduction (Fischer et al., 1994). Elle possède un domaine de liaison à l'ARN (riche en arginine) qui reconnaît les ARNm non épissés ou partiellement épissés contenant la séquence de reconnaissance RRE (Rev-responsive elements) (Cullen, 2003; Frankel and Young, 1998). Par ailleurs, elle contient un domaine effecteur (riche en leucine) correspondant à un signal d'export nucléaire (NES) (Weis, 2002; Wodrich and Krausslich, 2001) ainsi qu'une séquence NLS (signal d'import nucléaire), ce qui lui confère la capacité de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (Hope, 1999; Meyer and Malim, 1994; Richard et al., 1994). Pour agir, rev nécessite la présence de cofacteurs cellulaires tels que hRIP (human rev interacting protein) (Sanchez-Velar et al., 2004) et CRM1 (Fukuda et al.,

1997). En effet, en leur absence, les ARNm viraux ne peuvent être exportés hors du noyau, ils s'accumulent à sa périphérie et aucune production virale n'est possible (Yu et al., 2005).

- Nef: Negativ Factor (p27). Produite abondamment lors des premières phases du cycle de réplication virale, c'est une protéine très conservée chez les lentivirus infectant les primates. Elle joue un rôle fondamental dans la propagation du virus et l'évolution de l'infection vers un SIDA installé. Elle optimise la production virale en agissant sur le transport et la machinerie de transduction cellulaire, ce qui affecte les mécanismes de présentation de récepteurs à la membrane tel que les CD4 (Garcia and Miller, 1991), les molécules du CMH de classe I et II (Schindler et al., 2003; Schwartz et al., 1996) et les récepteurs des chemokines (Michel et al., 2005). Elle module la composition en lipides de la membrane des virions et des microdomaines sur les cellules hôtes, augmentant ainsi l'infectivité des virions (Brugger et al., 2007).

- Vif: Viral Infectivity Factor (p23). Protéine de 192 aa, exprimée en grande quantité dans le cytoplasme des cellules infectées, elle permet une meilleure maturation des virions et la formation d'un nombre réduit de particules virales défectueuses (Hoglund et al., 1994). Vif bloque une des lignes de défense de l'organisme en se liant à APOBEC 3G¹ (apolopoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G). Il induit ainsi sa dégradation par le protéasome et prévient son incorporation dans les particules en formation (Kao et al., 2003; Marin et al., 2003; Yu et al., 2003b).

De plus, vif semble jouer un rôle de protéine chaperonne au cours de la transcription inverse en régulant la dimérisation de l'ARN lors des premières étapes du processus (Henriet et al., 2007).

¹ APOBEC3G : Avec APOBEC 3F et 3B, ils constituent des inhibiteurs cellulaires de la réplication virale dans les cellules non permissives. Ce sont des déaminases, elles provoquent une hypermutation du brin d'ADN (-) nouvellement synthétisé, induisent des altérations de la morphologie des virions et déstabilisent le complexe de transcription inverse (Doehle, B.P., Schafer, A. and Cullen, B.R. (2005) Human APOBEC3B is a potent inhibitor of HIV-1 infectivity and is resistant to HIV-1 Vif. *Virology*, **339**, 281-288, 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**, 2451-2458, 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**, 6073-6076.).

- Vpu : Viral Protein u (p16). Cette petite protéine de 9kDa n'est présente que chez le VIH-1 (pour le VIH-2, elle est remplacée par Vpx) (Cohen et al., 1988). Elle facilite la libération des particules virales lors du bourgeonnement (Bour and Strebel, 2003; Salim and Ratner, 2008), permet la dégradation du CD4 par le protéasome suite à son ubiquitination par Skp1 (Binette et al., 2007; West, 2003), atténue la réponse immunitaire de l'organisme face à l'infection en diminuant la présentation du CMH II à la surface des cellules (Hussain et al., 2008) et le transfert de gp160 (précurseur des protéines gp120 et gp 41) vers la membrane.

5- Le cycle réplcatif du VIH-1.

Le cycle réplcatif se divise en 2 phases : une phase pré-intégrative allant de l'infection de la cellule jusqu'à la phase d'intégration de l'ADN proviral au génome de la cellule hôte, et une deuxième phase post-intégrative qui va conduire à la formation des nouveaux virions matures.

5.1- La phase pré-intégrative.

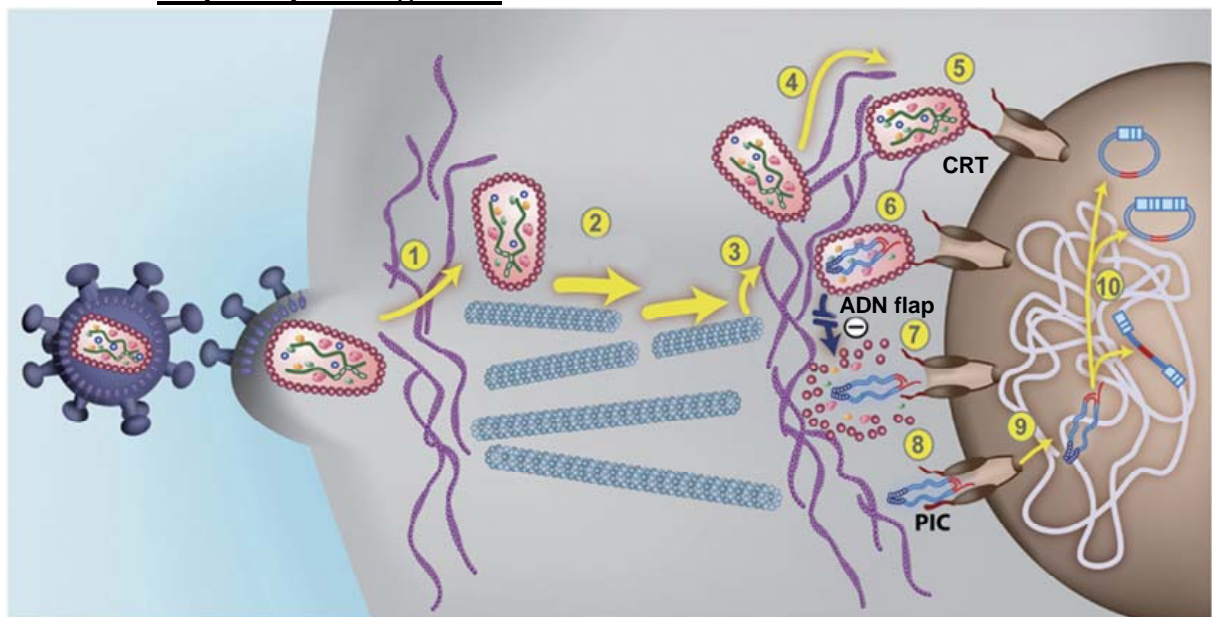


Figure 5 : Le cycle viral : de l'infection à l'intégration du génome viral dans la cellule hôte.

D'après (Arhel et al., 2007) modifié.

Après fusion avec la membrane de la cellule hôte, la capside renfermant le génome viral est transporté jusqu'à la membrane nucléaire (1-5), la transcription inverse a alors lieu au sein de la capside et conduit à sa destructuration qui libère l'ADN viral nouvellement synthétisé (6,7), il est alors pris en charge par le complexe de préintégration (PIC) qui le transporte dans le noyau (8, 9) pour qu'il s'intègre ou non au génome de la cellule hôte.

5.1.1- L'attachement et l'entrée du virus.

5.1.1.1- Récepteurs et co récepteurs mis en jeu.

Le VIH-1 pénètre dans les cellules hôtes par l'intermédiaire de la glycoprotéine virale gp120 qui se fixe au récepteur CD4. La présence du CD4 à la surface des cellules est nécessaire mais non suffisante à l'infection de celles-ci. La présence de corécepteurs CXCR4 (Feng et al., 1996) et CCR5 (Alkhatib et al., 1996; Deng et al., 1996) permet l'infection productive, et détermine ainsi le tropisme du virus : les souches utilisant le CCR5 sont ainsi appelées souches R5, celles dont l'entrée nécessite CXCR4, souches X4, et celles qui sont capables d'utiliser les deux corécepteurs X4R5. Les corécepteurs présentant les motifs CXCR ou CCR sont respectivement les récepteurs naturels des alpha et beta chimiokines. Les chimiokines sont capables d'inhiber la réplication du VIH en provoquant leur internalisation, mais aussi en bloquant les corécepteurs du virus (Amara et al., 1997; Aramori et al., 1997).

Des individus homozygotes pour une délétion de 32 paires de bases dans le gène CCR5 ($\Delta 32$ -CCR5) ont un phénotype CCR5- et sont de ce fait résistants à l'infection par les virus de souche R5 du VIH-1 (Liu et al., 1996b).

L'utilisation des corécepteurs par les différents isolats du VIH à également une influence importante sur la pathologie. En effet, l'apparition de souches X4 au cours de l'infection chronique est associée à une augmentation de la charge virale et à la progression vers la maladie (Connors et al., 1997; Shankarappa et al., 1999).

5.1.1.2- Les récepteurs alternatifs d'attachement.

On admet généralement que l'attachement du VIH-1 aux cellules cibles se fait via l'interaction de la sous-unité gp120 des glycoprotéines d'enveloppe avec le récepteur cellulaire CD4. Cependant l'utilisation de récepteurs alternatifs pour l'attachement du VIH-1 sur différents types cellulaires a pu être démontrée par de nombreux auteurs.

- Les récepteurs du mannose sur les macrophages et cellules dendritiques (Larkin et al., 1989)
- DC-SIGN sur les cellules dendritiques (Curtis et al., 1992; Hong et al., 2002; Wichukchinda et al., 2007).
- Les héparans sulfates sur différents types cellulaires (macrophages et cellules dendritiques) (Vidricaire et al., 2007)
- Le Galactosylcéramide et ses dérivés (Backhed et al., 2002)

- Les Sulfatides des cellules neuronales, gliales, épithéliales et des macrophages (Harouse et al., 1991; Seddiki et al., 1994).

Ces différents récepteurs alternatifs peuvent être impliqués dans l'augmentation de l'infection de certains types cellulaires (par exemple DC-SIGN sur les cellules dendritiques (de Witte et al., 2008))

5.1.1.3- Le mécanisme de fusion des membranes. (pour revue (Matthews et al., 2004))

La protéine virale de surface gp120 va rentrer en contact avec les récepteurs CD4 exprimés à la surface des cellules cibles (Lasky et al., 1987) (figure 6a). La liaison gp120/CD4 va engendrer une modification de la conformation de la gp120, qui va permettre un déplacement du site de liaison vers le corécepteur CCR5 (Wu et al., 1996) ou CXCR4 en fonction du type cellulaire infecté (figure 6b-c). Cette nouvelle interaction de la gp120 conduit à un réarrangement de la protéine virale transmembranaire gp41 (Wild et al., 1994) (figure 6d). Le peptide de fusion de la gp41 s'insère dans la membrane plasmique (figure 6e) et permet la formation du pore de fusion par déstabilisation des membranes, suivi du transfert du matériel viral dans la cellule cible (figure 6f). Il a été mis en évidence que la fusion de la particule virale avec la cellule cible est un mécanisme coopératif faisant intervenir les radeaux lipidiques, qui permettent de concentrer les récepteurs CD4 et les corécepteurs dans des zones particulières, les rendant ainsi accessibles dans un espace restreint (Nguyen et al., 2005).

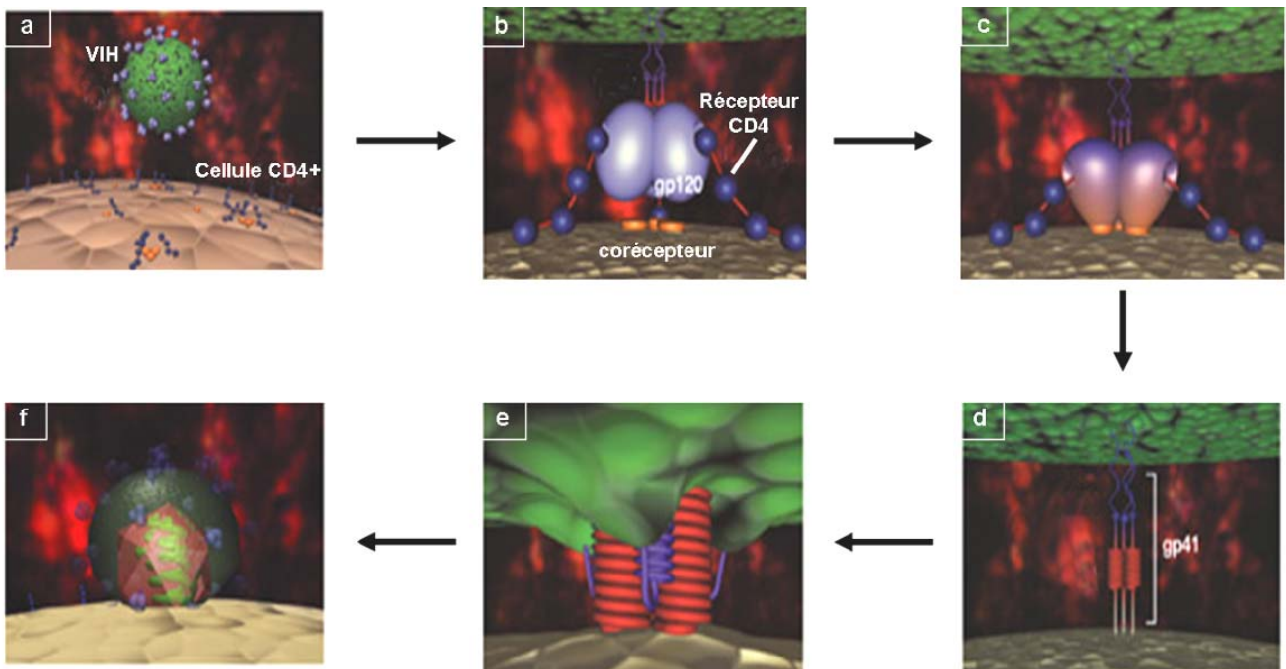


Figure 6 : Mécanisme d'entrée par fusion *via* les protéines de l'enveloppe virale et les récepteurs CD4 et corécepteurs présents à la surface des cellules cibles.

D'après (Matthews et al., 2004) modifiée

La particule virale entre en contact avec la cellule cible grâce à la gp 120 qui reconnaît le récepteur CD4 exprimé à leur surface (a-b) ; la liaison gp120-CD4 conduit à un changement de conformation de la gp41 (c-d) qui permet le rapprochement des deux membranes et leur fusion (e-f).

Cas particuliers.

Au cours du bourgeonnement des particules virales, celles-ci emmènent à leur surface un certain nombre de protéines cellulaires dont les récepteurs sont exprimés à la surface des autres cellules potentiellement infectables par le virus. Ainsi, la cyclophiline, les héparans sulfates (Saphire et al., 2000), les molécules d'adhésion I-CAM et LFA (Fortin et al., 1997; Rizzuto and Sodroski, 1997; Tardif and Tremblay, 2003) sont capables de permettre l'endocytose de particules virales pouvant conduire à une infection productive. Il s'agit de mécanismes qui favorisent l'attachement du virus aux cellules (lignée cellulaire et cellules primaires) mais les récepteurs CD4 et les corécepteurs sont nécessaires pour la fusion de la particule à la cellule hôte.

5.1.1.4 - L'entrée par endocytose

Certaines cellules telles que les macrophages ou les cellules dendritiques peuvent endocyter ou phagocyter des particules virales. La voie d'entrée par endocytose conduit généralement à la dégradation des particules virales. Cependant il peut arriver que le virus échappe à la dégradation, qu'il puisse fusionner grâce au CD4 et à un corécepteur à l'intérieur d'une vésicule (corps multivésiculaire) (pour revue (Conner and Schmid, 2003)).

5.1.2- La transcription inverse et la décapsidation.

Depuis de nombreuses années, les données bibliographiques font état d'un phénomène de décapsidation ayant lieu avant la transcription inverse (pour revue,(Goff, 2001). Cependant, les dernières études tendent à montrer que la décapsidation aurait lieu après la synthèse de l'ADN viral, une fois le complexe de pré-intégration à proximité des pores nucléaires. En effet, la capsid intacte a été visualisé *in vivo* après l'entrée virale

jusqu'à ce qu'elle atteigne les pores nucléaires (McDonald et al., 2002). Ce phénomène a également été observé pour d'autres rétrovirus (Bowerman et al., 1989; Petit et al., 2003; Saib et al., 1997). De plus, il semble que la décapsidation ne soit pas nécessaire à la transcription inverse (Warrilow et al., 2007) et même que cela lui soit délétère, puisque le facteur cellulaire rhTRIM5 α conduit à la dégradation du complexe de pré-intégration et à une infection non productive suite à l'induction d'une décapsidation rapide (Stremlau et al., 2006). La transcription inverse aurait donc lieu dans la capsid, ce qui favoriserait le phénomène en plaçant les différents « acteurs » dans un environnement confiné (Arhel et al., 2007).

5.1.2.1- La transcription inverse.

Elle va permettre la production d'un ADN double brin encadré par les 2 séquences LTR (pour revue (Gilboa et al., 1979)).

Le complexe de transcription inverse, constitué des deux brins d'ARN, de l'ARNtlys³, de la transcriptase inverse, de l'intégrase, de la matrice, de la nucléocapside et de la protéine Vpr, est transporté dans la capsid le long des microtubules jusqu'à la surface nucléaire où elle est immobilisée dans le réseau d'actine (Arhel et al., 2006a; McDonald et al., 2002).

Dans un premier temps, la séquence PBS (Primer Binding Sequence) de la région non codante située en 5' va lier l'ARNtlys³ au cours du bourgeonnement et de la maturation des particules virales (Ratner et al., 1985) afin qu'elle serve d'amorce à la transcriptase pour la synthèse du brin d'ADNc (ADN (-) Strong stop) correspondant aux régions U5 et R (figure 7). Le rétrotranscrit est dégradé par l'activité RNase H de la RT et le fragment d'ADN (-) Strong Stop va s'apparier avec la région R située en 3'. L'activité polymérase permet la formation, en aval de la séquence déjà rétrotranscrite de la suite de l'ADNc. Le brin d'ARN servant de matrice est ensuite dégradé à l'exception de 2 régions particulières, PPTc et PTT, qui restent appariées et servent d'amorces à la formation des brins U+ et D+ d'ADNc. La dégradation de l'ARNtlys³ libère la région pbs complémentaire de la région PBS. Ces deux séquences vont s'apparier, provoquant la formation d'une boucle d'ADN matrice pour la synthèse des brins U+ et D+. La production des deux brins se déroule en parallèle et conduit à la formation d'un brin d'ADN avec une zone de recouvrement appelée ADN Flap. Le brin complémentaire permettant la formation d'un ADN double brin est réalisé par l'activité polymérase de la RT.

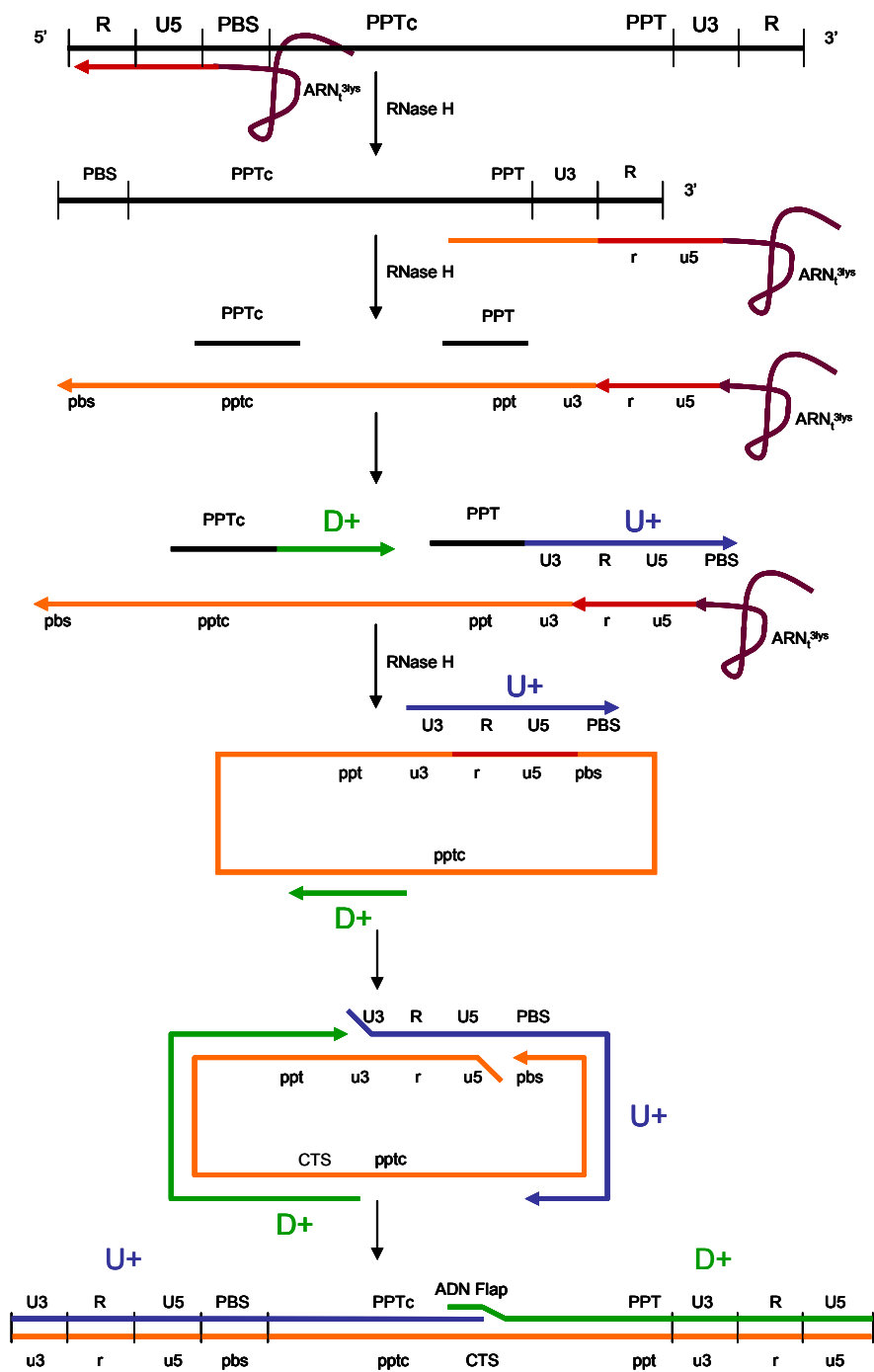


Figure 7 : Les étapes de la transcription inverse.

Dans certains cas, dans les lymphocytes T CD4+, la transcription inverse n'a pas lieu correctement du fait de la présence d'un stock insuffisant de nucléotides pour produire l'ADN viral ou bien du fait de la présence de la protéine APOBEC3G (Chiu et al., 2005). L'ARN du VIH-1 reste alors dans le cytoplasme jusqu'à sa dégradation ; mais il peut également être rétrotranscrit ultérieurement ce qui conduit à un phénomène de latence pré-intégrative de courte durée, due à la faible demie-vie des ARN viraux (une journée) (Pierson et al., 2002; Zhou et al., 2005).

5.1.2.2- La décapsidation.

La décapsidation serait le résultat d'un changement morphologique de la capsidie suite aux réarrangements du complexe de transcription inverse et de la formation de l'ADN flap qui marque la fin de la synthèse de l'ADN viral (Arhel et al., 2007).

5.1.3- Le transport nucléaire.

L'ADN double brin nouvellement formé est englobé dans un complexe multiprotéique, le complexe de préintégration (PIC) (figure 8). Cet ensemble est composé : de l'ADN double brin (ADNc flap) dont la zone flap semble indispensable à l'import (Arhel et al., 2006b; Arhel et al., 2006c), des protéines de la matrice (MA), de la nucléocapside, de l'intégrase (IN), de la transcriptase inverse (RT) et de la protéine Vpr (Miller et al., 1997).

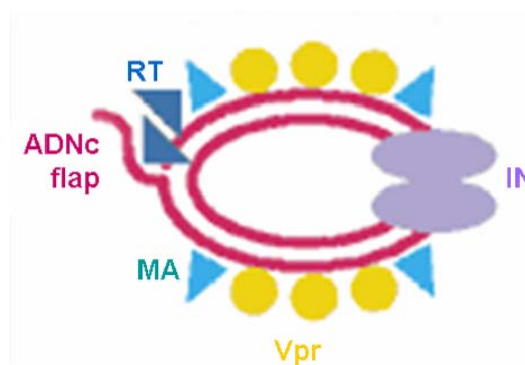


Figure 8 : Représentation schématique du PIC.

D'après (Greene and Peterlin, 2002) modifié.

Le PIC ou complexe de préintégration est composé : de l'ADN double brin (ADNc flap) dont, des protéines de la matrice (MA), de la nucléocapside, de l'intégrase (IN), de la transcriptase inverse (RT) et de la protéine Vpr. Il est nécessaire à l'entrée nucléaire et à l'intégration du génome viral dans la cellule hôte.

Lorsque les cellules sont en division, (par exemple, dans les lymphocytes T) l'étape de dissociation de la membrane nucléaire permet au complexe d'atteindre facilement l'ADN cellulaire (Lewis et al., 1992; Roe et al., 1993). En revanche dans le cas où les cellules ne sont pas en phase de division comme les macrophages, le passage de l'enveloppe pourrait se faire *via* les pores nucléaires actifs (Sherman et al., 2003). La protéine de matrice p17 semble lier l'importine- α grâce à ses séquences NLS (Bukrinsky and Adzhubei, 1999; Haffar et al., 2000), et l'importine- β dirigerait ensuite le complexe vers le noyau (Fassati et al., 2003; Gallay et al., 1996) (cf partie IV figure 47).

La protéine Vpr contient également des séquences NLS atypiques permettant de lier l'importine et de faciliter le transport nucléaire (Gallay et al., 1997; Gallay et al., 1996; Nitahara-Kasahara et al., 2007). Ainsi, dans le cas des cellules différenciées ou quiescentes, la protéine Vpr pourrait également contribuer à l'entrée du complexe de préintégration dans le noyau en provoquant des cassures de l'enveloppe nucléaire (de Noronha et al., 2001).

Le rôle de Vpr au cours des différentes phases du cycle viral fera l'objet d'une partie détaillée par la suite (cf IV).

5.1.4- L'intégration au génome de la cellule hôte.

La première étape nécessaire à l'intégration du génome viral au sein de celui de la cellule hôte a lieu dans le cytoplasme, avant le transport nucléaire : l'intégrase va supprimer le dinucléotide GT situé en 3' du LTR sur les deux brins d'ADNc néosynthétisés (figure 9a) (Farnet and Haseltine, 1990). Dans un deuxième temps, une réaction de transestérification (figure 9b) va provoquer d'une part la liaison de groupements OH en 3' à la place des nucléotides supprimés et d'autre part l'insertion de l'ADN viral dans le génome *via* une attaque nucléophile (figure 9c) du --CA-OH 3' sur une liaison phosphodiester du brin d'ADN cellulaire (Van Maele et al., 2006). Une dernière étape consiste en la réparation de l'ADN au niveau des zones d'insertion pour ajouter les nucléotides manquants, suite à l'attaque nucléophile de l'ADN cellulaire (figure 9d).

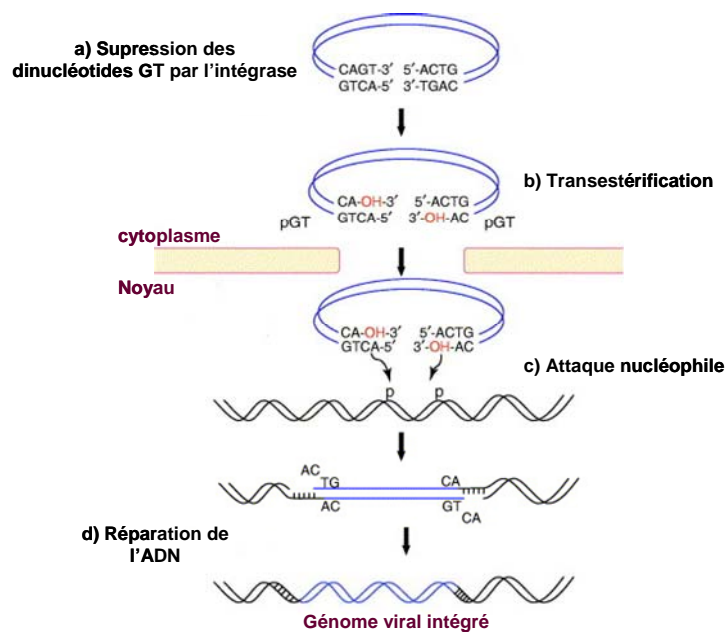


Figure 9 : Le mécanisme d'intégration du génome viral au génome cellulaire.

D'après (Van Maele et al., 2006) modifié.

Après linéarisation du génome viral l'intégrase permet suite à une attaque nucléophile d'intégrer la séquence d'ADN double brin viral à celui de la cellule hôte ; il pourra ainsi être régulé et exprimé comme tous les autres gènes cellulaires.

De plus, l'intervention de facteurs cellulaires qui sont déjà présents dans le PIC, tels que HMG-I(Y) (Farnet and Bushman, 1997), BAF (barrier to autointegration) (Lin and Engelman, 2003) et LEDGF (Lens-epithelium-derived growth factor, p75) (Cherepanov et al., 2003; Pandey et al., 2007; Raghavendra and Engelman, 2007; Shun et al., 2007) est nécessaire pour faciliter l'intégration, mais leurs rôles exacts sont encore mal connus.

L'insertion ne se fait pas complètement au hasard. En effet, il a été montré que le virus pouvait potentiellement s'intégrer dans 524 sites qui sont pour la plupart

transcriptionnellement actifs, et plus particulièrement dans des zones dont la transcription est stimulée par le VIH-1. Cela a pour effet d'induire une transcription importante des gènes du VIH-1 et donc de favoriser la production de nouvelles particules virales (Scherdin et al., 1990; Schroder et al., 2002). Cependant, l'intégration peut également se faire dans l'hétérochromatine, transcriptionnellement inactive (Jordan et al., 2003).

On peut observer l'apparition d'un phénomène de latence post-intégrative du virus résultant soit de l'environnement hétérochromatinien de son site d'intégration, soit de modifications post intégratives de celui-ci conduisant à son inactivation transcriptionnelle (pour revue (Williams and Greene, 2007)). Les cellules ainsi infectées ne produisent pas de particules virales, elles sont donc inaccessibles aux thérapies actuelles et constituent un réservoir pour le virus (Chun et al., 1997b; Finzi et al., 1997; Wong et al., 1997).

Par ailleurs, une partie des ADN dans le noyau ne s'intègrent pas dans le génome de la cellule hôte. Il y a alors trois possibilités (figure 5, étape 10):

- soit, les deux brins d'ADN viraux se lient ensemble et se circularise, on obtient dans ce cas un ADN circulaire avec deux séquences LTR,
- soit, il se passe un phénomène de recombinaison homologue et on obtient un ADN circulaire avec une seule séquence LTR (De Silva et al., 2001),

Il semblerait que ces deux formes du génome viral soient à l'origine de la transcription des gènes *tat* et *nef* dans les lymphocytes T CD4+ quiescents (Wu and Marsh, 2001).

- soit, l'ADN reste sous forme linéaire dans le cytoplasme car la cellule ne possède pas assez d'ATP pour permettre la translocation du PIC (Stevenson et al., 1990; Wu, 2004). On assiste alors, à un phénomène de latence pré-intégrative (Marcello, 2006).

5.2- La phase post-intégrative.

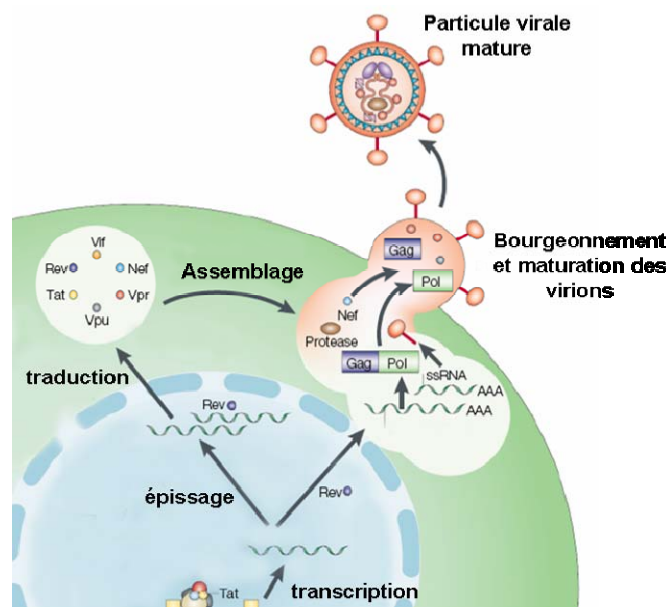


Figure 10 : Le cycle viral de l'intégration à la production des nouveaux virions.

D'après (Peterlin and Trono, 2003) modifié.

Un fois le génome viral intégré, il est transcrit et traduit grâce à la machinerie cellulaire. Les nouvelles particules virales sont assemblées et libérées par bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique. Les virions sont ensuite maturés grâce à la protéase virale encapsidée.

5.2.1- La transcription des gènes viraux.

Le génome viral est intégré de façon stable au sein de la cellule hôte et peut être exprimé grâce à la machinerie transcriptionnelle cellulaire comme tous les autres gènes.

L'étape de transcription se déroule en deux phases. Dans un premier temps, celle-ci est sous le contrôle de facteurs cellulaires uniquement, puis dans un deuxième temps, le facteur viral Tat vient transactiver le phénomène.

Le transcrite primaire obtenu va alors servir soit d'ARN messager après diverses étapes d'excisions et d'épissages, ou bien d'ARN génomique qui sera intégré dans les nouvelles particules virales formées (figure 10).

Les détails des mécanismes mis en jeu dans la régulation de la transcription du VIH-1 seront détaillés dans une partie spécifique.

5.2.2- La production des nouveaux virions.

5.2.2.1- *L'assemblage et le bourgeonnement.*

Le précurseur Gag-p55 est primordial pour l'assemblage des nouveaux virions. Il va permettre le recrutement de tous les acteurs impliqués dans ce phénomène. Il contient trois domaines fonctionnels (figure 11) qui vont régir les différentes étapes de l'assemblage et du bourgeonnement (Bukrinskaya, 2004).

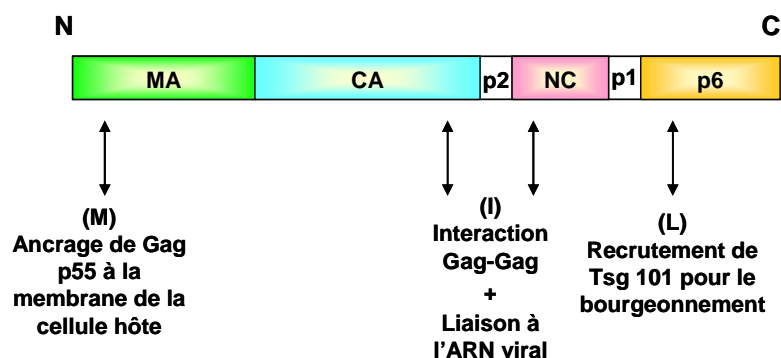


Figure 11 : Structure et rôle des différents produits du précurseur Gag-p55.

D'après (Bukrinskaya, 2004) modifié.

MA=Matrice, CA=Capside, NC=Nucléocapside, p=peptide

Le domaine (M) : Myristoylé, ce groupement va permettre l'ancrage du précurseur à la bicouche lipidique de la membrane de la cellule hôte.

Le domaine (I) : Ce domaine permet la multimérisation de Gag et la liaison de l'ARN viral *via* ces deux motifs en doigt de zinc (Sandefur et al., 2000).

Le domaine (L) : Il aide au détachement des virions néoformés de la surface cellulaire en recrutant la protéine cellulaire Tsg 101 (Freed, 2003).

Lors de l'assemblage, plusieurs phénomènes faisant intervenir ces différents domaines vont avoir lieu de façon simultanée :

- 1) la multimérisation des précurseurs Gag - p55 (Burniston et al., 1999),
- 2) la liaison de l'ARN viral aux complexes Gag-p55 qui va le transporter à la membrane pour encapsidation *via* probablement une interaction avec le cytosquelette cellulaire (Bukrinskaya et al., 1998),
- 3) la formation de complexes Gag/Gag-Pol,
- 4) la formation d'un complexe de préassemblage contenant Vif (Simon et al., 1999), Vpr (Muller et al., 2000) et les protéines cellulaires : HP68 (ATP binding protein) fourni l'énergie nécessaire au phénomène, APOBEC 3G (Zennou et al., 2004) et Tsg 101 (Goff et al., 2003),
- 5) le transport du complexe de préassemblage au niveau des radeaux lipidiques de la membrane plasmique (Campbell et al., 2001; Nguyen and Hildreth, 2000) ou bien au niveau de la membranes des corps multivésiculaires dans les macrophages (Nydegger et al., 2003).

A la fin de l'étape d'assemblage, les virions immatures bourgeonnent au niveau de la membrane plasmique ou sont libérés suite à la fusion des endosomes (MVB) grâce à la machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) recrutée par Gag-p55 (Gould et al., 2003), (Langelier et al., 2006). Ils vont alors faire l'objet d'une étape de maturation.

5.2.2.2- La maturation des virions.

C'est l'étape primordiale qui rend les virus infectieux. Elle fait intervenir les protéases virales qui vont cliver les précurseurs protéiques (Kaplan et al., 1994). Les précurseurs Gag-p55 sont disposés de façon radiale (figure 12), avec l'extrémité N terminale dirigée vers l'extérieur de la particule virale. Après clivages successifs, les protéines de matrice forment l'enveloppe externe du virus, et les protéines de capsid se condensent pour former la capsid mature entourant la nucléocapside et l'ARN viral (von Schwedler et al., 1998). A ce stade, les virus sont matures et capables d'infecter d'autres cellules.

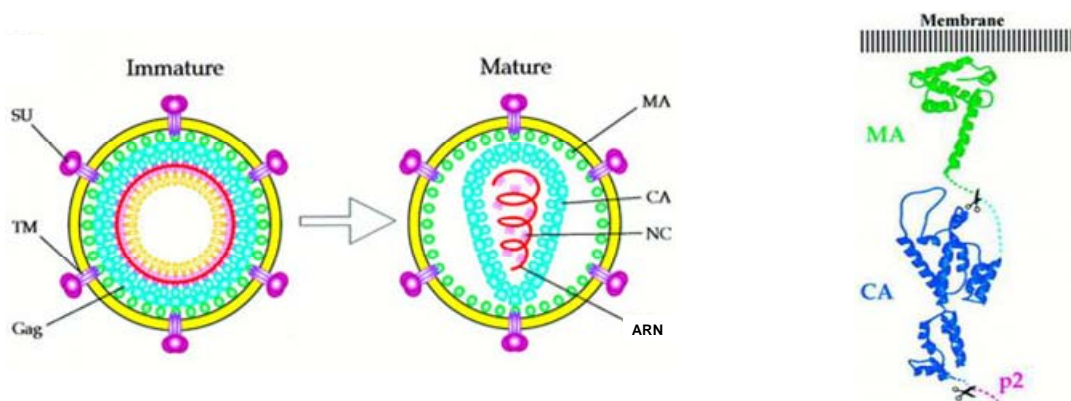


Figure 12 : La maturation des particules virales

D'après (von Schwedler et al., 1998)

Les précurseurs Gag-p55 sont disposés de façon radiale ; suite à l'action de la protéase virale, ils vont conduire à la formation de la matrice, de la capsid et de la nucléocapside permettant la maturation de la particule virale lui conférant ainsi tout son caractère infectieux.

II - La pathogenèse virale

1- Les différentes voies d'entrée du virus dans l'organisme.

1.1- La transmission par voie sexuelle.

Elle représente de 70 à 80 % des cas et concerne aussi bien les couples homosexuels qu'hétérosexuels (Royce et al., 1997). Le VIH peut pénétrer au sein des tissus par l'intermédiaire de brèches ou de tissus inflammés. Il pourrait de cette façon traverser les tissus épithéliaux de l'anus ou du vagin lors des contacts sexuels pour ensuite se propager dans le reste de l'organisme.

1.2- La transmission par le sang.

On peut distinguer trois cas de figure : la contamination des toxicomanes lors de l'échange de seringues, la contamination accidentelle des professionnels par contact avec des produits sanguins ou des objets contaminés, et enfin la contamination lors de transfusion sanguine. Le dépistage systématique des dons du sang rendent cette troisième possibilité quasi impossible (risque résiduel de 1/ 500 000).

1.3- La transmission materno-foetale.

Environ 20% des femmes porteuses du VIH, transmettent le virus à leur enfant. On observe également que plus la charge virale de la mère est importante et plus le risque augmente. Il existe trois moments clés dans la vie du futur enfant au cours desquels les risques de transmission mère enfant sont maximums.

- In utero (Vidricaire and Tremblay, 2004): Au cours de la grossesse on observe des microlésions de la barrière placentaire ainsi que son amincissement, ce qui va favoriser le passage de cellules infectées et de virus libres (figure 13A-B) de la circulation maternelle à la circulation foetale pour infecter les cellules sous jacentes (les lymphocytes et macrophages). Le passage peut se faire soit par l'intermédiaire de l'infection productive des trophoblastes et le relargage de nouveaux virions dans la circulation foetale (figure 13C-D), soit par transcytose (figure 13E-F).

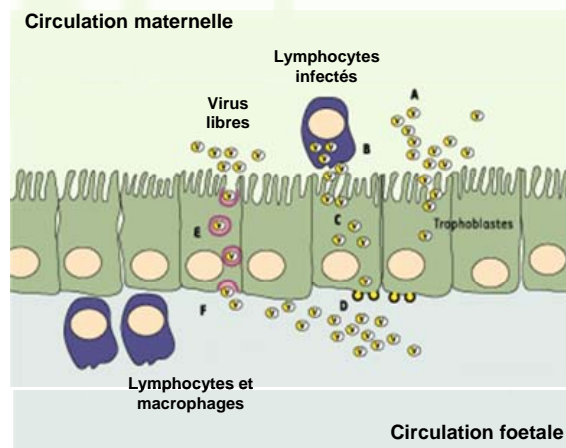


Figure 13 : les mécanismes de transmission du VIH in utero.

D'après (Vidricaire and Tremblay, 2004) modifié.

Au sein de l'utérus, le fœtus est en contact avec la circulation maternelle et donc avec les virus et les cellules infectées qui y circulent. On peut assister au passage de virus libre au travers de la barrière placentaire ou de cellules infectées.

- Pendant l'accouchement : le bébé entre en contact avec les sécrétions vaginales et le sang maternel contaminé lors du passage du canal utérin. Le risque de contamination peut être divisé par deux si l'accouchement est réalisé par césarienne avant le début du travail (1999a) (pour revue (Jamieson et al., 2007).

- Lors de l'allaitement.

La possibilité de la transmission du VIH de la mère à l'enfant a été mise en évidence dès la fin des années 80 mais les mécanismes réels de l'infection restent encore incertains. Le virus est présent dans le lait maternel à l'état libre et au sein de cellules infectées (Nduati et al., 1995; Ruff et al., 1994; Van de Perre et al., 1993). Lors de l'ingestion du lait maternel, les muqueuses internes du nourrisson entrent en contact avec le virus qui peut pénétrer dans son organisme *via* des lésions de la muqueuse intestinale, ou par transcytose dans des cellules possédant les récepteurs spécifiques nécessaires (cellules M², entérocytes). Les amygdales, qui contiennent également des cellules M, peuvent constituer de la même façon une porte d'entrée pour le virus (John-Stewart et al., 2004).

²Les cellules M, ou cellules informatives sont les portes d'entrée essentielles des antigènes dans le système muqueux (exemple : cellules indifférenciées des plaques de Peyer). Il en existe le long du tube digestif, et probablement dans la sphère ORL. Dans le tube digestif, les cellules M s'identifient grâce à l'accumulation de leucocytes près de leur pôle basal. Pourvues de CMH de classe II, d'enzymes, de glycocalyx, elles accrochent beaucoup de glucides à leur surface. Ceux-ci captent des antigènes qui pénètrent par pinocytose dans la cellule M et migrent vers la face basale où ils entrent en contact avec les cellules immunocompétentes (LB, LT, macrophages, cellules dendritiques).

2- Les cibles cellulaires.

Une fois les barrières franchies, le processus de dissémination au sein de l'organisme de la personne infectée va toujours suivre le même cheminement (figure 14). Le virus va attaquer différents types cellulaires du système immunitaire et du système nerveux pour affaiblir l'organisme et s'installer de façon profonde.

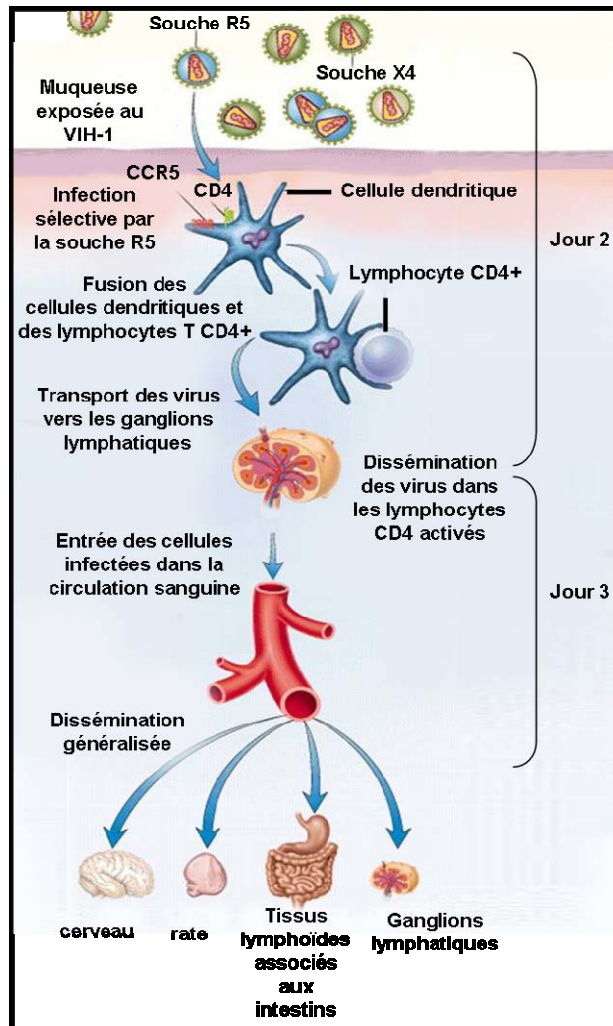


Figure 14 : Les différentes étapes de la propagation du virus dans l'organisme.

D'après (Kahn and Walker, 1998) modifié.

Le processus général de dissémination du virus au sein de l'organisme est similaire d'un individu à un autre et va permettre à l'infection de se propager rapidement.

2.1- Le système immunitaire.

Le système immunitaire constitue la première cible du VIH-1 dans l'organisme et va conduire à son affaiblissement jusqu'à ce qu'il ne soit plus capable de faire face aux attaques des pathogènes.

2.1.1- Les cellules dendritiques.

Ce sont les activateurs de la réponse immunitaire. A l'état immature, elles capturent et digèrent les antigènes dans les tissus périphériques et génèrent des peptides. Ces cellules se transforment en cellules matures et migrent dans les organes lymphoïdes, où elles vont présenter ces peptides antigéniques aux lymphocytes T CD4 (Steinman, 2003). Elles expriment peu de récepteurs et corécepteurs nécessaires à l'infection productive (Kawamura et al., 2003; Patterson et al., 2001), mais elles possèdent toutefois d'autres récepteurs capables de lier le VIH-1 tels que DC-SIGN (pour revue (Wu and KewalRamani, 2006)).

Les cellules dendritiques immatures permettent la dissémination du virus dans tout l'organisme et jouent un rôle crucial dans l'étape de primo-infection (Turville et al., 2002). En effet, elles sont capables, *in vitro*, de capter les virions *via* des récepteurs DC-SIGN et de les internaliser dans des vésicules d'endocytose (figure 15). Une partie de ces virions peuvent ne pas être dégradée dans les endosomes, permettant leur libération lors de la fusion des vésicules à la membrane plasmique. (Wiley and Gummuluru, 2006). Lors du passage dans les organes lymphoïdes, les lymphocytes forment des synapses immunologiques par lesquelles les virions libérés vont pouvoir les infecter (McDonald et al., 2003) : on parle de phénomène de trans-infection (Turville et al., 2004).

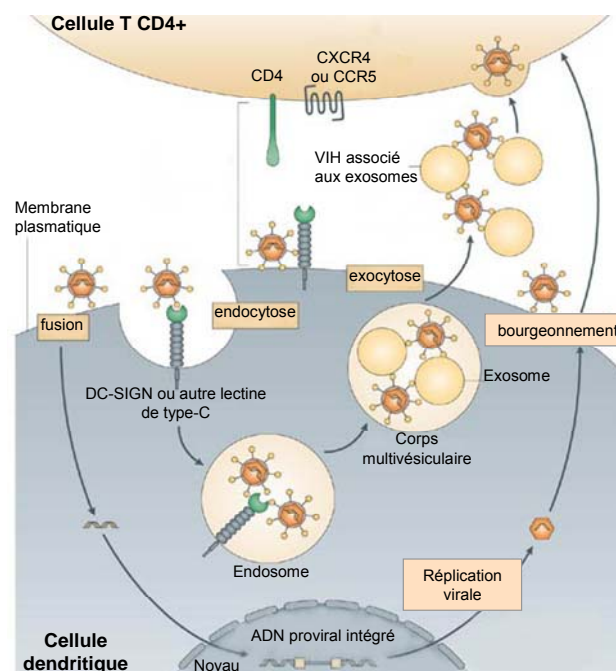


Figure 15 : L'infection des cellules dendritiques.

D'après (Wu and KewalRamani, 2006) modifié.

Les cellules dendritiques peuvent, soit être infectées de façon productive, soit intégrer les virus grâce aux récepteur DC-SIGN dans des vésicules, de façon à les propager plus facilement aux lymphocytes T CD4+ qui viennent interagir avec elles.

Dans les cellules dendritiques matures, l'efficacité de transmission du virus aux cellules T est augmentée *via* une augmentation de l'interaction entre les cellules et un plus grand nombre de virions intacts dans les vésicules (Frank et al., 2002). Par contre, ces cellules sont dix à cent fois moins productives que les cellules immatures (Granelli-Piperno et al., 1998). Une étude montre que cette diminution de capacité à la réplication des cellules matures ne provient pas d'une modification de la transcription inverse, ni de l'import nucléaire et de l'intégration, mais ils observent un blocage post-intégrationnel de la transcription virale (Bakri et al., 2001).

2.1.2- Les lymphocytes .

2.1.2.1- *Les lymphocytes T CD4⁺*.

Ils sont la principale cible du virus. Ils présentent à leur surface les récepteurs CD4 (Maddon et al., 1986) et corécepteurs (Baggiolini et al., 1997) nécessaires à la fusion de la membrane virale avec la membrane cellulaire conduisant à une infection productive.

On peut différencier deux grands types de lymphocytes T CD4+, qui ont des sensibilités différentes face au virus (Uittenbogaart et al., 1996) (pour revue (Stevenson, 2003)).

- Les lymphocytes T CD4+ activés.

Les lymphocytes naïfs issus du thymus, vont être activés suite à leur contact avec un antigène et des cytokines pro-inflammatoires, conduisant à leur prolifération (figure 16a). Ils expriment à leur surface les récepteurs CD4 et les corécepteurs CXCR4 et CCR5 (Loetscher et al., 1998) nécessaires à leur infection. Ils présentent une réplication virale rapide et importante qui va conduire à leur mort du fait des effets cytotoxiques. Une petite partie de ces lymphocytes peuvent passer à un état de latence post-intégrative après une période de production virale, puis être réactivé plus tard (Arlen et al., 2006; Han et al., 2007).

- Les lymphocytes T CD4+ quiescents.

Les cellules naïves sont à l'état quiescent c'est-à-dire en phase G0 du cycle cellulaire ainsi que les cellules activées de type mémoire (figure 16c). Ils constituent la population majoritaire chez l'adulte et vont servir de réservoir au virus intégré (Schnittman et al., 1989). On observe également une latence pré intégrationnelle *via* le blocage du cycle viral au niveau de l'étape de transcription inverse ou de l'intégration (Zack et al., 1990). Dans ce type cellulaire la production virale est très faible, et ce même après la levée de la

latence par la protéine Nef en activant les cascades Ras/MAPKinase (passage en phase G1) (Fujinaga et al., 1995; Tobiume et al., 2002). Les cellules, infectées de façon latente, pourraient également être réactivées par la présence de protéines Vpr secrétées par les cellules environnantes (Levy et al., 1995).

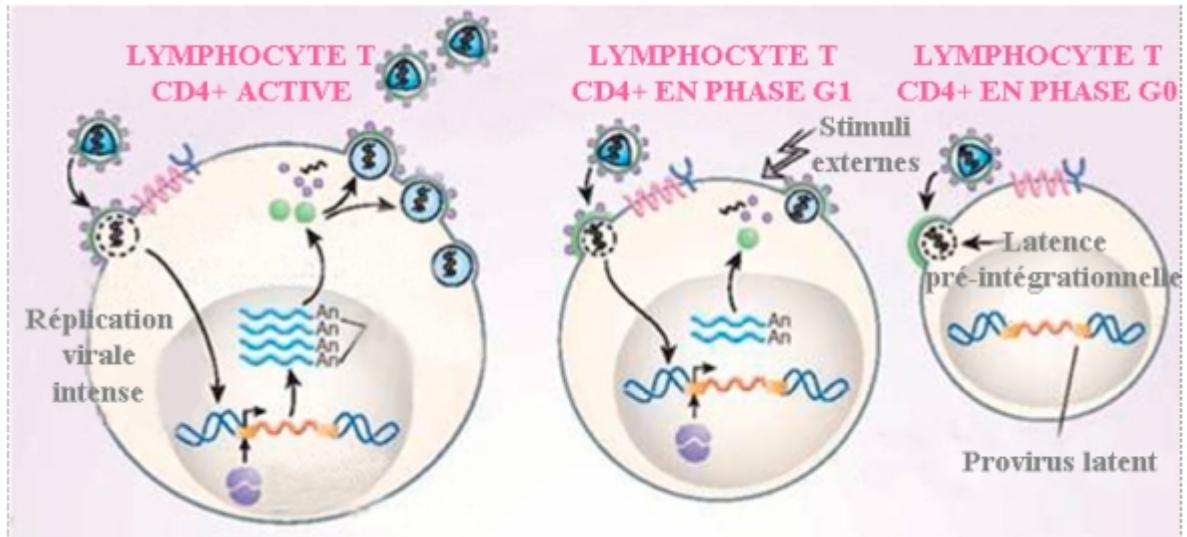


Figure 16 : L'infection des lymphocytes CD4+.

D'après (Stevenson, 2003) modifié.

L'infection des lymphocytes T CD4+ peut conduire, soit à une infection productive, soit à une latence pré ou post-intégrative suivant leur état d'activation.

2.1.2.2- Les lymphocytes T CD8+.

Le taux plasmatique de lymphocytes T CD8+ augmente fortement au cours des premières semaines suivant la contamination parallèlement à la chute de celui des lymphocytes CD4+ (Miedema et al., 1990). Ils constituent la réponse immunitaire initiale de l'organisme face aux antigènes viraux (Koup et al., 1994). Lorsque les Lymphocytes T cytotoxiques (CTL) reconnaissent un antigène viral sur une cellule soit, ils libèrent de la perforine qui provoque l'explosion de la cellule par un afflux d'eau ou utilise la voie non sécrétrice Fas-Fasligand pour induire la mort des cellules. Généralement, le VIH-1 infecte peu ces cellules. Toutefois, quelques études ont montré l'apparition de souches virales, chez des personnes séropositives, utilisant le CD8 comme récepteur et le CXCR4 comme corécepteur (Livingstone et al., 1996; Zerhouni et al., 2004)

2.1.2.3- Les lymphocytes B.

Les lymphocytes B sont les cellules responsables de la production des anticorps. Ils expriment peu de CXCR4 et aucun CD4 (De Silva et al., 2001). Certaines études

indiquent que le VIH-1 entre dans ces cellules, mais que l'ADN viral demeure non intégré (De Silva et al., 2001; Moir et al., 2000).

2.1.3- Les monocytes/macrophages.

Ils présentent à leur surface les récepteurs CD4 et les corécepteurs CCR5 et CXCR4 ainsi que d'autres récepteurs (Gal Cer, héparane sulfate, DC-SIGN...) permettant la fusion des particules virales, menant à une infection productive (Chehimi et al., 2003; Nehete et al., 2002; Valentin et al., 2000; Vives et al., 2005). De plus ces cellules sont infectables via un phénomène de macropinocytose ne faisant intervenir aucun des récepteurs et corécepteurs exprimés (Amyere et al., 2002); une partie des virions endocytosés ne sont pas dégradés par les endosomes et conduisent à une infection productive en fusionnant au niveau de leurs membranes (Marechal et al., 2001) (figure 17).

Par ailleurs, lors du cycle viral, les macrophages étant incapables de se diviser, le virus ne peut pas profiter de la déstabilisation de la membrane nucléaire lors de la division cellulaire afin d'atteindre l'ADN et s'y intégrer. Le virus pénètre dans le noyau grâce au PIC (complexe de préintégration) et à l'intervention de la protéine Vpr (Gallay et al., 1997). De plus, ces cellules présentent également une autre particularité : l'assemblage n'a pas lieu au niveau de la membrane plasmique mais à la surface de vésicules cytoplasmiques similaires à des endosomes, les corps multivésiculaires (MVB) (Kramer et al., 2005; Orenstein et al., 1988). Le virus pouvant alors, soit être libéré, dégradé ou bien resté dans le cytoplasme, et constituant alors un réservoir viral (figure 17) (Chun et al., 1997a).

Du fait de leur capacité migratoire, les monocytes et les macrophages vont permettre la dissémination du virus dans l'organisme et en particulier dans les organes non lymphoïdes, comme le système nerveux central (Finzi et al., 1997; Koenig et al., 1986). Les macrophages fixent à leur surface les particules virales grâce aux récepteurs du mannose ; ils vont ainsi pouvoir transmettre les virions aux lymphocytes T (Nguyen and Hildreth, 2003).

L'infection de ces cellules, à la différence des lymphocytes T CD4+, n'entraîne pas leur mort car celles-ci sont moins sensibles aux effets cytopathogènes du virus (Schuitemaker et al., 1994). Toutefois, l'infection affecte les fonctions de présentation des antigènes et de destruction des pathogènes (pour revue (Kedzierska et al., 2003). De plus, leur infection augmentant leur production de cytokines, elles vont ainsi alimenter l'inflammation chronique due à l'infection et endommager les tissus (Wahl et al., 1989;

Yeh et al., 2000). De même, au niveau du système nerveux central, les macrophages infiltrés vont libérer du glutamate (Jiang et al., 2001), de substances neurotoxiques, Ntox (Giulian et al., 1996), ainsi que des protéines virales telles que Tat (Nath, 2002) et Vpr (Sabbah and Roques, 2005) qui vont conduire à la mort neuronale.

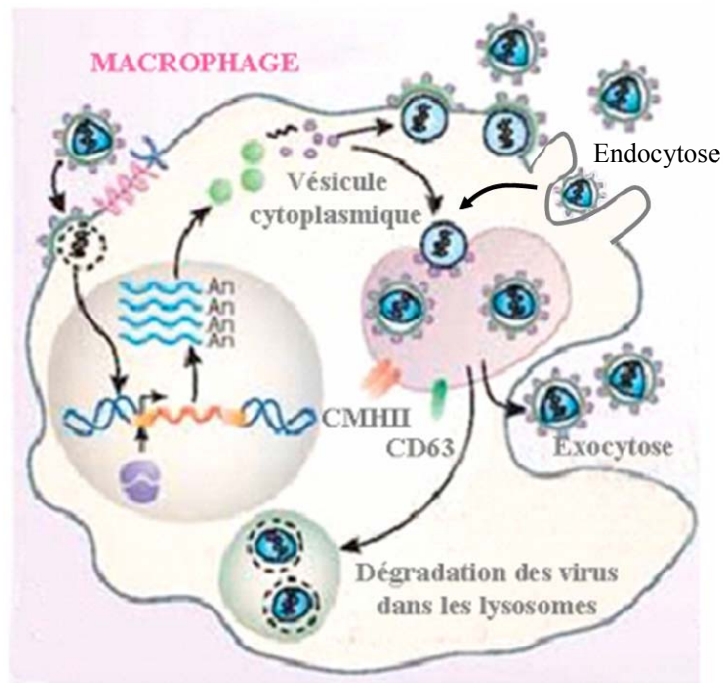


Figure 17 : L'infection des macrophages.

D'après (Stevenson, 2003) modifié.

Les macrophages infectés vont conduire à une réplication virale plus lente que les lymphocytes T CD4+ activés. Les particules virales produites présentent la particularité de ne pas fusionner au niveau de la membrane plasmique mais de s'accumuler dans des vésicules cytoplasmiques avant d'être libérées par exocytose dans le milieu extracellulaire.

2.2- Le système nerveux central.

Tous les patients présentent du virus dans le SNC dès les premières phases de l'infection. Le Système Nerveux Central constitue la deuxième grande cible du VIH, ainsi, 5 à 10% des patients atteints du SIDA présentent une symptomatologie clinique allant d'une altération progressive des fonctions motrices et cognitives jusqu'à la paralysie et la démence (pour revue (Moulinier, 2006)). Ces manifestations neurologiques sont regroupées sous l'appellation de « démence associée au VIH-1 » (Janssen et al., 1992).

Les thérapies antirétrovirales (HAART) actuelles passant très faiblement la barrière hémato-encéphalique (Staprans et al., 1999; Taylor and Pereira, 2000), le virus peut s'accumuler dans le SNC, qui sert ainsi de réservoir (Barber et al., 2006).

2.2.1- L'entrée du VIH-1 dans le SNC.

Malgré une apparition tardive des complications neurologiques, l'infection du SNC a lieu très précocément au cours de la séroconversion. En effet, une étude a montré la présence du virus dans le cerveau d'un patient le lendemain de la séroconversion, soit quinze jours après la primo-infection (Davis et al., 1992). L'entrée dans le SNC nécessite le passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE) par le VIH.

Différents mécanismes de passage ont pu être mis en évidence (Figure 17) :

- Par infiltration des monocytes (Langford et al., 2003) et lymphocytes (Couraud, 1994) infectés (figure 18a). Les monocytes et les lymphocytes infectés sont capables d'entrer en contact avec les cellules endothéliales qui composent la BHE *via* des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1...). Cette interaction déstabilise les jonctions serrées et permet le passage des cellules infectées entre les cellules endothéliales. Une fois dans le système nerveux central, elles vont relarguer des particules virales qui pourront à leur tour infecter les cellules environnantes.

- Par endocytose des virus libres (figure 18b). C'est la protéine gp120 qui, en se liant aux cellules endothéliales de la BHE, va permettre au virus de traverser par un mécanisme de transcytose (Banks et al., 2001; Banks et al., 1997).

- Par passage de virus libres entre les cellules endothéliales. (figure 18c)

- Par macropinocytose des virus libres (figure 18d). Les monocytes et macrophages infectés produisent des facteurs de croissance et des agents promoteurs de tumeurs qui vont pouvoir induire de façon temporaire la formation de protrusions membranaires au niveau des cellules endothéliales de la BHE. La membrane se referme ensuite vers la membrane plasmique de la cellule, générant ainsi de grosses vésicules contenant de grandes quantités de fluide extracellulaire infecté par le VIH-1. La majorité de ces vésicules vont fusionner avec les lysosomes où les virus internalisés vont être dégradés. Cependant, certaines vésicules ne fusionnent pas avec les lysosomes et traversent les cellules endothéliales pour relarguer leur contenu dans le SNC (Liu et al., 2002).

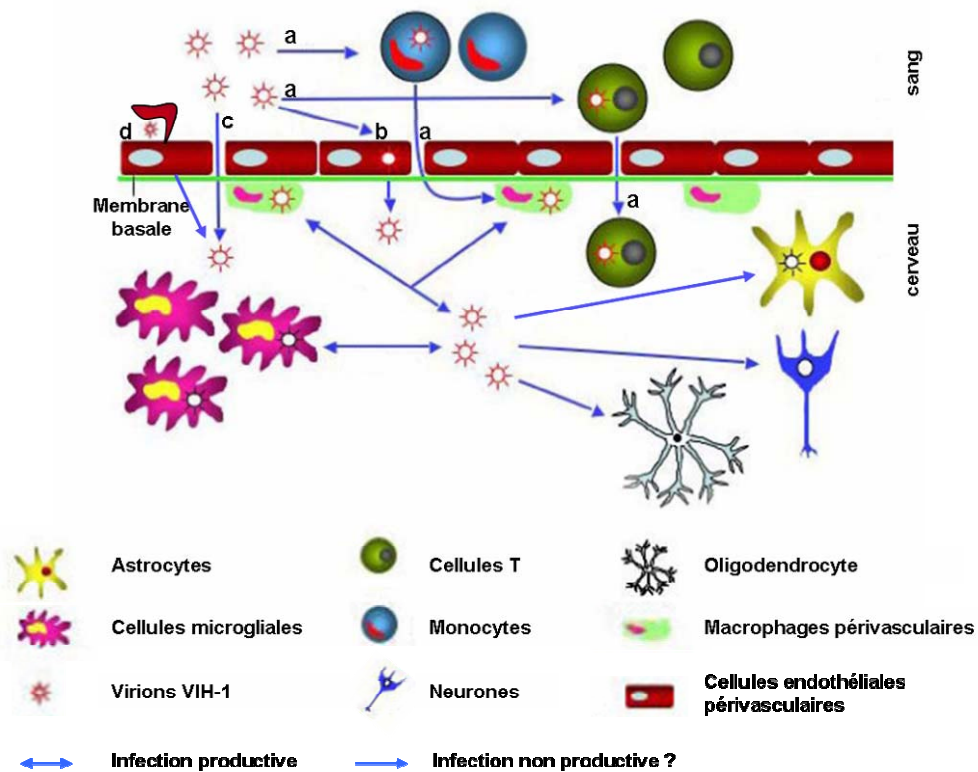


Figure 18 : Les modes de passage de la barrière hémato-encéphalique par le VIH.

D'après (Ghafouri et al., 2006) modifié.

Le VIH-1 infecte de façon très précoce le système nerveux central. L'infection peut se faire par différents mécanismes : a) par infiltration de lymphocytes ou monocytes infectés, b) par la transcytose de virus libre, c) par le passage de virus libre entre les cellules de la barrière hémato-encéphalique déstabilisée, d) par un mécanisme de macropinocytose. Les virus ayant ainsi atteint le système nerveux central vont pouvoir attaquer de façon directe ou indirecte les différents types cellulaires présents.

2.2.2- Les cibles cellulaires.

Une fois entrée dans le SNC le virus va pouvoir interagir avec différents types cellulaires conduisant à une production virale ou tout simplement à leur mort.

2.2.2.1- *Les cellules microgliales.*

Elles constituent les macrophages résidents et sont les principales cibles, avec les macrophages périvasculaires, d'une infection virale productive du système nerveux central (Brew et al., 1995; Lipton, 1994). Elles présentent en effet à leur surface les récepteurs CD4 et les corécepteurs CCR5, ainsi que d'autres corécepteurs (CCR2b,

CX3CR1...) nécessaires à la fusion des particules virales avec la membrane (He et al., 1997).

Du fait de leur longue durée de vie, et de leur faible sensibilité aux effets cytopathogènes du virus, elles sont un sanctuaire très peu accessible par les thérapies actuelles (Aweeka et al., 1999; Kim et al., 1998).

De plus, l'infection de ces cellules conduit à leur activation et ainsi à la production de diverses molécules (figure 19) telles que des cytokines, des neurotoxines, ainsi que des protéines virales (Tat, gp120) (Philippon et al., 1994) Ces molécules libérées vont agir sur les cellules environnantes et provoquer des effets neurotoxiques (Pour revue (Kaul et al., 2001).

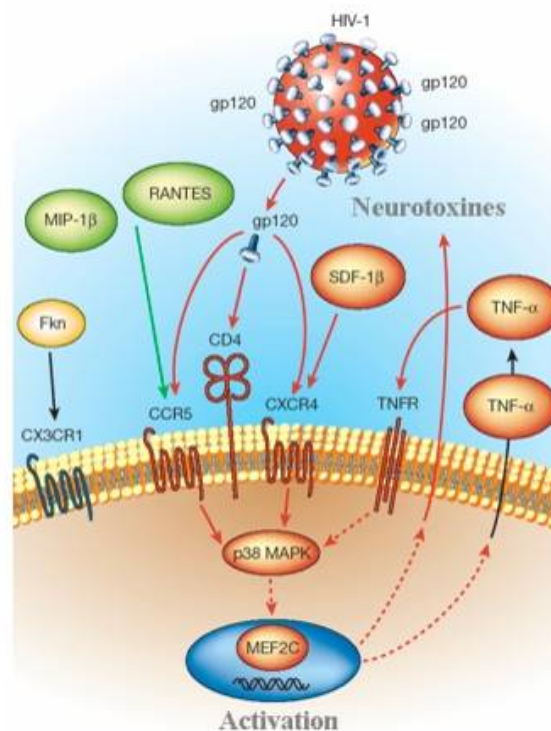


Figure 19 : Les effets du VIH sur les cellules microgliales.

D'après (Kaul et al., 2001) modifié.

Les cellules microgliales sont majoritairement infectées de façon productive par le virus, elles vont donc libérer des particules virales. Cependant, le virus ainsi que différents stimuli extérieurs conduisent à un dysfonctionnement de ces cellules qui vont produire des neurotoxines et des cytokines conduisant à la mort de cellules environnantes.

D'autre part, la présence des protéines virales gp120 et gp41 à la surface des cellules microgliales va induire la formation de cellules géantes multinucléées *via* leur interaction avec les récepteurs et corécepteurs viraux présents à la surface de cellules saines environnantes, qui vont ainsi fusionner avec les cellules infectées (Dickson, 1986; Sharer et al., 1985).

Par ailleurs, elles peuvent également constituer un réservoir de cellules transcriptionnellement latentes dans le système nerveux central (Barber et al., 2006).

2.2.2.2- *Les astrocytes.*

Ils sont présents dans la région périvasculaire et constituent 20% de la substance grise. Ils permettent le maintien de l'homéostasie du système nerveux central et participent à l'étanchéité de la barrière hémato-encéphalique grâce à leurs interactions avec les cellules endothéliales. Ils possèdent à leur surface des récepteurs capables de répondre à toutes les substances neuroactives et régulent le niveau de certains neurotransmetteurs tel que le glutamate. Les astrocytes modulent ainsi l'activité cellulaire et le transfert d'information entre les neurones (Pour revue (Bouzier-Sore et al., 2002; Perea and Araque, 2002).

Ces cellules ne présentent pas les récepteurs CD4 nécessaires à une infection virale productive (Sabri et al., 1999). Cependant, une infection faible a pu être mise en évidence, grâce à des expériences de microdissection laser sur des patients (Thompson et al., 2004). De plus, une étude a montré la possibilité d'une infection indépendante des récepteurs CD4 qui passerait par la liaison de la gp120 aux récepteur du mannose exprimés à la surface de ces cellules (Liu et al., 2004) et la présence d'ADN viral a également été observée suite à l'endocytose de particules virales *via* les récepteurs CCR5 et DC-SIGN (Deiva et al., 2006).

La faible production virale de ces cellules résulte d'un double effet : tout d'abord un blocage de l'entrée virale, et ensuite, un dysfonctionnement de la protéine virale Rev dans ces cellules, du fait du peu d'expression constitutive de la protéine cellulaire Sam68 indispensable au bon fonctionnement de celle-ci (Li et al., 2002b; Li et al., 2002c).

Par ailleurs, les effets du VIH-1 sur les astrocytes sont essentiellement dus à des phénomènes indirects résultant de l'infection des cellules microgliales. (Pour revue (Gorry et al., 2003) (figure 20). Suite à leur infection, les cellules microgliales activées, vont relarguer de nombreuses cytokines inflammatoires qui vont à leur tour activer les astrocytes. Ces derniers vont sécréter de fortes quantités de glutamate, provoquant une surstimulation des astrocytes *via* les récepteurs métaboliques au glutamate présents à leur surface. Ces phénomènes de surexcitation vont conduire à une excitotoxicité, aboutissant à des dommages cellulaires observés dans les cerveaux de patients infectés (Dong and Benveniste, 2001).

De plus, les effets de l'attaque du SNC par le VIH vont augmenter la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (qui n'est plus stabilisée par les astrocytes), facilitant

ainsi l'infiltration plus importante des monocytes infectés (Gonzalez-Scarano and Martin-Garcia, 2005; Kaul et al., 2001).

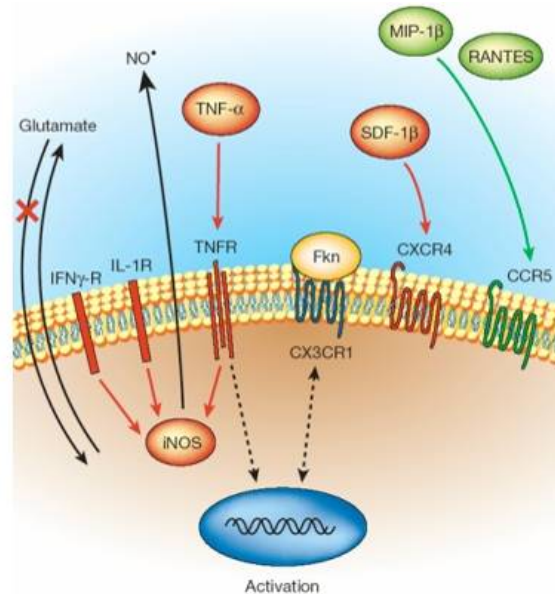


Figure 20 : Les effets de l'infection des astrocytes par le VIH.

D'après (Kaul et al., 2001) modifié.

Les astrocytes vont être déréglés par les différentes cytokines produites par les cellules microgliales infectées. Ils ne vont plus assurer leur fonction de recapture du glutamate extracellulaire provenant de l'activité neuronale. Le glutamate en s'accumulant va conduire à la mort neuronale par excitotoxicité.

2.2.2.3- Les oligodendrocytes.

Ils produisent la gaine de myéline entourant les axones, qui facilite la transmission de l'information au sein du système nerveux. Des études de PCR *in situ* ont permis de détecter une infection rare de ces cellules *in vivo* (Bagasra et al., 1996). *In vitro*, la fixation de la gp120 au galactosylcéramide ou autre protéoglycane présents à la surface des oligodendrocytes entraîne une diminution de la synthèse de myéline ainsi qu'une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et du nombre de cellules apoptotiques (Codazzi et al., 1995), favorisant par ce biais les effets neurotoxiques associés au VIH.

2.2.2.4- Les neurones.

Ils ne présentent pas de récepteurs CD4 à leur surface, mais les différents corécepteurs viraux ont été détectés sur leur membrane (Garcia et al., 2002; Lavi et al., 1998; van der Meer et al., 2000).

L'infection ou non des neurones par le VIH-1 est un sujet soumis à controverse, quelques études récentes ayant mis en évidence la présence d'ADN viral après des expériences de microdissection laser (Canto-Nogues et al., 2005; Trillo-Pazos et al., 2003). Mais si l'infection existe, il n'y a pas de production virale par les neurones ; Les effets cytopathogènes observés sont donc dus majoritairement à des effets indirects, dont le mécanisme fait intervenir les cellules microgliales infectées et les astrocytes (figure 21). Les cellules microgliales infectées libèrent des protéines virales (gp120, Tat) qui ont une activité neurotoxique (Haughey and Mattson, 2002; Keswani et al., 2003). En effet, plusieurs études ont montré que la mort neuronale était diminuée par addition d'anticorps anti-gp120 (Catani et al., 2000; Zhang et al., 2003) Les astrocytes environnants, sous l'effet de l'infection du SNC, vont libérer du glutamate ; étant donné qu'ils n'assurent plus la recapture, ce neurotransmetteur va s'accumuler dans le milieu extracellulaire et déclencher une hyperexcitation des cellules neuronales allant jusqu'à provoquer leur mort par excitotoxicité (pour revue voir (Kaul et al., 2001).

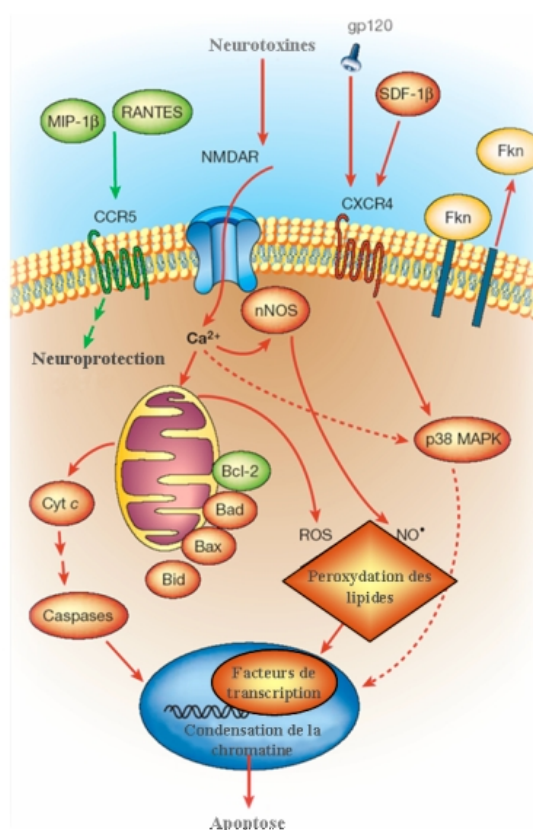


Figure 21 : Les effets de l'infection des neurones par le VIH.

D'après (Kaul et al., 2001) modifié.

Les neurones vont être en contact à la fois avec les neurotoxines et les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les cellules microgliales qui vont conduire à l'activation de l'apoptose

par la voie mitochondriale. De plus, le glutamate non recapté par les astrocytes provoque une surexitation des neurones qui finissent par en mourir.

De plus, la protéine Vpr sécrétée semble également jouer un rôle majeur dans la mort neuronale observée chez les sidéens. En effet, la mise en contact de neurones avec la protéine Vpr sécrétée conduit à un changement de la conductance ionique provoquant une perturbation du potentiel membranaire des neurones et à un déclenchement des voies apoptotiques (Patel et al., 2002; Sabbah and Roques, 2005). Elle peut également conduire à une perte de la perméabilité membranaire des mitochondries neuronales, induisant une augmentation intracellulaire de Cytochrome c responsable de l'activation de la caspase 9 et de l'apoptose du neurone (Jones et al., 2007). De même, en agissant sur le fonctionnement des mitochondries, Vpr peut inhiber la croissance axonale (Kitayama et al., 2008).

3- L'histoire de la maladie.

Une fois le virus au sein de l'organisme, ses effets et donc l'évolution de la maladie au fil du temps va se faire en plusieurs étapes (figure 22).

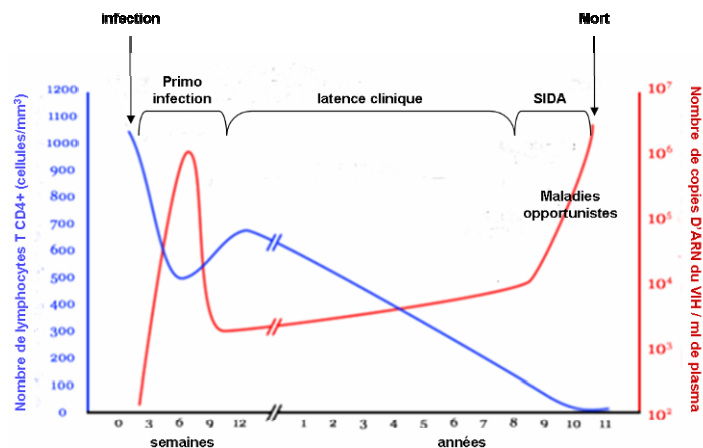


Figure 22 : Courbes moyennes d'évolution de la charge virale plasmatique et du taux de lymphocytes T CD4+ au cours du temps après l'infection.

D'après (Chen et al., 2005) modifié.

Au cours de l'infection le taux de lymphocytes T CD4+ est sujet à des variations qui vont caractériser les différentes phases de la maladie qui sont : la primo-infection, la phase de latence clinique et le stade SIDA.

3.1- La phase d'invasion virale ou primo-infection.

Elle correspond à la période entre l'infection de l'individu et l'apparition d'une réponse immunitaire spécifique contre le virus. Chez la plupart des personnes, elle se traduit classiquement par une symptomatologie de type grippal (fièvre, fatigue, maux de gorge, courbatures...), mais elle peut également être totalement asymptomatique et passer inaperçue (Schacker et al., 1996).

Pendant trois à six semaines, on observe une réplication très active du virus (jusqu'à 10 milliards de virus produits par jour) ce qui a pour effet une destruction massive des lymphocytes CD4⁺ (figure 22) (Rosenberg et al., 1997). Au cours de cette période les risques de transmission sexuelle sont accrus du fait de la présence d'un fort taux de particules virales produites au niveau des organes génitaux (Pilcher et al., 2001).

Entre une semaine et trois mois suivant l'infection, la réponse immunitaire de l'organisme se met en place. Les lymphocytes cytotoxiques CD8⁺ (CTL) et les CD4⁺ agissent sur les cellules infectées, alors que les lymphocytes B activés produisent des anticorps anti-VIH (Yang et al., 1997). Cette réaction permet de rétablir le taux de lymphocytes CD4⁺ et de faire baisser la charge virale jusqu'à un niveau résiduel, variable d'un individu à un autre (Mellors et al., 1996).

Parallèlement, les réservoirs viraux se mettent en place et vont permettre au virus de rester inaccessible aux défenses de l'organisme et aux thérapies ; il pourra ainsi réapparaître, à l'arrêt des thérapies, dans la circulation même lorsque la charge virale est devenue indétectable (Chun et al., 1998; Chun et al., 1997b; Finzi et al., 1997; Wong et al., 1997).

3.2- La phase de latence ou asymptomatique.

Elle correspond à un état de latence clinique totalement asymptomatique durant en moyenne de six à onze ans. Au cours de cette période, même si la réplication virale reste intense le renouvellement des LT CD4⁺ sains, permet au système immunitaire qui dégrade les virus produits parallèlement de maintenir l'organisme en bonne santé. Toutefois, la destruction progressive des cellules spécifiquement dirigées contre le VIH permettent la multiplication libre du virus et donc l'augmentation de la charge virale. Le virus prend ainsi petit à petit le dessus sur le système immunitaire jusqu'à le submerger (pour revue (Schwartz and Nair, 1999) (figure 22).

Chez 1 à 2 % des séropositifs mondiaux, cette phase peut être beaucoup plus longue (15-20 ans) : on parle alors de sujets asymptomatiques à long terme ou Long-Term Non-Progressor (ALT ou LNTP). Les causes réelles ne sont pas encore élucidées, mais il

semble que ces sujets présentent une réponse immunitaire plus active leurs permettant de maintenir leurs taux de cellules T stable plus longtemps (Lambotte et al., 2005; Lambotte and Delfraissy, 2006; Rodes et al., 2004).

3.3- Le stade SIDA.

Lorsque le taux de LT descend en dessous de 200 cellules/mm³ (figure22), le système immunitaire s'effondre et la virémie augmente rapidement. Les défenses de l'organisme n'arrivent plus à faire face aux microorganismes avec lequel il est en contact, et le sujet est confronté à des germes opportunistes tels que *Pneumocystis carini*, *Candida*; *Mycobacterium tuberculosis* et/ou des tumeurs tel que des lymphomes, le sarcome de Kaposi ...etc (pour revue voir(Fauci and Lane, 1985; Lloyd, 1996). Les organes lymphoïdes secondaires sont détruits, provoquant une immunodéficience sévère, certains sujets présentant même des syndromes de démence dus à la destruction des cellules neuronales. A terme, en l'absence de traitement, les maladies opportunistes conduisent à la mort du sujet dans les trois ans.

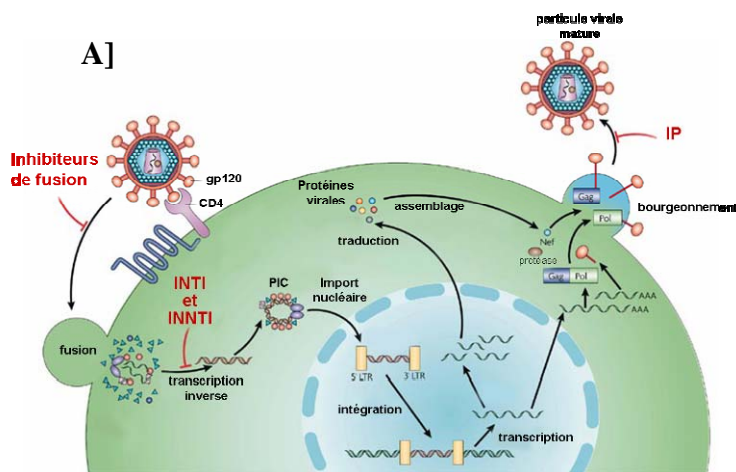
4- Les thérapies.

A l'heure actuelle, les traitements ne sont pas capables d'éradiquer totalement le virus de l'organisme du patient et peuvent uniquement ralentir la progression de la maladie en diminuant la quantité de virus présent dans l'organisme.

Les objectifs majeurs des thérapies actuelles sont donc :

- De maintenir en bonne santé le patient aussi longtemps que possible,
- D'améliorer sa qualité de vie,
- De prévenir l'apparition de virus résistants aux médicaments,
- D'améliorer les fonctions immunitaires,
- De limiter la transmission de la mère à l'enfant.

Il existe plusieurs types de traitements anti-rétroviraux agissant aux différentes étapes du cycle viral (figure 23).



B]

Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI)	Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTE)	Inhibiteurs de la protéase (IP)	Inhibiteurs de fusion
Zidovudine (AZT)	Efavirenz (EFV)	Ritonavir (RTV)	Enfuvirtide (T20)
Lamivudine (3TC)	Nevirapine (NVP)	Saquinavir (SQV)	Maraviroc
Emtricitabine (FTC)	Delavirdine (DLV)	Indinavir (IDV)	
Stavudine (d4T)		Nelfinavir (NFV)	
Didanosine (ddI)		Lopinavir (LPV)	
Tenofovir (TDF)		Atazanavir (ATV)	
Abacavir (ABV)		Darunavir (DRV)	
Zalcitabine (ddC)			

Figure 23 : Les thérapies anti VIH.

D'après. (Han et al., 2007) modifié

A] Les différentes cibles au cours du cycle viral. Les thérapies actuelles ciblent 3 étapes clés du cycle viral : l'entrée des particules virales dans la cellule, la transcription inverse du génome viral en ADN, et la maturation des nouvelles particules produites. **B]** Tableau récapitulatif des différentes molécules utilisées en thérapie.

4.1- Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

Ils ont pour objectif de bloquer le fonctionnement de la transcriptase inverse et ainsi d'empêcher la conversion de l'ARN viral en ADN intégrable au génome de la cellule hôte. Il en existe de deux types : les inhibiteurs nucléosidiques et les inhibiteurs non nucléosidiques (pour revue voir (Clavel and Hance, 2004))

4.1.1- Les Inhibiteurs Nucléosidiques (INTI)

Ce sont les premiers antiviraux mis sur le marché dès 1985. Ils sont actifs sur les VIH-1 et 2. Composés de synthèse, ils ressemblent aux nucléotides naturels qui s'associent pour former les molécules d'ADN. Sous l'action de la kinase cellulaire, les nucléotides sont transformés en nucléotides triphosphates et entrent en compétition avec les nucléotides cellulaires au site actif de la transcriptase virale. Une fois incorporés à la chaîne d'ADN en cours de synthèse, ils bloquent l'élongation de celle-ci car ils ne possèdent pas le groupement hydroxyle en position 3' du désoxyribose nécessaire à la liaison du nucléotide suivant (figure 24).

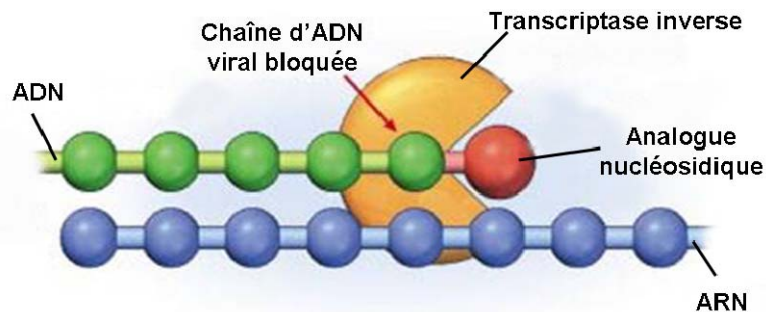


Figure 24 : Les mécanismes d'action des Inhibiteurs Nucléosidiques (INTI) .

D'après (Clavel and Hance, 2004) modifié.

Les analogues nucléosidiques se fixent au niveau du site catalytique de l'enzyme, ils sont transformés, incorporés à l'ADN en cours de synthèse et bloquent son élongation.

4.1.2- Les Inhibiteurs Non Nucléosidiques (INNTI)

Ils sont spécifiques de la transcriptase inverse du VIH-1. Ils se fixent sur les résidus amino-acides situés à proximité du site catalytique de l'enzyme, provoquant une modification de la structure du site et rendant ainsi l'enzyme inactive (figure 25).

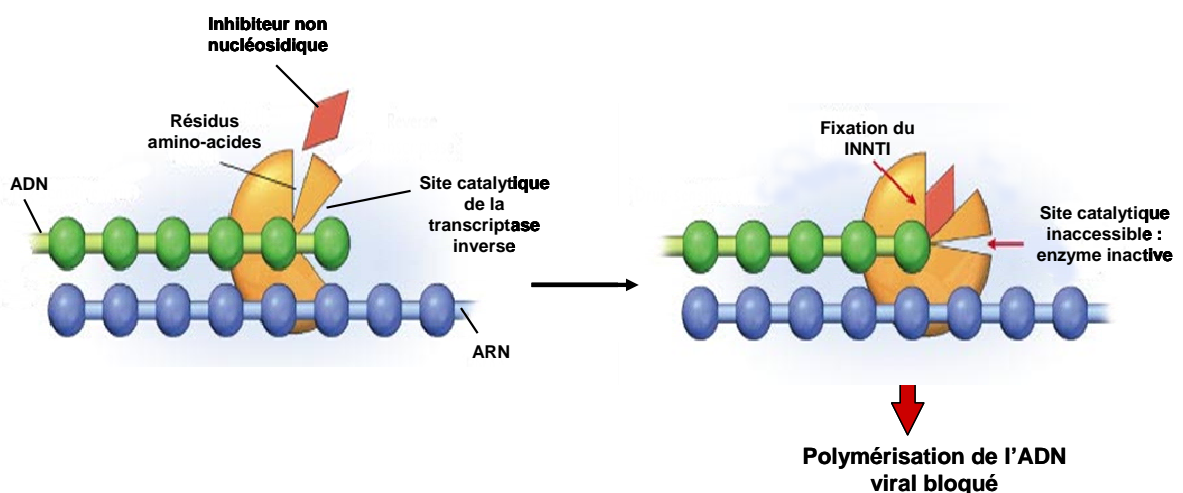


Figure 25 : Le mécanisme d'action des Inhibiteurs Non Nucléosidiques (INNTI).

D'après (Clavel and Hance, 2004) modifié.

Les inhibiteurs non nucléosidiques (en rouge) en se fixant à la transcriptase inverse (en jaune) rendent inaccessible le site catalytique de l'enzyme. La synthèse du brin d'ADN viral est stoppée.

4.2- Les inhibiteurs de la protéase.

Ils s'insèrent dans le site catalytique de l'enzyme et bloquent son activité protéolytique de façon sélective (figure 26). Les précurseurs viraux ne pouvant plus être maturés, les nouveaux virions ne sont plus produits ou sont non infectieux. On empêche ainsi l'infection de nouvelles cellules au sein de l'organisme (Pomerantz and Horn, 2003).

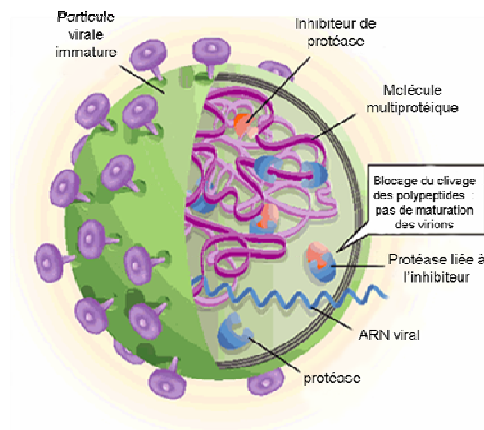


Figure 26 : Le mécanisme d'action des inhibiteurs de la protéase.

D'après (Pomerantz and Horn, 2003) modifié.

Les inhibiteurs de protéases (en rouge) bloquent le site catalytique de l'enzyme virale responsable de la maturation des virions. Les virions non maturés sont infectieux.

4.3- Les inhibiteurs de fusion.

Cette nouvelle classe d'antirétroviraux a, comme son nom l'indique, pour objectif de bloquer l'étape de fusion qui permet au virus d'infecter de nouvelles cellules (Pomerantz and Horn, 2003). Par exemple, le T-20 est un polypeptide qui se fixe à la gp41 et bloque son activité fusiogène (figure 27).

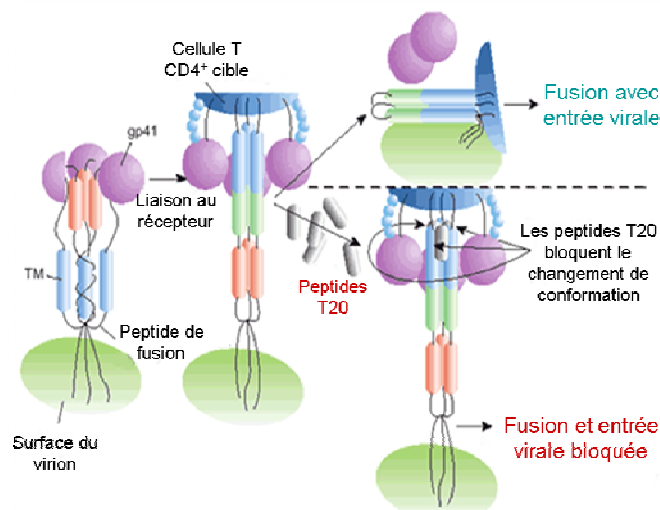


Figure 27 : Le mécanisme des inhibiteurs de fusion : exemple du T-20.

D'après (Pomerantz and Horn, 2003) modifié.

Le peptide T-20 (en gris) se fixe à la gp41 (en mauve) et bloque son changement de conformation nécessaire à la fusion.

4.4- Les traitements du futur.

Le VIH-1 est constamment en mutation et l'apparition de virus résistants aux traitements actuels encourage le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques (Cohen and Fauci, 2001). Ainsi, des inhibiteurs de l'intégrase et des techniques d'excision de l'ADN viral intégré (Sarkar et al., 2007) sont à l'étude afin de viser d'autres étapes du cycle viral et prévenir l'apparition des résistances. De plus, le ciblage par des ARN interférents des différentes protéines est également à l'étude pour bloquer la production de nouvelles particules dans les cellules infectées en induisant la dégradation des ARN viraux (Lieberman et al., 2003). De même, des ARN interférents ciblant les récepteurs viraux ont permis d'inhiber l'infection des cellules traitées (Anderson and Akkina, 2005; Li et al., 2005a), constituant une piste supplémentaire pour l'élaboration de nouvelles thérapies.

4.5- Les limites des traitements.

Cependant, du fait de l'apparition rapide de virus résistants à la molécule utilisée, le traitement par un seul agent anti-rétroviral n'est pas suffisant pour contrôler la maladie et induire une amélioration du statut immunitaire des malades. Il est donc nécessaire d'avoir recours à des multithérapies qui ont une efficacité beaucoup plus importante et durable grâce à l'action synergique des différents traitements combinés (Danner et al., 1995; Markowitz et al., 1995).

Ainsi, les trithérapies les plus couramment utilisées sont les suivantes :

- trois inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse,
- deux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse + un inhibiteur non nucléosidique,
- deux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse + un antiprotéase.

Lorsque ces combinaisons ne fonctionnent plus, on parle d'échappement thérapeutique et l'on utilise alors l'inhibiteur de fusion pour faire chuter la virémie des patients.

Par ailleurs, les trithérapies ne guérissent pas de l'infection mais permettent de faire chuter la concentration plasmatique virale en dessous du seuil de détection. En cas d'arrêt du traitement la charge virale réaugmente rapidement et le taux de CD4 chute. La réapparition du virus est due à la petite quantité de virus restant dans le sang mais surtout à la présence de réservoirs viraux qui se réactivent en l'absence de traitement (Chun et al., 1997b; Finzi et al., 1997; Wong et al., 1997). Il est donc nécessaire dans les années à venir de trouver une nouvelle stratégie visant à purger au moins partiellement ces réservoirs pour éradiquer le virus de l'organisme. Afin de trouver ces nouvelles thérapies, il est primordial de mieux comprendre les mécanismes qui conduisent à la mise en place de ces réservoirs et donc le mécanisme de régulation de l'expression virale.

III - La transcription virale

Après infection des cellules *via* les mécanismes de fusion, le virus est intégré à l'ADN de la cellule hôte et son expression va être soumise aux mêmes régulations que le reste du génome de la cellule. On peut tout de même diviser la transcription des gènes viraux en plusieurs phases soumises à des phénomènes de régulations différents.

Dans une première phase, que l'on nomme : phase précoce ou initiale, seuls des facteurs d'origine cellulaire modulent la transcription des gènes du VIH-1. Au cours de cette étape, seule une petite fraction des ARN initiés est élongués permettant la production des gènes précoces (Tat, nef.). Puis, lors de la phase tardive, le facteur viral Tat vient transactiver le phénomène et permet ainsi une réplication virale beaucoup plus intense en induisant un meilleur rendement de l'élongation des transcrits viraux (Jones, 1997).

De plus, l'état chromatinien du site d'insertion du promoteur viral va jouer sur son état d'activation et permettre les phénomènes de latence et la création de réservoirs (Jordan et al., 2001).

1- Présentation des facteurs de transcription impliqués dans la modulation de la transcription virale.

Différents facteurs de transcription ont été à ce jour identifiés comme interagissant avec le promoteur viral et modulant de ce fait la production virale.

1.1- Les facteurs de transcription cellulaire.

Ils sont nécessaires à l'initiation de la transcription des gènes, soit par une action *via* une liaison directe du facteur à la séquence promotrice, soit *via* l'interaction avec d'autres facteurs ou l'ARN polymérase fixés à l'ADN. Les facteurs vont reconnaître de petites séquences d'ADN conservées situées au niveau des promoteurs des gènes qu'ils régulent.

1.1.1- La structure des facteurs de transcription.

Les facteurs de transcription cellulaires présentent des caractéristiques structurales communes et sont constitués d'au moins deux domaines importants :

- un domaine de fixation à l'ADN qui contient un motif particulier permettant l'interaction avec l'ADN (doigt de zinc, crémaillère à leucine...),

- un domaine effecteur qui est responsable de l'activité du facteur de transcription. Il peut avoir soit un effet activateur (domaine riche en acides aminés acides, en glutamine ou en proline) soit un effet répresseur (domaine riche en alanine, en glutamine ou en proline) en interagissant avec la machinerie transcriptionnelle cellulaire.

1.1.2- Description des facteurs de transcription cellulaires impliqués.

Les facteurs sont classés suivant la nature de leur domaine de fixation à l'ADN.

1.1.2.1- La famille des facteurs à motif crémaillère à leucine.

Une zone riche en acides aminés leucine permet la création de liaisons hydrophobes entre les deux hélices alpha. Les deux extrémités chargées positivement situées en N terminal vont alors constituer le domaine de liaison du facteur à l'ADN (Ellenberger et al., 1992; König and Richmond, 1993) : on parle de motif bZIP. Le facteur va agir sous forme d'homo- ou d'hétéro-dimère en se liant à des séquences répétées inversées de l'ADN.

- La famille C/EBP (CCAAT/Enhancer Binding Protein)

Cette famille est constituée de six membres : α , β (=NF-IL6), γ , δ , ϵ , ζ , qui sont exprimés de façon ubiquitaire. Ils sont impliqués dans la régulation de nombreux processus cellulaires tel que le contrôle de la prolifération cellulaire, la différenciation, le métabolisme et l'inflammation.

Les facteurs NF-IL6 et C/EBP γ sont des activateurs de la transcription des gènes du VIH-1 (Schwartz et al., 2000).

- CREB (cAMP Response Element Binding protein)

Facteur sensible aux variations intracellulaires d'AMPc, il est impliqué dans la modulation de la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme, le cycle cellulaire, la transduction du signal et le transport cellulaire. L'augmentation intracellulaire d'AMPc va provoquer l'activation de la PKA qui après migration dans le noyau, va phosphoryler CREB. Le facteur ainsi activé va induire la transcription en recrutant la sous unité CTD de l'ARN polymérase II puis l'ensemble de la machinerie transcriptionnelle de base.

P53, NF-IL6, YY1 peuvent moduler l'activité de CREB en interagissant avec lui pour stimuler la transcription virale dans les cellules T (Rohr et al., 1999). De plus, des

modifications telles que l'acétylation, ubiquitinylation, la SUMOylation et la glycosylation peuvent également influencer son activité (Johannessen et al., 2004a; Johannessen et al., 2004b).

- Le complexe AP-1 (Activating Protein 1)

C'est un complexe dimérique (homo ou hétéro) composé des protéines Fos et Jun. Il est activé lors de la réponse cellulaire primaire et est impliqué dans la conversion d'un grand nombre de signaux extracellulaires tels que des facteurs de croissance, des promoteurs tumoraux, des virus en des réponses transcriptionnelles secondaires (Shaulian and Karin, 2002).

Au cours de l'infection par le VIH-1, AP-1 a été identifié comme un facteur stimulateur de la transcription virale dans les cellules microgliales mais pas dans les autres types cellulaires du système nerveux (Canonne-Hergaux et al., 1995).

1.1.2.2- La famille des facteurs à motif Hélice-Boucle-Hélice.

Ils ont en commun un motif (HLH) comportant deux hélices alpha interagissant *via* les résidus hydrophobes qui les composent et séparées par une région de longueur variable en forme de boucle. Le domaine basique adjacent au domaine HLH constitue le domaine de liaison à l'ADN qui reconnaît la séquence CANNTG nommée E-Box. Ces facteurs jouent un rôle clef dans les fonctions cellulaires tel que l'expression tissulaire spécifique de certains gènes, la croissance cellulaire, la différenciation, le développement (Jones, 1990; Murre et al., 1989).

- La famille USF (Upstream Stimulating Factor-1)

Facteurs ubiquitaires qui se dimérisent entre facteurs USF pour se lier à l'ADN au niveau de la séquence CACGTG. Il contient en plus du motif Hélice-Boucle-Hélice un domaine LZ (leucine zipper) très important pour la liaison à l'ADN (Gregor et al., 1990; Sirito et al., 1992).

USF-1 coopère avec TFII-I pour moduler la transcription du VIH-1 (Du et al., 1993), et le complexe USF-1/USF-2/TFII-I régule la réactivation de la réplication dans les cellules T (Chen et al., 2004a).

1.1.2.3- La famille des facteurs à motif Hélice-Tour-Hélice.

Ils contiennent deux hélices alpha de 8-10 acides aminés séparées par un coude β constitué de quelques résidus. La liaison à l'ADN passe par l'intermédiaire de l'hélice situé en C terminal (Aggarwal et al., 1988).

Le seul facteur de cette famille impliqué dans la modulation transcriptionnelle du VIH-1 est : Ets-1 (E26 Transformation Specific-1).

Facteur essentiellement exprimé dans les lymphocytes T et les thymocytes, il participe à la survie des lymphocytes T et dans la différenciation des lymphocytes T « natural killer » (Freud et al., 2006). Il se fixe sur l'ADN au niveau de la séquence spécifique GGA pour activer le promoteur du gène cible. Il active de façon synergique la transcription virale en collaborant avec NF- κ B et Sp1 (Pazin et al., 1996).

1.1.2.4- La famille des facteurs à motif doigt de zinc.

Le domaine en doigt de zinc est formé de 30 acides aminés repliés sur un ion zinc central chélaté par deux cystéines et deux histidines (C2H2) ou par quatre cystéines (C4). La partie C-terminale de chaque doigt de zinc forme des hélices α qui lient l'ADN, et la partie N-terminale forme des feuillets β . La partie non conservée en C-terminal de chaque doigt est responsable de la reconnaissance spécifique de séquences d'ADN au niveau des gènes cibles (Pavletich and Pabo, 1991).

Les protéines comportant ce motif sont impliqués dans les phénomènes de différenciation, de croissance et dans la modulation des proto-oncogènes et des facteurs généraux de la transcription (Berg, 1986; Berg, 1990; Klug and Rhodes, 1987).

- Sp1 (Specific Protein 1)

C'est une protéine ubiquitaire contenant 3 doigts de zinc qui vont interagir avec les boîtes GC adjacentes à la séquence TATAA présente sur les promoteurs. Elle peut former des multimères sur le promoteur s'il présente plusieurs boîtes GC se traduisant par une synergie d'activation de la transcription. Elle module ainsi l'expression des gènes primordiaux de l'organisme (gènes exprimés au cours du développement embryonnaire, l'insuline, les hormones stéroïdes, p21, APOBEC3G ... (Pour revue voir (Li et al., 2004). Sp1 va activer la transcription virale soit en se fixant seul directement sur l'ADN, soit en recrutant ensuite d'autres facteurs de transcription tel que COUP-TF (Rohr et al., 1997).

- SP3 (Specific Protein 3)

Exprimé de façon ubiquitaire et modulant également les gènes qui assurent les fonctions indispensables à la vie de tous les types de cellules. Sp3 réprime l'activité de Sp1 en se fixant de la même façon sur les boîtes GC (Hagen et al., 1994), agissant ainsi comme répresseur du LTR viral (De Luca et al., 1996).

- YY1 (Ying Yang-1)

Facteur ubiquitaire qui intervient dans l'embryogenèse, la différenciation et la prolifération cellulaire, ainsi que dans la régulation de gènes viraux (Nguyen et al., 2004). Il peut initier, activer ou réprimer la transcription des gènes en recrutant des cofacteurs. Ainsi il peut diriger l'action d'histone déacétylases et d'histone acétyltransférases (Coull et al., 2000; He and Margolis, 2002; Huang et al., 2003). Lors de l'infection par le VIH-1, il coopère avec le facteur de transcription LSF et avec HDAC 1 pour réprimer son expression (Coull et al., 2000; Romerio et al., 1997). De plus, des études ont également montrés des effets sur l'expression du corécepteur CCR5 du VIH-1 (Lei et al., 2005), et sur la maturation des particules virales (Yang et al., 1995).

- Les récepteurs nucléaires

Ils agissent sous forme de dimère et doivent être activés par un ligand. Leur activité est ainsi contrôlée par des cofacteurs inhibiteurs et activateurs.

Ils contiennent cinq régions fonctionnelles :

A/B : Domaine d'activation indépendant du ligand,

C : Domaine de fixation de l'ADN en doigt de zinc (séquence cible AGGTCA),

D : Domaine charnière entre A/B et C,

E : Domaine de fixation du ligand, de dimérisation, d'activation dépendante du ligand,

F : Domaine souvent absent et peu conservé.

Différents récepteurs nucléaires participe à la régulation du VIH-1 dont les récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR, RXR) de l'hormone thyroïdienne (TR) (Hsia and Shi, 2002; Hsia et al., 2001; Ishizuka et al., 2001), des glucocorticoïdes (GR) (Russo et al., 1999), et COUP-TF (récepteur dit orphelin) (Rohr et al., 1999).

Un cofacteur cellulaire CTIP2 (COUP-TF interacting protein 2) est capable d'interagir avec COUP-TF et d'induire une répression de la transcription et de la réplication virale

1.1.2.5- La famille des facteurs à motif NF- κ B.

Cette famille joue un rôle clef dans la régulation des réponses immunitaires et inflammatoires telle que l'apoptose (Jazirehi et al., 2005). Après activation dans le cytoplasme, ces facteurs migrent dans le noyau pour activer la transcription des gènes. Ils contiennent deux domaines activateurs, un domaine d'interaction avec AP-1, un domaine régulateur et une séquence NLS.

- NF-AT (Nuclear Factor of Activated T Cells)

Ce facteur permet l'organisation de la réponse immunitaire en induisant l'expression des interleukines 2, 3, 4, 5, du TNF α et du GM-CSF (Shaw et al., 1988). A l'état inactif, NF-AT est phosphorylé dans le cytoplasme. Lors d'un stress, l'augmentation intracellulaire de calcium active la calcineurine sérine phosphatase permettant l'activation du facteur par sa déphosphorylation. Le NF-AT, va alors entrer dans le noyau pour stimuler la transcription en concertation avec AP-1 (Lyakh et al., 1997).

NF-AT 1 et 2 modulent positivement la transcription du VIH-1 en se fixant aux sites NF- κ B du promoteur viral dans les cellules T (Kinoshita et al., 1998; Macian and Rao, 1999).

- NF- κ B (Nuclear Factor - κ B)

Homo ou hétéro-dimère constitué des sous unités p50, p65 (RelA), p52, RelB, et c-Rel, il est bloqué à l'état inactif par I κ B (Baeuerle and Baltimore, 1988) dans le cytoplasme des cellules. Il est inductible par de nombreux stimuli extracellulaires.

Suite à un signal pro-inflammatoire, I κ B est phosphorylé puis ubiquitinilé permettant au protéasome de le dégrader, libérant ainsi NF- κ B qui peut migrer dans le noyau (Palombella et al., 1994).

NF- κ B permet de réactiver la réplication du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4⁺ latents (Brooks et al., 2003; West et al., 2001) en induisant le recrutement de TFIID et de l'ARN polymérase II (Kim et al., 2006), ainsi que le recrutement de facteurs de remodelage de la

chromatine (Henderson et al., 2004; Lusic et al., 2003; Mahmoudi et al., 2006; Treand et al., 2006), et d'histones acétyltransférases (CBP et p300) (Gerritsen et al., 1997; Krogan et al., 2002) sur le promoteur viral (Avram et al., 2000).

1.1.2.6- La famille des facteurs à HMG Box.

Ils ont un rôle large au cours du développement, ils régulent la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire et l'apoptose dans les tissus soumis à renouvellement (peau, muqueuses intestinales, lymphocytes...). Ils se lient de façon monomérique à l'ADN sur une séquence consensus AGATCAAAGGG *via* leur HMG Box (High Mobility Group) (Travis et al., 1991). Le domaine HMG est constitué de trois hélices α et d'une longue queue acide en N terminal. La fixation du domaine HMG à l'hélice d'ADN va induire une courbure de l'ADN permettant ainsi la fixation de grands complexes protéiques qui servent à recruter d'autres protéines capables de moduler la transcription (Hurlstone and Clevers, 2002).

Le facteur à HMG Box, TCF-1/LEF1 (T Cell Factor/Lymphoid Enhancer binding Factor 1), active la transcription virale *via* un remodelage de la chromatine (Sheridan et al., 1995).

1.1.2.7- Famille des facteurs LSF (Late simian virus 40 Factor)

Ils sont constitués de deux domaines activateurs, d'un domaine répresseur et d'un domaine de dimérisation. Facteurs ubiquitaires, ils sont impliqués dans les processus biologiques généraux tel que le cycle cellulaire, la croissance et l'apoptose (Powell et al., 2000). Ils peuvent s'associer à d'autres facteurs pour réguler la transcription.

LSF-CP2 (LSF-CCAAT binding Protein 2) se fixe sur l'ADN sous forme de tétramères sur la séquence (G) CTGG répétées deux fois. Ce facteur réprime la transcription virale (Kim et al., 1987) par l'intermédiaire d'un complexe contenant LSF et YY1 afin de recruter HDAC1 sur le promoteur du VIH-1 dans les lymphocytes (Romerio et al., 1997). Il contribue ainsi à l'établissement et au maintien de la latence virale (ce point sera abordé dans la discussion de ce manuscrit).

1.1.2.8- La famille des facteurs CSL (CBF-1, Su(H) and Lag-1).

Tous les membres de cette famille possèdent un site de liaison à l'ADN identique. Ils constituent les premiers effecteurs nucléaires de la voie Notch³ et sont indispensables à de nombreux processus du développement chez les vertébrés (CBF-1), la drosophile (Su(H)) et C-elegans (lag-1) (division et prolifération cellulaire...) (Pour revue (Artavanis-Tsakonas et al., 1999)).

CBF-1 a un effet represser sur la transcription de gènes cellulaires (Dou et al., 1994; Waltzer et al., 1995) mais également sur le promoteur du VIH-1. En effet, en présence ou en absence de Tat dans les cellules T, CBF-1 permet le recrutement d'HDACs qui déacétylent le promoteur et l'inhibe, contribuant ainsi à la mise en place de la latence dans ces cellules (Tyagi and Karn, 2007).

1.2- Le facteur de transcription viral : Tat.

Tat est essentiel à la réplication virale (Ruben et al., 1989). Il agit comme un transactivateur de la transcription virale en se fixant à la séquence TAR (Transactivating Responsive) formant un motif tige-boucle à l'extrémité 5' des nouveaux transcrits (Feng and Holland, 1988) (Figure 28B]).

La protéine comporte cinq domaines (figure 28A]) dont deux essentiels :

- le domaine 20-40, riche en cystéine qui va permettre la formation de pont disulfure au sein de la molécule et lui conférant ainsi sa configuration tridimensionnelle,
- le domaine 48-72, riche en acides aminés basiques (arginine), il contient une séquence NLS autorisant le passage de la protéine dans le noyau et constitue le site de fixation sur la TAR au niveau de la séquence UCU (figure 28 B]) (Calnan et al., 1991; Dingwall et al., 1989).

³ Allumée, la protéine Notch déclenche une cascade de réactions à l'intérieur de la cellule. Cette voie de signalisation est essentielle au développement de tous les tissus quelque soit l'organisme, mais elle est aussi connue pour son rôle dans la différenciation lors du développement embryonnaire. Le gène Notch semble également impliqué dans le développement tumoral, en tant qu'oncogène.

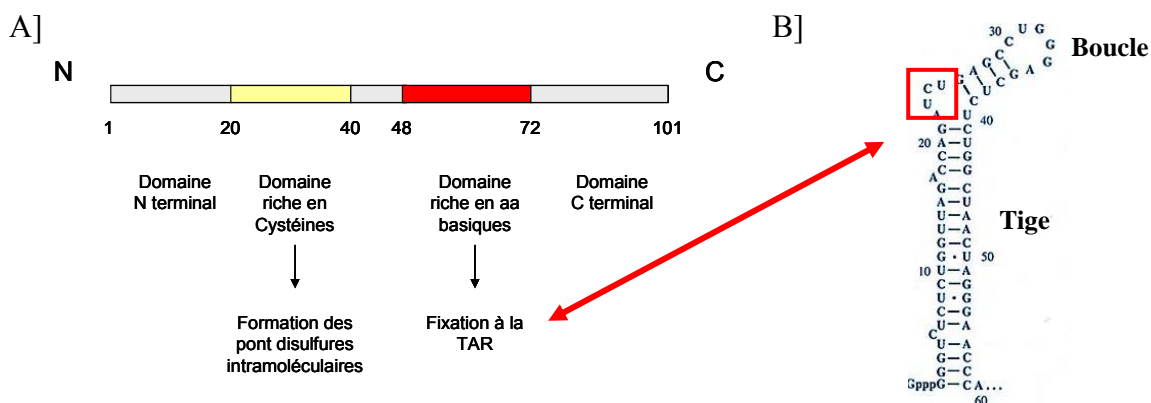


Figure 28 : L'interaction Tat/TAR

A] La protéine virale Tat, elle contient 2 domaines essentiels : un domaine nécessaire à sa configuration tridimensionnel (en jaune) et un domaine lui permettant son interaction avec la TAR (en rouge) **B]** d'après (Gottfredsson and Bohjanen, 1997) modifié. La TAR : c'est une structure d'ARN en épingle à cheveux qui correspond à la transcription des 50 premières bases du génome viral. Tat interagit avec la TAR via sa séquence UCU.

La présence de cofacteurs est nécessaire pour l'interaction avec la TAR. Ainsi, la cyclin T1 est indispensable à la reconnaissance de la TAR par Tat (Wei et al., 1998) et va contribuer à l'augmentation de la processivité de l'ARN polymérase II en recrutant la kinase cellulaire CDK9 du complexe P-TEFb (Zhu et al., 1997).

La liaison entre la protéine Tat et la TAR est un processus dynamique. Dans un premier temps, Tat est acétylé sur sa lysine 28 pour lier la TAR et la cyclin T1. Puis, l'acétylation de sa lysine 50 par p300 va provoquer sa dissociation de la TAR et sa fixation aux TAKs (Tat Associated Kinases), p300/CBP, PCAF (p300/CEBP Associating Factor) qui vont moduler la processivité de l'ARN polymérase II sur le promoteur viral (Benkirane et al., 1998; Bres et al., 2002; Kiernan et al., 1999). La boucle TAR sert donc de site de fixation aux facteurs cellulaires coopérant avec Tat dans l'activation du LTR (Sheline et al., 1991; Wu et al., 1991).

De plus, la protéine Tat peut subir une ubiquitination ne conduisant pas à sa dégradation mais à une stimulation de son activité (Bres et al., 2003).

Par ailleurs, ce facteur peut également agir sur le niveau d'expression de tous les gènes viraux mais également sur certains gènes cellulaires tel que le TNF α (Brother et al., 1996) et le TGF α 1 (Rasty et al., 1996).

1.3- Les protéines virales impliquées dans la régulation de la transcription.

1.3.1- Vpr (Viral protein r).

Les détails du rôle de Vpr dans la modulation de la transcription virale seront développés dans la partie IV de ce manuscrit.

1.3.2- Nef.

La protéine Nef ne présente pas d'effet direct sur la transcription. Son action passe par l'activation de facteurs de transcription NF-AT (Manninen et al., 2000), STAT-1 (Federico et al., 2001), CDK9 (Simmons et al., 2001), NF- κ B et AP-1 (Varin et al., 2003) lors de la phase tardive de la transcription virale.

2- Les modifications de la chromatine influençant la transcription cellulaire.

2-1- Structure de la chromatine.

2.1.1- Les différents niveaux de compaction de l'ADN

La chromatine constitue l'organisation structurale de base du matériel génétique. Elle permet de compacter les deux mètres d'ADN d'une cellule dans un noyau de 6-8 μ m de diamètre et comprend différents niveaux de compaction de l'ADN (Grunstein, 1992) (Figure 29).

En microscopie électronique, la chromatine ressemble à un chapelet de perles, chacune des perles étant un nucléosome qui constitue l'unité fondamentale de la chromatine. C'est un complexe octamérique protéique, chargé positivement, et comprenant deux histones H2A, deux histones H2B, deux histones H3 et deux histones H4. Ce complexe protéique est entouré par 147 paires de bases qui en font 1,65 fois le tour (Arents et al., 1991). Ce motif est répété toutes les 20 à 90 paires de bases, condensant ainsi l'ADN au stade de nucléofilament.

A un niveau de compaction supérieur, les nucléosomes se pontent entre eux grâce à l'histone H1 (Blank and Becker, 1995; Zlatanova et al., 2000) conduisant à la formation

d'une hélice régulière dite hélice solénoïde, ou fibre chromatinienne, contenant six nucléosomes par tour (Luger et al., 1997). La fibre chromatinienne va alors former des boucles en se fixant à la matrice nucléaire afin de donner naissance au chromosome.

L'état de la chromatine va varier de façon locale en fonction du contexte cellulaire. Les zones transcriptionnellement actives se trouvent dans un état relaxé, appelé euchromatine. L'ADN est dans ce cas accessible pour les facteurs d'initiation et la machinerie transcriptionnelle.

A l'inverse, les zones non transcrites sont fortement condensées et constituent hétérochromatine. Dans ce cas, la chromatine forme une barrière à l'accessibilité de l'ADN et un frein à l'élongation des transcrits. Le remodelage de la chromatine d'un état à un autre va donc constituer une étape essentielle dans la régulation de la transcription.

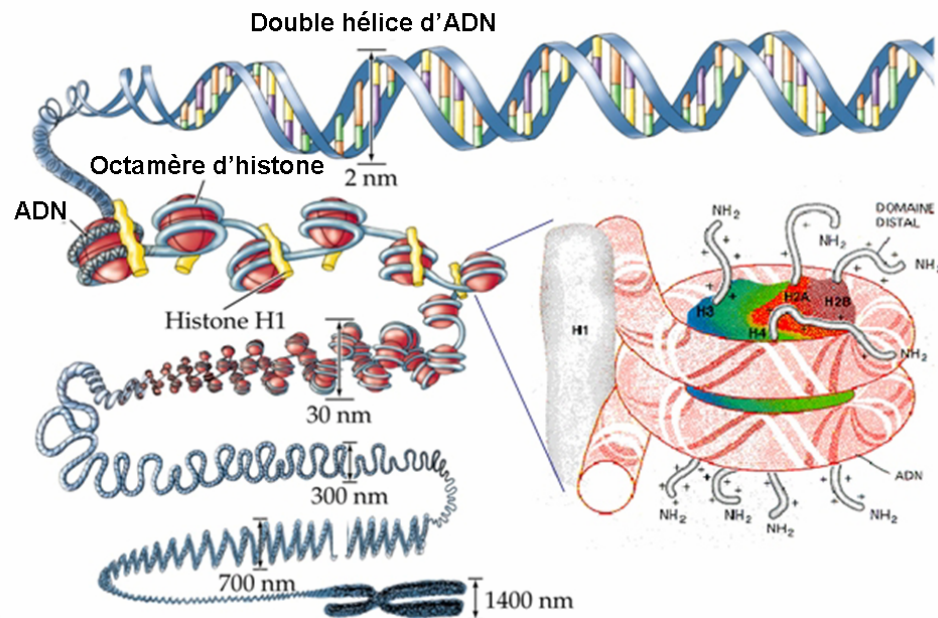


Figure 29 : Les différents niveaux de compaction de l'ADN cellulaire.

D'après (Grunstein, 1992) modifié.

Au sein des chromosomes, l'ADN est très fortement compacté. Il est associé à un complexe d'histones (2 histones H2A, 2 histones H2B, 2 histones H3 et 2 histones H4 = nucléosome) pour constituer la chromatine. La chromatine s'enroule 1,65 autour du nucléosome, chaque nucléosome étant séparé par 20 à 90 paires de bases : cet ensemble constituant le nucléofilament. Les nucléosomes se pontent entre eux grâce à l'histone H1 conduisant à la formation d'une hélice régulière (hélice solénoïde ou fibre chromatinienne), contenant 6 nucléosomes par tour. La fibre chromatinienne va alors former des boucles en se fixant à la matrice nucléaire afin de donner naissance au chromosome.

2.1.1- Les variants d'histones

Les histones sont donc indispensables pour la compaction et la structure de l'ADN. En plus des quatre histones classiques que sont H2A, H2B, H3, et H4, il existe des variants d'histones. Chacun de ces variants d'histones possède un rôle spécialisé dans la structure ou la fonction de la chromatine.

- Les variants H3

Le variant de H3, nommé CENP-A (CENTromérique Protein A) est associé exclusivement dans les nucléosomes situés au niveau des centromères où il marque l'emplacement des kinétochore⁴ (Choo, 2000). Il possède une extrémité N terminale très différente de H3 qui joue un rôle essentiel pour la structure et la fonction des nucléosomes centromériques (Ahmad and Henikoff, 2001). Par ailleurs, le variant H3.3 possède une séquence ressemblant énormément à celle de H3 et est déposé sur l'ADN par des protéines chaperones (Tagami et al., 2004). Il a été proposé que ce dépôt provoque une activation immédiate du gène situé à proximité du nucléosome d'incorporation (Ahmad and Henikoff, 2002b). Le variant H3.1 peut être à la fois présent dans des zones actives et inactive de la chromatine, il ne possède qu'un seul acide aminé de différence avec le variant H3.2 qui lui est impliqué dans les phénomènes de « silencing » des gènes (pour revue (Ahmad and Henikoff, 2002a)).

- Les variants H2

H2A possède au moins quatre variants : H2A-Z, H2A-X, H2A-Bbd et Macro-H2A. Le variant H2A-Z joue un rôle dans la formation de l'euchromatine en empêchant, lorsqu'il est incorporé, la propagation de l'hétérochromatine (Meneghini et al., 2003).

H2A-X possède une extrémité C terminale qui peut être spécifiquement phosphorylée en réponse à certains types de cassures dans l'ADN (Rogakou et al., 1998) et il est donc requis pour la réparation de l'ADN.

H2A-Bbd est associé aux régions transcriptionnellement actives (Chadwick and Willard, 2001).

Enfin, Macro-H2A est un variant possédant une extrémité C terminale globulaire de 25 kDa. Il est spécifiquement incorporé dans le chromosome X inactif chez les mammifères (pour revue (Ladurner, 2003)) .

2-2- Les mécanismes de remodelage de la chromatine.

⁴ Le **kinétochore**, est un complexe protéique assemblé à chaque centromère servant de point d'ancrage pour les microtubules du fuseau mitotique.

2-2-1- Les modifications post-traductionnelles des histones : le code histone.

Un ensemble de modifications post-traductionnelles peuvent affecter les histones. Les différentes combinaisons possibles constituent le Code Histone (figure 30) qui sera « lu » et interprété par des complexes protéiques afin de moduler la transcription des gènes (Jenuwein and Allis, 2001; Strahl and Allis, 2000). Les modifications qui vont avoir lieu aux extrémités N terminales des histones peuvent être de différente nature et vont faire intervenir des enzymes spécifiques.

type de modification	enzymes responsables	Sites ciblés	Effet transcriptionnel
Acétylation des lysines	HAT	H3 (9, 14, 18, 56), H4 (5,8,13, 16), H2A (5), H2B (5, 12, 15, 20)	Activation
déacétylation des lysines	HDAC		Répression
Phosphorylation des sérines et thréonines	sérines/thréonines HK	H3 (3, 10, 28), H2A (1), H2B (14)	Activation
Méthylation des arginines	PRMT	H3 (17, 23), H4 (3)	Activation
Méthylation des lysines	HMT/KHMT	H3 (4, 36, 79) H3 (9, 27), H4 (20)	Activation Répression
Déméthylation des lysines	LSD1/BHC110//jumonji	H3 (4, 9, 36)	Activation/Répression
Ubiquitination des lysines	cascade d'ubiquitination	H2B (120) H2A (119)	Activation Répression
Déubiquitination des lysines	Bmi/ring1A	H2A (119)	Activation
	RNF20/RNF40	H2B (120)	Répression
Sumoylation des lysines	cascade de SUMOylation	H2B (6/7), H2A (126)	Répression
Isomérisation des prolines	scFPR4	H3 (30-38)	Activation / Répression

Figure 30 : Les différentes modifications des histones : Le code histone.

D'après (Berger, 2007) modifié.

Chaque type de modifications, ainsi que le résidu touché va conduire à une activation ou une répression de la transcription. Chaque réaction est sous le contrôle d'enzymes spécifiques.

3-2-1-1- *L'acétylation des histones.*

L'état d'acétylation des histones va traduire l'état d'activation de la chromatine. Ainsi, une région transcriptionnellement active sera hyperacétylée, alors qu'à l'inverse une région silencieuse transcriptionnellement inactive sera hypoacétylée (Hebbes et al., 1994) (Figure 31).

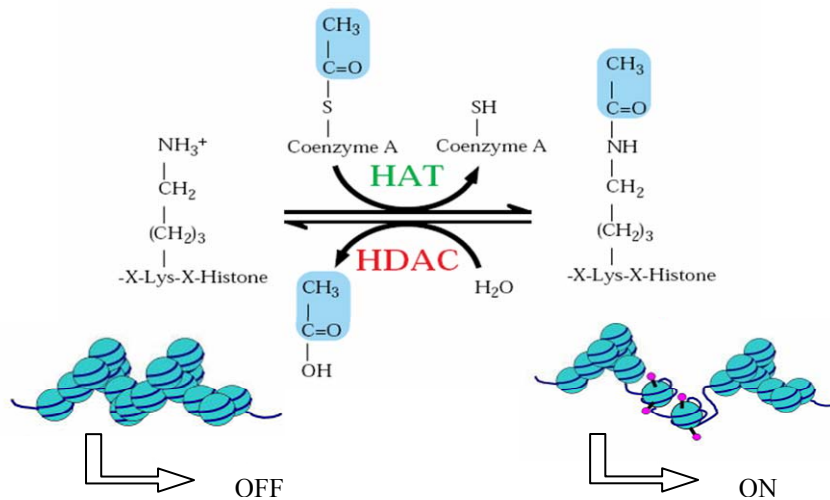


Figure 31 : Le mécanisme d'acétylation et de déacétylation des histones.

D'après (Kuo and Allis, 1998) modifié.

L'acétyl-coenzyme A transfère son groupement acétyle sur la lysine d'une histone suite à l'action d'une histone acétyl-transférase (HAT). L'acétylation des histones conduit à un phénomène de relâchement de la chromatine permettant la transcription des gènes. La réaction inverse sous le contrôle de l'histone déacétylase (HDAC) conduit à un état condensé de la chromatine ne permettant pas la fixation des complexes d'initiation de la transcription.

C'est un processus réversible qui consiste en un transfert d'un groupement acétyle porté par une molécule d'acétyl coenzyme A sur le groupement ϵ aminé d'un résidu lysine (Kuo et al., 1996).

L'acétylation perturbe la structure du nucléosome en neutralisant les charges positives des lysines des histones, diminuant de ce fait leur affinité pour l'ADN chargé négativement (Grunstein, 1997; Luger and Richmond, 1998). La chromatine se relâche, permettant l'accessibilité des complexes d'initiation de la transcription. Par ailleurs, l'acétylation pourrait également constituer un marquage pour le recrutement d'autres protéines, tel que les protéines à bromodomaines comme HP1 (Hassan et al., 2007).

Cette réaction est sous le contrôle de deux types d'enzymes (figure 31) :

a)- Les HAT : histones acétyltransférases.

Les histones acétyltransférases nucléaires vont agir sur les histones déjà engagées dans les nucléosomes, alors que les acétyltransférases cytoplasmiques vont agir sur les histones nouvellement formées.

Les histones acétyltransférases nucléaires sont divisées en 3 catégories :

- GNAT, elles sont retrouvées dans des grands complexes multiprotéiques tels que SAGA (*Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase*) et ADA. Elles peuvent agir sur des cibles non histones comme les facteurs de transcription (p53, (Liu et al., 2000)) et des protéines structurales (Hubbert et al., 2002).

- MYST, famille de HAT très conservée chez les eucaryotes, ces différents membres (Tip60, HBO1, Moz, MORF) sont impliqués dans de nombreux phénomènes liés au cycle cellulaire et à la réplication de l'ADN (Berns et al., 2004; Iizuka et al., 2006). Leur mauvais fonctionnement est observé dans de nombreux cancers (pour revue voir (Avvakumov and Cote, 2007)).

- p300/CBP. Elles sont impliquées dans différents processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaire (Chan and La Thangue, 2001) ; La PKA qui phosphoryle CREB sur l'ADN pour l'activer, permet ainsi le recrutement de p300/CBP et l'activation de la transcription.

b)- Les HDAC : histones déacétylases

Les HDAC sont impliquées de façon générale dans les mécanismes de régulation des gènes au cours du développement, la différenciation et le cycle cellulaire. Les traitements à l'aide d'inhibiteurs de HDAC ont permis de montrer dans des cellules cancéreuses un arrêt de la croissance et de la différenciation de ces cellules conduisant à leur apoptose, ainsi qu'un arrêt en phase G2 du cycle cellulaire des cellules non cancéreuses (Grozinger and Schreiber, 2002) relié à une augmentation de l'expression de l'expression de p21 (Sambucetti et al., 1999), montrant la capacité des HDAC à bloquer l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs

On distingue 4 classes d'HDAC possédant des caractéristiques différentes.

La classe I : (HDAC 1, 2, 3, 8) Elles sont ubiquitaires, essentiellement nucléaires et sensibles à la TSA⁵ (trichostatine A). Leur domaine catalytique constitue la majorité de la protéine (Kao et al., 2000; Li et al., 2002a). HDAC 1 et 2 présentent une forte homologie (82%) et sont connues pour appartenir à trois grands complexes : Sin 3 (Hassig et al., 1997), NurD (Tong et al., 1998; Xue et al., 1998). et CoRest (Humphrey et

⁵ TSA est un acide organique hydroxamique chiral qui est un antifongique naturel provenant de la souche de champignons *Streptomyces- hygroscopicus*. Elle est également connue pour son effet inhibiteur des HDACs.

al., 2001). Elles peuvent interagir avec des facteurs de transcription cellulaires tel que Sp1 et YY1.

HDAC1, en agissant sur le niveau d'expression de différents régulateurs joue un rôle important dans le contrôle du cycle cellulaire (Lagger et al., 2002).

HDAC3 présente une homologie de séquence beaucoup plus faible avec HDAC 1 et 2, et nécessite le recrutement des complexes SMRT et N-CoR pour exercer son activité (Guenther et al., 2001).

Les caractéristiques fonctionnelles de HDAC8 (homologue de Rpd3 chez la levure) sont encore peu connues du fait de sa découverte récente. C'est une enzyme exclusivement nucléaire qui semble avoir un rôle répresseur de la transcription (Hu et al., 2000) en jouant sur le niveau d'acétylation des histones H3 et H4 (Lee et al., 2004).

La classe II : Elles sont exprimées différemment d'un type cellulaire à l'autre et ont la particularité de réaliser la navette entre le noyau et le cytoplasme en fonction de l'état de phosphorylation de la CaMK (calcium/calmodulin-dependent protein kinases). La classe II est subdivisée en deux sous classes : HDAC 4, 5, 7, 9 constituent les HDAC de type IIa, qui possèdent un site catalytique en C terminal et une séquence NLS en N terminal (Bertos et al., 2001). Elles sont capables d'interagir avec HDAC3 dans les complexes SMRT et N-CoR (Fischle et al., 2001) (Fischle et al., 2002). Les HDAC IIb (HDAC 6, 10) présentent la particularité de posséder 2 domaines catalytiques en tandem et sont capables d'interagir avec de nombreuses autres HDAC (Verdin et al., 2003).

La classe III (SIRT 1 à 7) : Elles ne possèdent aucune homologie de séquence avec les autres HDAC et leur activité est dépendante du NAD⁺. Ces HDAC agissent essentiellement sur des protéines non histones comme par exemple p53 (Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001) ou la voie NF-kB (Yeung et al., 2004).

La classe IV : elle est constituée de la seule HDAC 11 qui n'appartient à aucun complexe d'HDAC connu pour le moment. Elle possède les mêmes caractéristiques que les HDAC de Classe I mais ne présente qu'une faible homologie de séquence ce qui explique son classement dans une catégorie particulière (Gao et al., 2002).

2-2-1-2- La méthylation des histones.

L'effet sur la transcription sera différent en fonction du résidu touché. Ainsi, la méthylation des résidus arginines de l'histone H3 conduit à une activation de la

transcription (Santos-Rosa et al., 2002; Wang et al., 2001), alors que la méthylation des résidus lysines est associée à une répression (Kouzarides, 2002).

Cette réaction est réalisée grâce à des histones méthyltransférases (HMT) qui vont être spécifiques d'un résidu et qui vont pouvoir méthyler sur 3 niveaux. Ainsi, les histones peuvent être mono- et di-méthylés sur les lysines et les arginines, les lysines pouvant être triméthylées (Steward et al., 2006).

Les histones méthyltransférases vont permettre le transfert du groupement méthyle porté par une molécule de S-Adénosyl-Méthionine (SAM) sur le groupement ϵ aminé d'un résidu lysine ou arginine. Cette modification des histones n'altère pas leur charge, ce qui ne modifie pas leur affinité pour l'ADN et donc ne touche pas directement son état de compaction (Zhang and Reinberg, 2001).

Les HMT font partie de trois familles :

- Les PRMT (protein arginine methyltransferase)

Elles sont au nombre de onze mais seules les PRMT 1 et 4 présentent une activité histone méthyltransférase *in vivo*. Elles vont méthyler spécifiquement les arginines (figure 32).

La PRMT 1 agit sur l'arginine 3 de l'histone H4, elle est très conservée au cours de l'évolution et semble jouer un rôle dans l'activation transcriptionnelle (Wang et al., 2001).

La PRMT 4 (ou CARM1 : Coactivator associated arginine methyltransferase 1) agit sur les arginines 2, 17, 26 de l'histone H3 mais également sur d'autres protéines non histones comme CBP (Xu et al., 2001). Son activité est synergisée par CBP, pCAF et p300 qui sont impliquées dans l'acétylation des histones (Daujat et al., 2002; Lee et al., 2002).

Les PRMT 1 et 4 jouent un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire ainsi que dans l'apoptose, en effet PRMT4 est surexprimée dans les tumeurs (El Messaoudi et al., 2006; Hong et al., 2004).

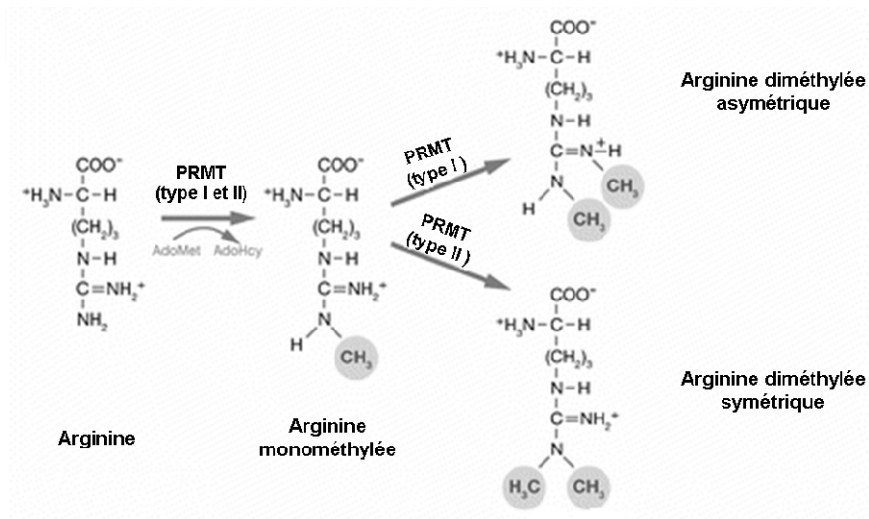


Figure 32 : Les réactions de méthylation des histones.

D'après (Shilatifard, 2006) modifié.

- Les protéines à domaine SET : HMT (histone methyltransferase)

Elles n'agissent que sur les lysines 4, 9, 27, et 36 de l'histone H3 et la lysine 20 de l'histone H4 (figure 33). Cette famille contient notamment la méthyltransférase SUV39H1 qui méthyle spécifiquement la lysine 9 de l'histone H3 (Lachner et al., 2001), permettant ainsi l'établissement et le maintien de l'hétérochromatine (Nakayama et al., 2001). En effet, elle crée un site d'interaction de haute affinité pour la protéine HP1 impliquée dans la formation de l'hétérochromatine (Bannister et al., 2001; Fischle et al., 2005; Loyola et al., 2001; Nowak and Corces, 2004). Cependant, la méthylation de la lysine 9 n'est pas toujours associée à un environnement répressif. En effet, des régions très actives du génome ont été identifiées comme étant tri-méthylées sur la lysine 9 de l'histone H3 associé à la présence de HP1 γ (Vakoc et al., 2005).

- Les protéines sans domaine SET : KHMT (lysine histone methyltransferase)

Seule protéine de cette catégorie connue pour le moment : Dot 1 (disruptor of telomeric silencing 1). Elle di- et tri-méthyle uniquement la lysine 79 de l'histone H3

(Singer et al., 1998) située dans un domaine globulaire (Khan and Hampsey, 2002) et induit la repression des telomères⁶ (Fingerman et al., 2007).

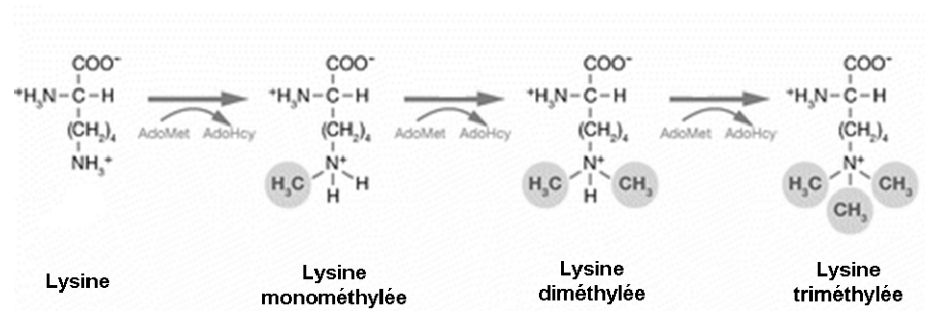


Figure 33 : Réaction de méthylation des lysines

D'après (Shilatifard, 2006) modifié.

La méthylation est un phénomène considéré comme moins dynamique que les autres modifications observées car il n'existe que deux familles de déméthylases identifiées à ce jour agissant uniquement sur les lysines :

LSD1/BHC110 qui agit sur les mono- et diméthylations de la lysine 4 de l'histone H3 (Lee et al., 2005; Shi et al., 2004).

La famille jumonji qui agit sur les diméthylations et triméthylation des lysines 4, 9 et 36 de l'histone H3 (Christensen et al., 2007; Cloos et al., 2006; Iwase et al., 2007).

Un mécanisme de déimination a été mis en évidence comme pouvant permettre la déméthylation des arginine en les convertissant en citrulline⁷ par la peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) (Cuthbert et al., 2004; Zhang et al., 2004)

2-2-1-3- La phosphorylation des histones.

Le phénomène a été observé pour la première fois dans les années 60 (Gutierrez and Hnilica, 1967) et depuis, de nombreuses sérine/thréonine kinases (HK : histones kinases) responsables ont été identifiées (ATM, Mst1, snf1, Ipl1/Aurora). La phosphorylation des histones va conduire aussi bien à des phénomènes de condensation

⁶ Un **téломère** est une région hautement répétitive, donc non codante, d'ADN à l'extrémité d'un chromosome.

⁷ La **citrulline** est un acide aminé non essentiel c'est-à-dire qu'il peut être fabriqué à partir d'autres acides aminés présents dans le corps. Cet acide aminé n'est donc pas codé par le code génétique dans l'ARN et ce titre, n'entre pas dans la composition des protéines.

que de relâchement de la chromatine en fonction du résidu touché (figure 30). La réaction 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 qui conduit à un changement de charge des histones.

Le niveau de phosphorylation des histones varie beaucoup au cours du cycle cellulaire et entre en jeu dans de nombreux évènements cellulaires qui lui sont liés telles que la condensation des chromosomes lors de la mitose (Wei et al., 1999), la réparation de l'ADN (Celeste et al., 2003), l'apoptose (Ahn et al., 2005; Cheung et al., 2003) et l'activation de la transcription (Fischle et al., 2005; Nowak and Corces, 2004).

La phosphorylation du variant H2AX de l'histone constitue un marqueur des zones d'ADN à réparer et permet le recrutement de complexe de réparation *via* un remodelage de la chromatine (Fillingham et al., 2006). Ainsi, l'acétyltransférase GCN5 reconnaît l'histone H3 phosphorylée sur la sérine 10 (Clements et al., 2003) et le complexe INO80 dépendant de l'ATP vient remodeler l'ADN pour le rendre accessible aux réparations (van Attikum et al., 2004).

2-2-1-4- Les autres modifications des histones.

- L'ubiquitination.

L'ubiquitination est principalement connue pour provoquer, suite à l'attachement de quatre ubiquitines (76aa) ou plus à des protéines solubles, leur protéolyse sélective par le protéasome 26S. Dans le cas des histones, on observe une mono-ubiquitination qui ne conduit pas à la protéolyse mais à l'association ou la dissociation de complexes multiprotéiques sur l'ADN. La réaction d'ubiquitination est réalisée par une cascade de réactions enzymatiques (figure 34).

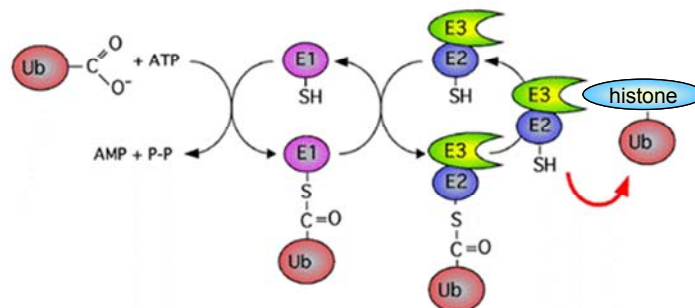


Figure 34 : La cascade réactionnelle d'ubiquitination des histones

Trois familles d'enzymes sont requises pour ubiquitiner les protéines (E1 à E3). Les membres des familles E2 et E3 forment des complexes qui s'associent avec la protéine-cible; E3 fournit l'association à la cible et E2 fournit l'ubiquitine. L'enzyme E1 est d'abord conjuguée à l'ubiquitine (sur un résidu cystéine), qu'elle transfère à l'enzyme E2, également sur un résidu cystéine. E3, le partenaire de E2, permet de recruter l'histone et de transférer l'ubiquitine sur cette dernière.

Elle a un effet activateur ou répresseur en fonction du résidu touché et du contexte. Ainsi, lorsque H3K4 et H3K79 sont méthylées, on pourra observer l'ubiquitination de l'extrémité N terminale de l'histone H2B, qui conduira à une activation de la transcription par perturbation de la structure nucléosomale, permettant la fixation des facteurs de transcription (Xiao et al., 2005). Elle aura par contre, un effet répresseur au niveau de l'histone 2A sur la lysine 119 en permettant l'inactivation du chromosome X chez les mammifères (de Napoles et al., 2004).

L'ubiquitination des histones H3 et H4 participe quant à elle à la réponse cellulaire du dommage à l'ADN en contribuant au recrutement des protéines de réparation de l'ADN endommagé *via* le complexe Cul4-DDB1-ROC1 (ubiquitin ligase complexe) (Wang et al., 2006).

Cette modification exerce donc une fonction dans différents mécanismes telles que la spermatogenèse, la réponse au stress, ainsi que dans la formation de l'hétérochromatine et la régulation de la transcription.

- La SUMOylation.

Les quatre histones peuvent être SUMOylées *in vivo*, aboutissant à la liaison covalente d'une ou de plusieurs protéines SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier : petites protéines d'une centaine d'acides aminés) sur un résidu lysine. Cette modification interfère avec les phénomènes d'acétylation et d'ubiquitination et conduit à un effet répresseur de la transcription en recrutant des histones déacétylases et la protéine hétérochromatinienne HP1 (Nathan et al., 2006; Shiio and Eisenman, 2003).

La réaction de SUMOylation fait intervenir une cascade de réactions enzymatiques similaire à l'ubiquitylation (figure 35).

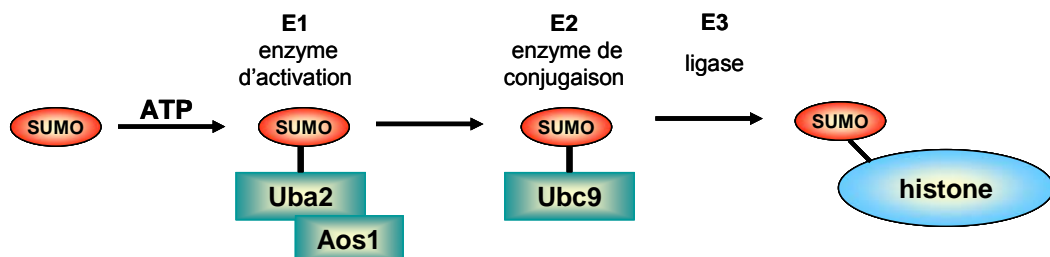


Figure 35 : Cascade réactionnelle de SUMOylation des histones

Le groupement SUMO se lie au complexe enzymatique d'activation Aos1/Uba2 à la suite d'une étape nécessitant la présence d'ATP. SUMO est ensuite transféré sur l'enzyme de conjugaison Ubc9 avant de se lier à l'histone grâce à l'intervention d'une ligase.

- L'isomérisation.

Les queues des histones existent dans différentes conformations qui jouent un rôle sur la liaison entre les histones et l'ADN (White et al., 2001). Ainsi, lorsque la proline 38 située à la base de l'histone H3 est en conformation *cis*, cela place la queue à proximité de l'ADN ce qui favorise les liaisons histone/ADN par cette zone (figure 36A), et stabilise la conformation (Luger et al., 1997). Il semble que la conformation de la P38H3 soit importante pour le bon fonctionnement de la méthylase Set2 sur K36H3 et le passage à une transcription active (figure 36B) (Nelson et al., 2006).

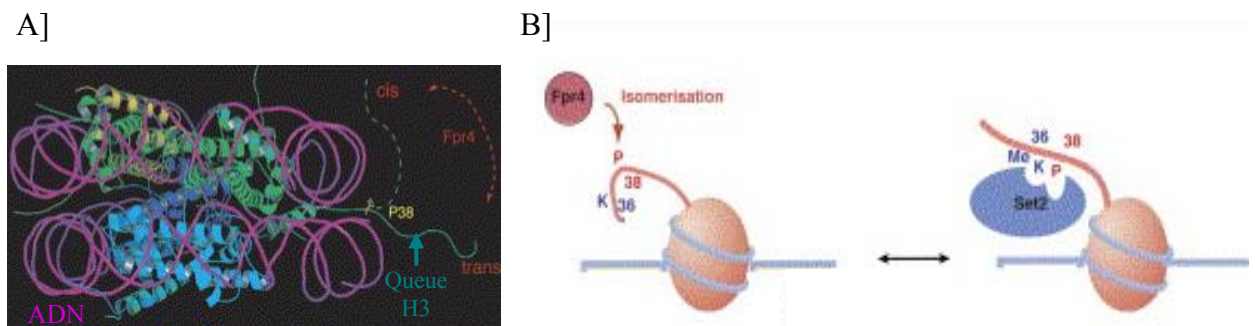


Figure 36 : L'isomérisation des histones

D'après (Nelson et al., 2006) modifié

A] La proline 38 est localisée à proximité du site de liaison entre l'ADN et la queue de H3. Fpr4 catalyses l'interconversion entre les conformations *trans* P38 et *cis* P38. Les deux formes *cis* et *trans* de la queue de H3 sont présentées sur le même nucléosome. **B]** Fpr4 régule la méthylation de H3 en K36 et l'activité du gène. En conformation *cis*, la queue de l'histone ne peut être méthylée et la chromatine reste dans un état inactif. En conformation *trans*, la méthylation peut avoir lieu par la méthyltransférase (set2), permettant l'activation du gène.

2.2.2- Les facteurs de remodelage de la chromatine ATP dépendants.

Le remodelage de la chromatine par les facteurs ATP dépendants co-existe avec les modifications post traductionnelles des histones. Les deux phénomènes coopèrent pour moduler l'état d'accessibilité de la chromatine à la machinerie transcriptionnelle (Flaus and Owen-Hughes, 2004). Les facteurs de remodelage ont tous en commun une sous-unité catalytique ATPase ayant un domaine hélicase. L'activité ATPase permet au complexe de modifier la structure nucléosomique, en partie grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP (Travers, 1999).

Il existe quatre grandes familles de complexes remodelant la chromatines classées selon la similarité de leur sous unité ATPase (figure 37).

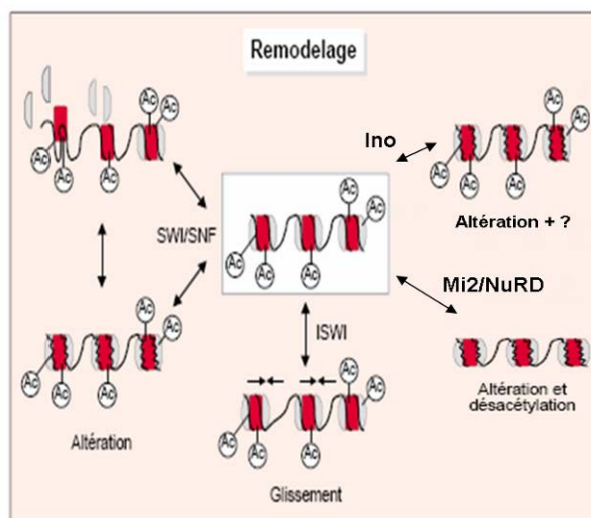


Figure 37 : Les mécanismes d'action des facteurs de remodelage de la chromatine ATP dépendants.

D'après (Taddei A, médecine/sciences 2000) modifié.

Il existe quatre grandes familles de facteurs de remodelage de la chromatine ATP dépendant qui en modifiant la position des nucléosomes rendent la chromatine accessible aux facteurs de transcription et à la machinerie cellulaire. Les complexes **SWI/SNF** et **Ino** provoquent une dissociation des nucléosomes. Dans le cas du complexe **Mi2/NuRD** cette dissociation s'accompagne d'une désacétylation des histones par les HDACs qu'il contient, et enfin, le complexe **ISWI** conduit à un glissement des nucléosomes.

2.2.2.1- La famille SWI/SNF (switch/ sucro non fermenting).

C'est un très gros complexe constitué de onze sous-unités dont certaines vont être spécifiques du tissu dans lequel elles se trouvent (Wang, 2003). Leur sous-unité catalytique est constituée des facteurs BRG1 ou BRM. Ces complexes sont impliqués dans les programmes de développement des muscles, du sang, du squelette, des neurones, du système immunitaire, dans la ségrégation chromosomique, le contrôle du cycle cellulaire, la différenciation ... (Becker and Horz, 2002; de la Serna et al., 2006; Li et al., 2007b; Peterson, 2002). Ils provoquent la dissociation des nucléosomes de façon à libérer l'ADN et de le rendre accessible à la machinerie transcriptionnelle (Gutierrez et al., 2007; Korber et al., 2006; Liu et al., 2006). Ils sont généralement recrutés sur les promoteurs par des facteurs de transcription, ainsi le facteur C/EBP β peut induire la liaison du complexe SWI/SNF afin de permettre la transcription du gène de l'ostéocalcine⁸ chez le rat (Villagra et al., 2006). Cependant, ils peuvent également contenir un bromodomaine C terminal leur permettant de reconnaître les lysines acétylées sur les histones ; le complexe

⁸ L'ostéocalcine est une protéine spécifique des tissus osseux favorisant la fixation du calcium à la substance fondamentale

aura dans ce cas une action directe sur la chromatine au niveau du promoteur activé (Dhalluin et al., 1999; Marmorstein and Berger, 2001; Zeng and Zhou, 2002).

2.2.2.2- *La famille ISWI (Imitation of switch1).*

Ce sont des complexes de plus petite taille (300-800 kDa) contenant de deux à quatre sous unités. Chez l'homme, les complexes RSF (Remodeling and Spacing Factor) et WCRF (WSTF related Chromatin Remodeling Factor) ont été identifiés. Ils jouent un rôle dans la structuration et la maintenance des chromosomes (Deuring et al., 2000), l'espacement régulier des nucléosomes (Loyola et al., 2003), ainsi que dans l'initiation et la régulation de la transcription.

Contrairement aux complexes SWI/SNF, ils ne possèdent pas la capacité de briser les nucléosomes mais vont les faire glisser sur l'ADN de façon à modifier leur espacement permettant ainsi la fixation de la machinerie transcriptionnelle (Fazio and Tsukiyama, 2003; Saha et al., 2006; Zofall et al., 2006). En effet, l'activité ATPase permet au complexe de modifier la structure nucléosomale grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP en altérant les liens entre l'ADN et les histones. Ils sont ainsi impliqués dans la formation d'environnements chromatiniens répressifs. La liaison de ces complexes à l'ADN ne se fait pas *via* un bromodomaine mais un domaine SANT (Swi3, ADA2, N-CoR, TFIIB) capable de reconnaître les queues d'histones non acétylées pour les présenter aux autres enzymes du complexe (Boyer et al., 2004; Yu et al., 2003a).

2.2.2.3- *La famille MI2/NuRD*

Le nombre de sous unités varie d'un complexe à l'autre dans la famille mais il peut en compter jusqu'à dix-huit. Leur sous-unité ATPasique est constituée de Mi2 ou CHD (Chromodomain-Helicase ATPase DNA Binding Protein). (Pour revue voir (Denslow and Wade, 2007). Les membres de cette famille sont capables de lier l'ADN méthylé *via* les sous unité MDB2 (Methyl CpG Binding protein) (Hendrich and Bird, 1998) et p66 du complexe (Brackertz et al., 2006; Feng and Zhang, 2001). Le complexe NuRD possède la particularité d'avoir en plus de son activité ATPasique une activité déacétylase du fait de la présence d'HDAC 1 et 2 qui vont réprimer la transcription en parallèle du remodelage (Tong et al., 1998; Xue et al., 1998).

2.2.2.4- La famille Ino (Inositol).

Elle est constituée de gros complexes de quatorze à quinze sous unités impliqués dans l'activation de la transcription et la réparation de l'ADN (van Attikum et al., 2004). Ils contiennent un domaine ATPase/Hélicase leur permettant de briser les nucléosomes et possèdent deux sites conservés : TELY en N terminal et GTIE en C terminal (Shen et al., 2000).

Le mécanisme d'action de cette famille de complexes est pour le moment encore méconnu, mais elle possède la capacité aussi bien d'activer que d'inhiber certains gènes (Jonsson et al., 2004) et le complexe SWR1 est capable de remplacer le dimère H2A-H2B par le variant H2AZ-H2B modifiant ainsi la structure de la chromatine (Henikoff et al., 2004).

2.2.3- Les méthylations de l'ADN.

2.2.3.1- Généralités.

La méthylation de l'ADN est une modification épigénétique, c'est-à-dire qu'elle module l'activité du génome sans en affecter directement la séquence. Elle est héritable, mise en place et reproduite après chaque division cellulaire ; elle peut être créée ou modifiée en réponse à un facteur environnemental.

Théoriquement, toutes les bases de l'ADN peuvent être méthylées, mais chez l'homme, seule la cytosine peut subir cette modification. Elle consiste en un transfert d'un groupement méthyle (-CH₃) d'un groupement donneur SAM (S-Adenosyl Methionine), sur le carbone 5 de la cytosine (figure 38) (Bestor, 2000).

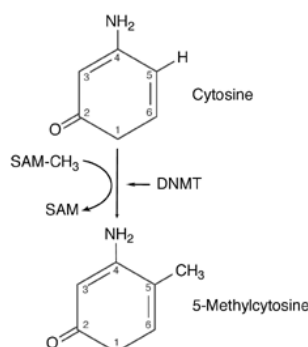


Figure 38 : Les mécanismes de méthylation de l'ADN.

(Strathdee and Brown, 2002)

La méthylation touche les cytosines de l'ADN. Le groupement SAM transfère un groupement méthyle sur le carbone 5 de la cytosine suite à l'action d'une DNMT.

Les cytosines touchées par la méthylation sont celles qui précèdent un résidu Guanine (G) (Gruenbaum et al., 1981). Les dinucléotides CpG ne sont pas répartis également sur tout le génome mais forment ce que l'on appelle des îlots CpG qui se regroupent essentiellement au niveau des régions proximales d'environ 60% des promoteurs (Robertson and Jones, 2000).

Chez l'homme, la méthylation de l'ADN est le plus souvent associée à une répression transcriptionnelle, car l'ADN méthylé est spécifiquement reconnu par différentes protéines qui répriment la transcription et favorisent la formation de l'hétérochromatine. Ainsi, le répresseur à domaine MDB (Methyl CpG Binding protein) se fixe sur l'ADN méthylé et est capable de recruter des HDAC qui, en déacétylant les histones, vont permettre de maintenir la chromatine dans un état condensé (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998).

2.2.3.2- Les ADN méthyltransférases.

Il existe trois familles d'ADN méthyltransférases identifiées à ce jour.

- DNMT 1 : elles sont impliquées dans le maintien des profils de méthylation au cours des divisions cellulaires (Pradhan and Esteve, 2003; Robertson et al., 1999). Elles agissent sur les sites hémiméthylés lors de la réplication de l'ADN pour maintenir la méthylation dans les deux cellules après division (Hermann et al., 2004b). Elles peuvent interagir via leur domaine N terminal avec des protéines telles que PCNA (proliferating cell nuclear antigen), hSNF2H, p21, HDAC1 et HDAC2 pour moduler l'expression des gènes (Hermann et al., 2004a; Ng and Bird, 1999; Robertson et al., 2004). De plus, les DNMT1 sont également impliquées dans les mécanismes de réparation « mismatch » (Pradhan and Esteve, 2003).

- DNMT 2 : elles présentent une forte homologie de séquence avec les DNMT1. Elles sont impliquées dans la reconnaissance de l'ADN endommagé, des recombinaisons et dans la réparation des mutations (Okano et al., 1998; Pradhan and Esteve, 2003).

- DNMT 3

Les DNMT 3a et 2b présentent des fortes homologies de séquences mais sont codés par deux gènes différents et l'une ne peut se substituer à l'autre (Xie et al., 1999). D'un point de vue structural, elles possèdent un domaine PWWP (Qiu et al., 2002), permettant leur interaction avec l'ADN et des régions régulatrices pouvant fixer des facteurs répresseurs

de la transcription. Ainsi, DNMT 3a peut lier le corépresseur RP58, le facteur oncogénique PML-RAR et HP1 β ; alors que DNMT 3b s'associe à Sin 3a, SUMO1 : Ubc9 et hSNF2H (Geiman et al., 2004; Pradhan and Esteve, 2003). Ces deux DNMT sont capables d'interagir avec DNMT 1 et d'activer HDAC1 (Deplus et al., 2002). Du fait de leurs différentes interactions, elles sont impliquées dans le remodelage de la chromatine associé à la modulation de la transcription des gènes.

DNMT 3a est une méthyltransférase ubiquitaire alors que DNMT 3b présente une expression différentielle en fonction des tissus. Ainsi elle sera très faiblement exprimée, sauf dans les testicules, la thyroïde et la moëlle osseuse (Xie et al., 1999).

DNMT 3l (DNMT 3 like) constitue une sous catégorie à part puis qu'elle présente la particularité de ne pas posséder d'activité catalytique propre. Elle contribue à l'effet de DNMT 3a et 3b, en liant leurs extrémités C terminales, elle induit un changement de conformation du site de fixation du substrat augmentant ainsi leur niveau d'activité (Gowher et al., 2005; Suetake et al., 2004).

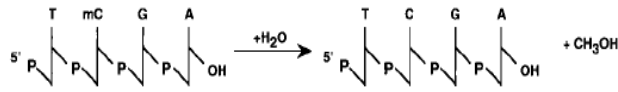
2.2.3.3- La déméthylation.

Au cours du développement et lors des tumeurs on observe des déméthylations de l'ADN (Baylin and Herman, 2000; Jones and Takai, 2001). Les mécanismes de la déméthylation sont encore inconnus mais il semble évident que des déméthylases existent (Patra et al., 2008). A partir d'extraits de cellules, une 5-Methylcytosine déméthylase a pu être isolée : elle permettrait d'éliminer le groupement méthyle de la cytosine, (Ramchandani et al., 1999) (figure 39A).

Par ailleurs, une autre hypothèse avait été émise pour expliquer la déméthylation de l'ADN, faisant intervenir une glycosylase de façon à exciser la base méthylée qui est ensuite remplacée par les endonucléases de réparation de l'ADN (Jost et al., 1997; Jost et al., 1995) (figure 39B).

Enfin, un troisième mécanisme a été mis en avant pour expliquer la perte des méthylation au cours des divisions cellulaires (pour revue (Wolffe et al., 1999)). Des facteurs se fixeraient sur la chromatine lors de la séparation de l'hélice d'ADN de telle sorte que les DNMT1 ne puissent plus accéder à l'ADN pour le reméthyler les cytosines. Les méthylation seraient donc diluées au cours des divisions successives.

A. 5-Methylcytosine demethylase



B. 5-Methylcytosine / DNA glycosylase

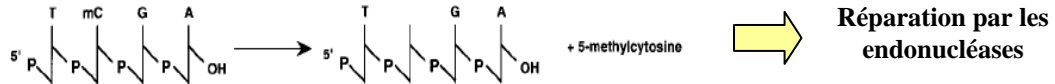


Figure 39 : Mécanismes hypothétiques de déméthylation de l'ADN.

D'après (Wolffe et al., 1999) modifié.

A] L'action d'une déméthylase qui agit spécifiquement sur les lysines. B] L'action d'une glycosylase qui excise la base méthylée de l'ADN, ADN est ensuite réparé par des endonucléases

3- Les mécanismes de modulation de l'expression du VIH-1.

Le génome viral, à l'instar du reste de l'ADN cellulaire est compacté (Pomerantz et al., 1990). L'intégration du LTR à lieu entre deux nucléosomes particuliers Nuc 0 et Nuc 1 (Jordan et al., 2003; Verdin, 1991; Verdin et al., 1993). Ces nucléosomes délimitent une région ouverte où les facteurs de transcription (NF-kb, Sp1...) peuvent venir se fixer (el Kharroubi and Verdin, 1994) (Figure 40). Cependant, Nuc 1 est situé sur le site de départ de la transcription, ce qui nécessite son déplacement pour que le complexe de préinitiation puisse avancer sur l'ADN (Henderson et al., 2004; Verdin et al., 1993) : il joue donc un rôle important dans le maintien du blocage de la transcription.

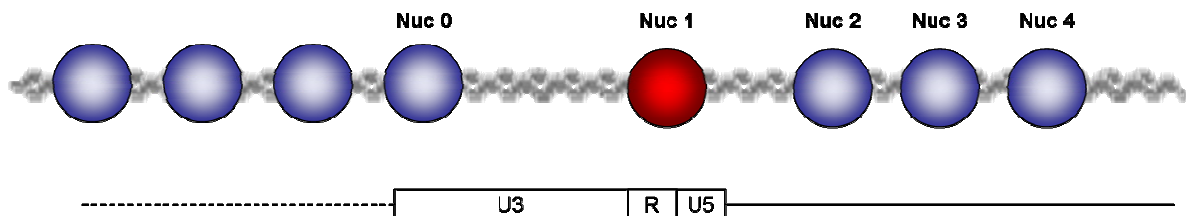


Figure 40 : L'insertion particulière du promoteur viral.

Redessiné d'après (Verdin et al., 1993).

La séquence promotrice du VIH-1 est insérée entre les nucléosomes nuc0 et nuc1 qui délimitent une zone ouverte accessible aux facteurs de transcription. Le nucléosome 1 (en rouge) est situé sur le site d'initiation de la transcription empêchant la liaison de l'ARN polymérase II, un remodelage de la chromatine est donc nécessaire pour permettre la transcription virale.

Le remodelage de la chromatine au cours de l'infection par le VIH-1 joue un rôle dans les modulations de la latence virale (Marcello, 2006) et modifie, comme pour les gènes cellulaires, l'accessibilité des enzymes à l'ADN viral (Jordan et al., 2001).

3.1- Les mécanismes de régulation de la phase initiale (ou phase précoce).

La régulation a lieu au niveau de la région U3 ouverte du promoteur viral (située entre les deux nucléosomes nuc0 et nuc1) et dépend du type cellulaire et de l'état physiologique des cellules infectées. En effet, le promoteur viral contient de nombreux sites de fixation pour des facteurs de transcription mais seuls quelques sites sont utilisés en même temps. Ainsi, les combinaisons de facteurs vont être différentes d'un type cellulaire à un autre pour moduler la transcription virale (pour revue voir (Rohr et al., 2003b)).

De plus, au cours de la phase précoce, le niveau de la transcription est faible, il va être modulé par la présence de cytokines (IFN γ , IL-1 β , TNF α ...) (Pour revue voir (Copeland, 2005)) et par l'état de différenciation des cellules. La voie NF-kB et la maturation cellulaire vont ainsi faciliter la réplication virale.

Nous ne nous intéresserons ici en détails qu'aux cellules microgliales qui constituent notre modèle d'étude.

Des facteurs à la fois activateurs et répresseurs agissent sur le promoteur viral pour réguler sa transcription, mais de façon générale l'effet résultant est activateur.

Dans les cellules microgliales, le facteur de transcription Sp1 joue un rôle majeur dans l'activation des gènes viraux (figure 41). En effet, il va servir de point d'ancrage pour la fixation d'autres facteurs de transcription activateurs au niveau du promoteur viral à proximité de la séquence TATAA (-68/+29) : COUP-TF *via* son domaine de liaison à l'ADN (Rohr et al., 1997) et NF-IL6 (Schwartz et al., 2000).

Par ailleurs, le facteur de transcription Sp3 se fixe également aux boîtes GC (Majello et al., 1994) mais pour induire une répression de la transcription (Rohr et al., 1997) *via* le recrutement de C/EBP γ qui va contrer une partie de l'effet activateur induit par NF-IL6 (Schwartz et al., 2000).

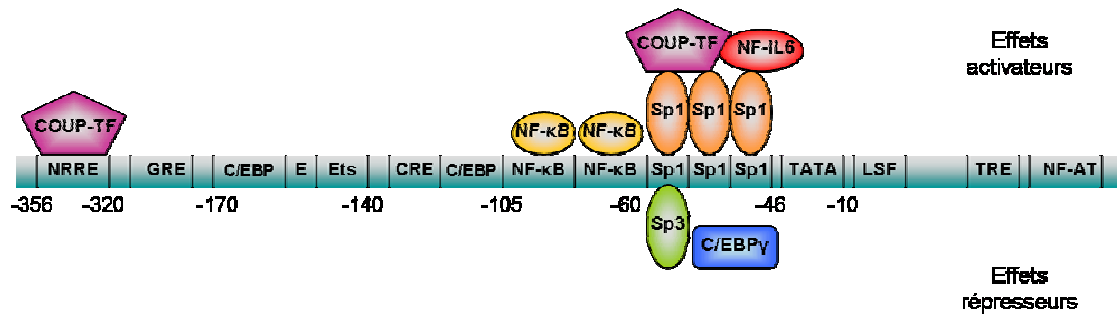


Figure 41 : Les facteurs de transcription liés au promoteur viral dans les cellules microgliales.

Le promoteur viral présente de nombreux sites de fixation pour des facteurs de transcription. Dans les cellules microgliales, les facteurs COUP-TF, NF-κB, Sp1 et NF-IL6 ont été identifiés comme des activateurs de la transcription virale, alors que Sp3 et C/EBPγ sont des répresseurs.

Au cours de la phase précoce, quelque soit le type cellulaire, la majorité des transcrits sont uniquement initiés par l'ARN polymérase II recrutée par NF-κB sur le promoteur viral (Kim et al., 2006) et seule une faible proportion sera élonguée en l'absence de Tat (Kao et al., 1987). Par ailleurs, un certain nombre de brins d'ADN viraux non intégrés vont également être transcrits et élongués au cours de cette phase, permettant la production de la protéine Tat nécessaire à la phase tardive et la transcription de gènes précoces.

3.2- Les mécanismes de régulation de la phase tardive.

La phase tardive commence lorsque le facteur viral Tat est produit en assez grande quantité dans la cellule infectée : il va alors pouvoir influencer la transcription virale en la transactivant.

3.2.1- Initiation de la transcription.

Après activation du promoteur via la recrutement de facteurs de transcription cellulaires, Tat va se fixer au complexe de préinitiation déjà en place et interagir avec TFIID (Cujec et al., 1997; Parada and Roeder, 1996) et TBP (Majello et al., 1998). Tat va ainsi faciliter la phosphorylation du domaine CTD (Garcia-Martinez et al., 1997) et augmenter le nombre de démarrages (100x) de la transcription par l'ARN pol II en augmentant la processivité de l'enzyme (Jones and Peterlin, 1994). Celle-ci va alors transcrire les cinquantes premières bases qui contiennent la région TAR et faire une pause du fait de la présence des facteurs négatifs d'élongation, DSIF (DRB Sensitivity Inducing Factor) et

NELF (Negative Elongation Factor) qui stabilisent sa structure (Peterlin and Price, 2006; Wu et al., 2003).

3.2.2- Elongation.

Après la transcription des cinquantes premières bases, le complexe TFIIH se dissocie de l'ARN pol II (Zawel et al., 1995), et la protéine Tat, activée suite à l'acétylation de la lysine 28 par PCAF (p300/CREB-binding protein-associated factor) (Benkirane et al., 1998) se fixe à la TAR nouvellement formée *via* son domaine riche en arginine (figure 42).

Tat recrute ensuite le complexe P-TEFb, composé de la cyclin T1 et de CDK9 (Li et al., 2005b; Wei et al., 1998) *via* la cycline T1 qui se fixe à la boucle de la TAR (Fong and Zhou, 2000). Le complexe formé repositionne ainsi la kinase du complexe P-TEFb sur le domaine CTD de l'ARN pol II de façon à l'hyperphosphoryler sur la sérine 2 afin d'augmenter sa processivité (Isel and Karn, 1999). De plus, le complexe P-TEFb phosphoryle les facteurs négatifs d'élongation, DSIF et NELF (Fujinaga et al., 2004; Ping et al., 2004; Ping and Rana, 2001), libérant la polymérase qui pourra alors poursuivre la transcription au-delà des cinquantes premières bases (Peterlin and Price, 2006).

Tat acétylée sur la lysine 50 par p300 et GCN5 (general control of amino acid synthesis 5) se détache de la TAR (Col et al., 2001; Kiernan et al., 1999) mais reste liée avec P-TEFb au complexe d'élongation jusqu'à la fin de la transcription du génome viral (Molle et al., 2007). Enfin, Tat est désacétylée par SIRT1 et se trouve à nouveau disponible afin de transactiver la transcription de nouveaux transcrits viraux (Pagans et al., 2005).

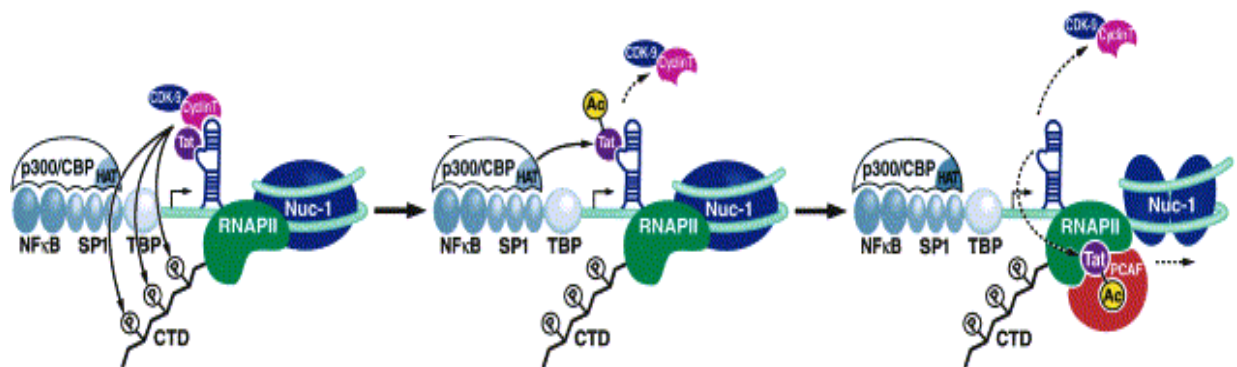


Figure 42 : La transcription virale en présence de Tat

(Kaehlcke et al., 2003)

En présence de Tat, le complexe CDK9/CyclinT (P-TEFb) hyperphosphoryle le domaine CTD de l'ARNpol II, puis Tat est acétylée sur la lysine 28 par l'acétyltransférase p300, entraînant la dissociation du complexe P-TEFb de la TAR. Tat est ensuite acétylée sur la lysine 50 par PCAF qui recrute Tat sur l'ARNpol II qui poursuit l'élongation transactivée par Tat.

3.3- L'impact des modifications de la chromatine au cours de la transcription virale.

3.3.1- Les modifications des histones influençant la transcription virale.

La modification des histones remodèle la chromatine du promoteur viral mais régule aussi les propriétés cellulaires et la liaison des facteurs de transcription (Van Lint, 2000; Ylisastigui et al., 2004). Ainsi les HDAC et HAT interviennent dans la modulation de la transcription des gènes viraux (Benkirane et al., 1998; Lusic et al., 2003).

Des études récentes ont montrés que différents facteurs de transcription tel que Sp1, YY1 LSF et NF-kB p50 étaient capables de recruter des HDAC qui vont remodeler la chromatine au niveau du promoteur viral afin de le maintenir dans un état quiescent (Coull et al., 2000; Jiang et al., 2007; Williams et al., 2006). Des inhibiteurs d'HDAC tel que l'acide Valproïque sont capables, à court terme, de diminuer le stock de cellules infectées de façon latente *in vivo* en réactivant leur transcription, ce qui les rendent accessibles à la trithérapie (Lehrman et al., 2005) mais ces résultats, à long terme, sur la réelle possibilité d'éradiquer les réservoirs sont sujets à controverse (Siliciano et al., 2007).

Il semble tout de même que l'utilisation d'inhibiteurs de HDAC soit une possibilité thérapeutique dans l'avenir afin de purger les réservoirs viraux et éradiquer le virus de l'organisme. En effet des études réalisées sur des cellules en culture ont montré qu'un blocage du recrutement de HDAC 1 sur le promoteur viral permettait de réactiver la transcription dans des lymphocytes infectés de façon latente, les rendant ainsi accessible aux thérapies (Ylisastigui et al., 2004).

3.3.2- Les facteurs de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP.

Le complexe de remodelage SWI/SNF a été mis en évidence comme le principal acteur du déplacement du nucléosome Nuc 1, après son recrutement par Tat acétylée. En effet, différents composants de ce complexe, tels que BRG1 et INI-1, ont été retrouvés liés au LTR transcriptionnellement actif (Agbottah et al., 2006; Yung et al., 2004).

De plus, Tat acétylée sur la lysine 28 est capable d'interagir *via* son motif riche en arginine (ARM) avec la sous-unité enzymatique du complexe SWI/SNF, conduisant ainsi à l'activation du promoteur intégré (Henderson et al., 2004; Mahmoudi et al., 2006; Treand et al., 2006) (figure 43).

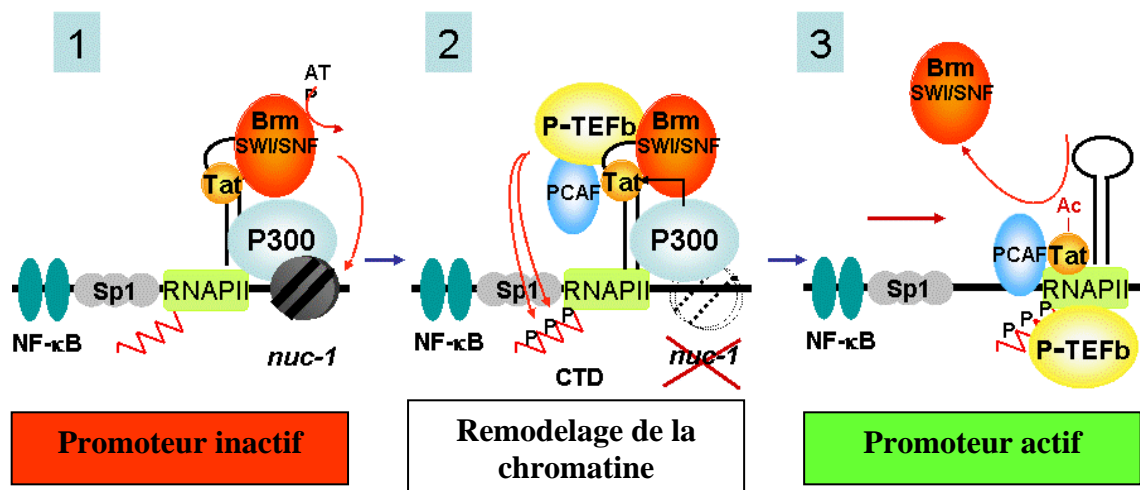


Figure 43 : modèle de l'activation du promoteur du VIH-1 par la protéine virale Tat.

[www.http://Institut.cochin.inserm.fr](http://Institut.cochin.inserm.fr)

1] Après l'initiation de la transcription, Tat fixée à la TAR recrute le complexe de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP : SWI/SNF. **2]** Le complexe va provoquer la dissociation du nucléosome 1 (*nuc-1*) qui bloque la progression de l'ARN poll. **3]** Le site d'initiation de la transcription étant libéré, le promoteur actif permet l'expression du génome viral.

3.3.3- Les méthylations de l'ADN.

Les effets de la méthylation de l'ADN sur la transcription virale sont controversés. Mais il semble y avoir un lien entre l'état d'activation du génome virale et le niveau de méthylation. Dans les cellules infectées de manière latentes, l'extrémité 5' est hyperméthylée alors que l'extrémité 3' est hypométhylée. Lors de la réactivation des cellules, on observe une diminution de la méthylation en 5' ; la forte méthylation semble donc aller de pair avec un état répressif du génome viral. (pour revue voir (Yedavalli and Jeang, 2007)).

3.4- Le mécanisme d'action des ARNs interférents : des régulateurs post-transcriptionnelle inducteurs de latence.

3.4.1- L'origine des ARN interférents.

Les ARN interférents peuvent réguler post-transcriptionnellement le niveau d'expression des gènes, en régulant le transfert et la stabilité des ARN messagers dans le cytoplasme (Jackson and Standart, 2007; Pillai et al., 2007). Présents naturellement dans les cellules, ils ont deux origines possibles :

- Les miARN (microARN) sont impliqués dans la régulation de processus biologiques et des modifications de leur expression ont été observées dans de nombreuses pathologies telle que le cancer (Bushati and Cohen, 2007; Chang and Mendell, 2007; Kloosterman and Plasterk, 2006). Ils proviennent de gènes cellulaires ou viraux codant spécifiquement pour des ARN interférents (Lecellier et al., 2005) (figure 44). Les ARN simples brins correspondants synthétisés adoptent une structure secondaire en épingle à cheveux du fait de leur séquence (pri-miARN). Cette structure est réduite à 70-100 nucléotides (pre-miARN) par une ribonucléase de type III (Drosha) (Lee et al., 2003) associée à un cofacteur (DGCR8) (Han et al., 2004). Elle est ensuite exportée vers le cytoplasme par l'exportine 5 (Yi et al., 2003) où elle va s'associer avec la protéine Dicer. Le pre-miARN est processé en un ARN double brin linéaire de 20 à 31 nucléotides possédant des extrémités 5'-P et 3'-OH libres, avec 2-3 nucléotides non appariés en 3' (miARN double brin) (Elbashir et al., 2001). Un des brins du miARN, dit passager, est éliminé tandis que l'autre (appelé « guide ») est transféré par à un gros complexe multiprotéique, le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex) constitué de : TRBP (HIV-1 TAR RNA-binding protein), PACT et Ago2 (Argonaute 2)(Chendrimada et al., 2005; Lee et al., 2006). Le miARN « guide », entraîne le complexe RISC vers les ARNm possédant une séquence partiellement complémentaire à la sienne : la traduction de l'ARNm cible est alors inhibée (Du and Zamore, 2007; Saxena et al., 2003).

- Les siARN ou petits ARNs interférents (small interfering RNA) proviennent de deux sources, exogène ou endogène. La source exogène correspond soit à l'apport extérieur d'un ARN double brin de façon expérimentale, soit à un apport en provenance de génomes à ARN comme ceux de certains virus à ARN tel que le VIH-1 (Bennasser et al., 2005). La source endogène correspond à une production naturelle par utilisation des parties exoniques (codantes ou non codantes) d'un gène plus étendu (Slotkin and Martienssen, 2007).

Le mécanisme d'action des siARN est similaire à celui des miARN, la différence réside essentiellement à l'étape de liaison des siARN aux ARNs messagers. Dans le cas des siARN, la complémentarité est parfaite ce qui conduit à la dégradation de l'ARNm cible par l'intermédiaire de la nucléase Ago2 (Hammond et al., 2001).

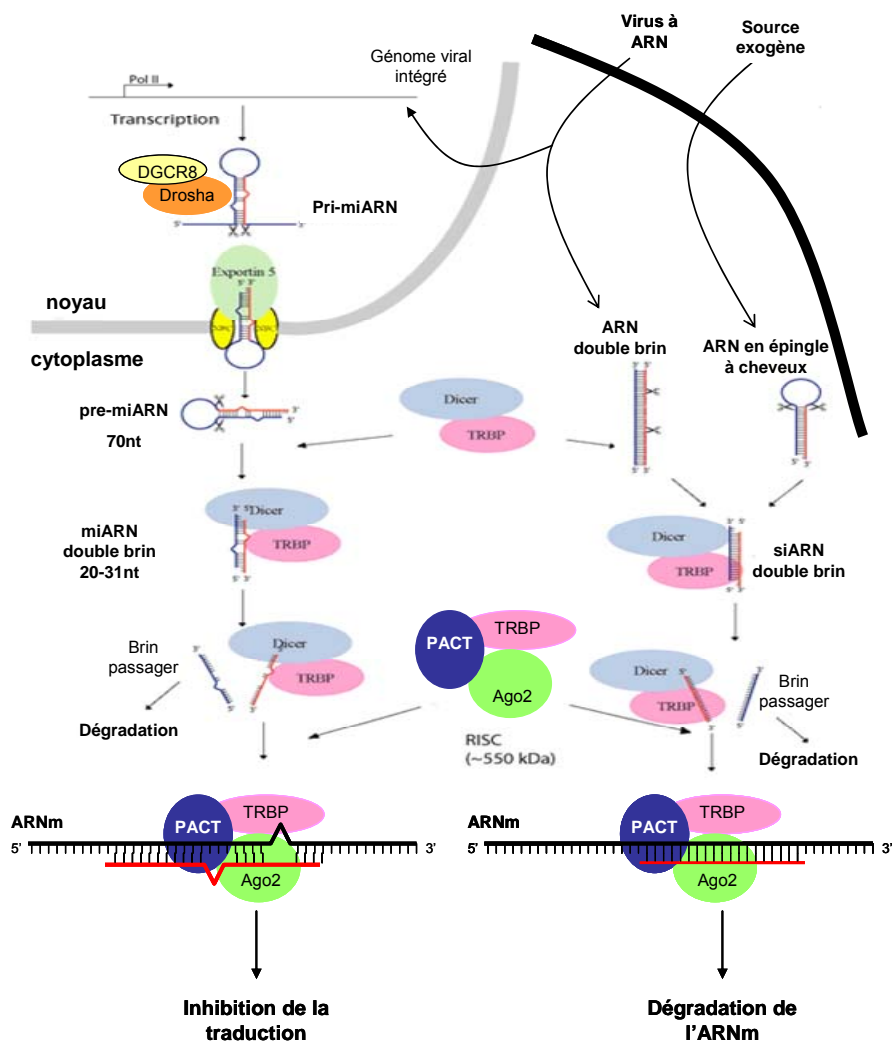


Figure 44 : Origine et mécanismes d'action des ARN interférents.

Adaptée de (Yeung et al., 2005)

Les miARN synthétisés à partir de gènes cellulaires ainsi que les siARN obtenus à partir de sources exogènes (expérimentateur ou virus) conduisent à un blocage de la traduction des ARN messager dans le cas d'une complémentarité partielle ou à une dégradation si la complémentarité est totale.

3.4.2- ARN interférents et VIH-1.

La présence de nombreux ARNs épissés ou semi-épissés dans les cellules latentes (Furtado et al., 1999; Lassen et al., 2006) met en évidence que le blocage transcriptionnel n'est pas la seule origine possible de la latence. Ainsi, des études réalisées sur des lymphocytes T CD4+ latents ont permis de mettre en évidence le rôle des miARNs cellulaires dans la latence. En effet, cinq miARNs (miR-28, miR-125b, miR-150, miR-382, miR-223) dirigés contre les ARNm viraux sont plus exprimés dans les cellules

latentes que dans les cellules actives (Huang et al., 2007). De plus, la diminution de l'expression de facteurs contrôlant la voie de synthèse des miARNs (Dicer et Drosha) permettent de lever la latence dans les lymphocytes T CD4+ (Triboulet et al., 2007). De plus, le génome du VIH-1 code également pour des siARNs capables de cibler les ARNm des régions : TAR, U3-R, gag, gag-pol, nef et R (Bennasser et al., 2004), il peut ainsi induire sa propre latence mais possède ensuite un système d'échappement (pour revue voir (Yeung et al., 2005). En effet, le génome viral code également pour un suppresseur de « silencing » des ARN qui entre en compétition avec le complexe RISC pour lier les siARN, empêchant ainsi leur activité (Bennasser et al., 2005). Par ailleurs, la TAR est capable d'induire la séquestration du facteur TRBP qui n'étant plus disponible rend le complexe RISC inactif (Bennasser et al., 2006), de même Tat est capable d'inhiber l'activité de Dicer (Bennasser and Jeang, 2006).

IV - La protéine Vpr : une protéine virale particulière aux activités multiples.

1- Généralités.

Vpr est indispensable au virus puisqu'en son absence, la pathologie ne se développe pas et que très peu de virus sont produits par les cellules infectées (Balliet et al., 1994; Wang et al., 1996). Elle est retrouvée sous forme libre dans les virions mais aussi dans le sérum et le liquide cébrospinal des patients sidéens suite à sa sécrétion par les cellules infectées (Levy et al., 1994; Tungaturthi et al., 2003).

Cette protéine est très conservée chez le VIH-1, le VIH-2 et le SIV (Tristem et al., 1990) montrant ainsi son importance pour le virus. De multiples rôles lui sont attribués au cours des différentes phases du cycle viral favorisant la réplication. Encapsidée associée dans les virions (275 molécules de Vpr / virions, (Muller et al., 2000)), elle est présente dès les premières phases de l'infection des cellules cibles et va participer aux premières étapes de l'infection conduisant à la production virale (Yuan et al., 1990). Vpr va ainsi participer à la transcription inverse, l'import nucléaire du PIC, la transactivation du promoteur viral, ainsi qu'au blocage du cycle cellulaire observé dans les cellules infectées et au phénomène d'apoptose induit par le virus (chacun de ces effets sera détaillé ultérieurement).

Du fait de ses actions à la fois cytoplasmiques et nucléaires et la nécessité de sa réencapsidation, la protéine Vpr est sujette au phénomène de navette (Sherman et al., 2003; Sherman et al., 2001).

2- Structure.

C'est une petite protéine basique d'environ 14kDa composée de 96 acides aminés. Sa structure tridimensionnelle a été mise en évidence par analyse RMN de la protéine soluble (Morellet et al., 2003; Wecker et al., 2002). Elle est constituée d'un cœur hydrophobe entouré de trois hélices alpha reliées par des motifs « boucle » (figure 45). On distingue trois régions majeures :

- La région 17-33 : elle est importante pour la localisation nucléaire (Yao et al., 1995).
- La région 38-50 : elle est responsable de l'oligomérisation de Vpr (Engler et al., 2002).
- La région 55-77 : elle permet la dimérisation de Vpr (Schuler et al., 1999), sa liaison à la nucléocapside (NCp7), son interaction avec l'ARN viral (de Rocquigny et

al., 1997) et elle est impliquée dans la localisation nucléaire de Vpr et dans les fonctions d'arrêt du cycle cellulaire au cours de l'infection (Zhou et al., 1998).

Les extrémités N et C terminales sont flexibles et chargées respectivement négativement et positivement. Les résidus prolines 14 et 35 en N terminal vont permettre l'interaction avec la cyclophiline A (Zander et al., 2003), alors que la région C terminale va permettre l'interaction avec la bicouche lipidique de la membrane cellulaire *via* le domaine PTD (Protein Transduction Domain).

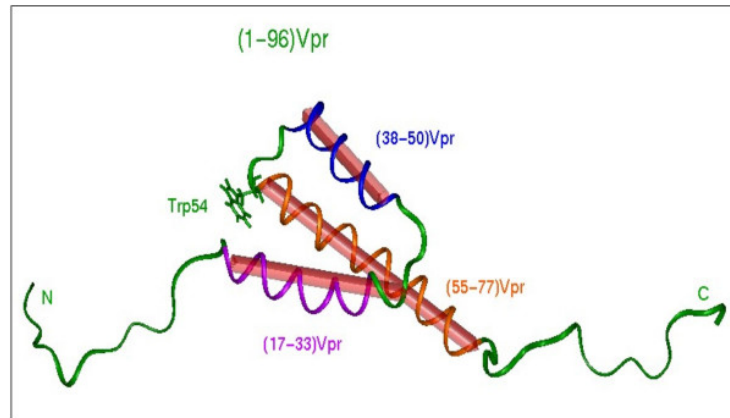


Figure 45 : Structure tridimensionnelle de la protéine Vpr .

(Le Rouzic and Benichou, 2005)

La protéine Vpr est constituée de trois hélices alpha (en rouge), qui correspondent aux trois domaines fonctionnels identifiés, séparées par des motifs « boucle » (en vert).

3- Les différents effets de Vpr au cours du cycle viral.

Au cours du cycle viral, Vpr va agir sur différentes étapes clés en interagissant à la fois avec des protéines virales et cellulaires.

3.1- Les effets au cours de la transcription inverse.

Vpr fait partie du complexe de préintégration avec la transcriptase inverse, la matrice, l'intégrase, la protéine p7 de la nucléocapside et l'ARN viral. La protéine Vpr reste fixée à l'ADNc nouvellement formé avec l'intégrase et la matrice d'ARN pendant 4 à 16h après l'infection (Fassati and Goff, 2001).

La transcriptase inverse induit un taux de mutation naturellement élevé lors de la transcription inverse du génome du VIH-1 car elle ne possède pas d'activité de détection et de réparation des erreurs. Ces mutations contribuent à la diversité génétique des virus (Temin, 1993). A chaque cycle répliatif, il y a de 3×10^{-5} à 4×10^{-5} mutations par paire de

base, avec le plus fréquemment une substitution de G en A ou de C en T ou bien des décalages du cadre de lecture.

In vivo, Vpr va influencer ce taux de mutation (Mansky, 1996) en interagissant avec une enzyme cellulaire, UNG2 (Uracyle DNA glycosylase), capable de réparer l'ADN (Mansky et al., 2000). L'incorporation létale d'un uracile dans l'ADN cellulaire peut être la conséquence d'une incorporation erronée de dUTP à la place d'un dTTP. Dans la cellule, l'intégrité de l'ADN génomique est conservée grâce à la mise en place de différentes voies de reconnaissance et de réparation de l'ADN endommagé. UNG est un acteur majeur de la voie BER (Base Excision Repair) qui répare les mésappariements U:A et U:G (Selig et al., 1997).

Vpr interagit, grâce au résidu Trp en position 54, avec l'extrémité C terminale de UNG2 (motif WXXF) sans perturber son activité enzymatique et la recrute au sein des particules virales. Cette association est critique pour l'infection des cellules en phase terminale de différenciation, telles que les macrophages qui sont riches en dUTP et pauvres en UNG2 (Chen et al., 2004b). Vpr va ainsi permettre de diminuer le taux de mutations létales dans l'ADNc viral.

Par ailleurs, Vpr en déstabilise la membrane de la mitochondrie (cf partie IV-3.3.3) permet la libération de la tRNA-lysil synthétase (LysRS) mitochondriale (Kaminska et al., 2007). L'ARNt lys, qui sert d'amorce à la transcription inverse, forme un complexe LysRS :ARNtlys, se liant à un dimère Gag-GagPol (Javanbakht et al., 2003) et à Vpr (Stark and Hay, 1998) pour être incorporé dans les particules virales (Jiang et al., 1993).

3.2- Les effets sur l'entrée nucléaire du virus.

Le PIC (Complexe de Pré-Intégration) qui va permettre l'entrée nucléaire de l'ADNc viral et de la machinerie protéique nécessaire au virus est composé à la fois de facteurs viraux et cellulaires ; toutefois, sa composition exacte est toujours soumise à débat. Il est pour le moment établi qu'il contient : Les protéines de la matrice (MA), la transcriptase inverse (RT), l'intégrase (IN), Vpr, les protéines de la nucléocapside (NC), des protéines à domaine HMG (Farnet and Bushman, 1997), le polypeptide 2 α associé à la lamine (Lamina Associated Polypeptide 2 = LAP2 α) (Suzuki et al., 2004), le facteur LEDGF/p75 (Lens Epithelium Derived Growth Factor) (Llano et al., 2004b; Vandegraaff et al., 2006) et le facteur limitant d'auto-intégration (Barrier to Autointegration Factor = BAF) (Lin and Engelman, 2003).

Le PIC a pour rôle de protéger l'ADNc viral et l'intégrase de la dégradation après la transcription inverse (Llano et al., 2004a), de permettre son transport jusqu'au noyau, et son intégration par l'intégrase dans le génome. De ce fait, sa composition va varier au cours du temps (Fassati and Goff, 2001).

Dans les cellules actives (en division), le virus va profiter de la rupture de l'enveloppe nucléaire lors de la mitose pour pénétrer dans le noyau et accéder à l'ADN génomique cellulaire (Roe et al., 1993). Mais le VIH infecte aussi des cellules qui ne se divisent plus (en phase G0 du cycle cellulaire), dans ce cas, un autre mécanisme d'entrée nucléaire est donc nécessaire (Heinzinger et al., 1994). Ces cellules, tel que les macrophages, constituent des cibles du virus lors des premiers temps de l'infection et contribuent à la mise en place des réservoirs viraux (Crowe et al., 2003; Yamashita and Emerman, 2006). Vpr constitue donc un facteur favorisant la persistance virale malgré les thérapies.

3.2.1- L'entrée par les pores nucléaires.

L'entrée nucléaire peut se faire grâce aux complexes de pores nucléaires (NPC) de façon passive lorsque les molécules ou complexes qui souhaitent passer font moins de 60kDa, soit environ 9nm de diamètre. Or, le PIC fait plus de 50nm de diamètre (Miller et al., 1997). Il est donc trop gros pour passer de façon passive et nécessite un transport actif pour pénétrer le noyau par l'intermédiaire des NPC. Pour ce faire, dans un premier temps, Vpr semble permettre le recrutement du PIC à la membrane nucléaire à proximité des NPC (Vodicka et al., 1998) par l'intermédiaire d'une interaction avec les nucléoporines Nup54, Nup58 (Popov et al., 1998a) et POM 121 (Fouchier et al., 1998) *via* le motif Phénylalanine-Glycine (FG) répété, ainsi que par son interaction avec hCG1 (Le Rouzic et al., 2002) (figure 46). On observe ainsi une accumulation de Vpr et du PIC à la membrane nucléaire (Popov et al., 1998b).

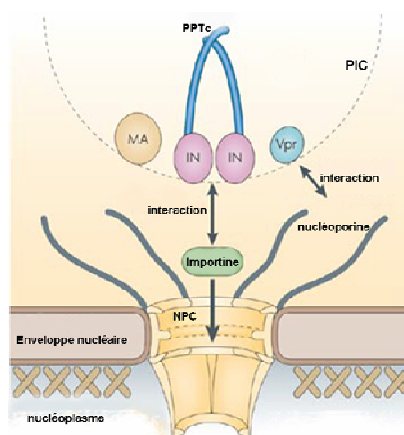


Figure 46 : Le passage du PIC par le complexe de pore nucléaire.

D'après (Suzuki and Craigie, 2007) modifié. En interagissant avec les nucléoporines, Vpr permet le recrutement du PIC au niveau du complexe de pore nucléaire. L'intégrase et la matrice vont ensuite permettre le passage du PIC par le pore en se liant à l'importine.

La translocation nucléaire aurait ensuite lieu grâce à l'intégrase et la matrice, qui possèdent des séquences NLS (Nuclear Localisation Signal) constituées d'acides aminés basiques (lysine et arginine) qui s'arrangent en une séquence continue –phe–lys–lys–lys–arg–lys–val– ou en une séquence interrompue –lys–arg–phe–ala–ala–thr–lys–lys–ala–gly–gln–ala–lys–lys–lys–lys–.

Les séquences NLS leurs permettent d'interagir avec l'importine α , qui reconnaît son récepteur l'importine β : cette interaction permettrait d'activer leur transport et celui des protéines qui leurs sont associées au niveau du pore nucléaire (figure 47).

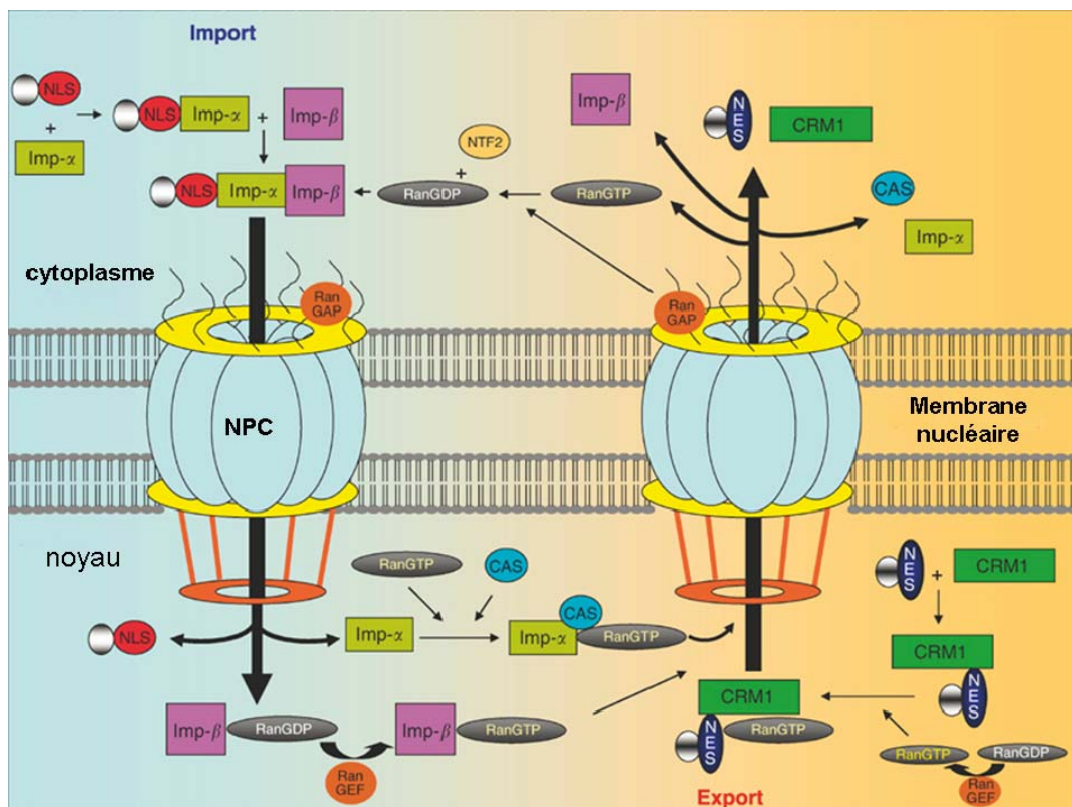


Figure 47 : Le mécanisme général d'action du pore nucléaire.

D'après (Faustino et al., 2007) modifié.

La séquence NLS des protéines est reconnue par l'importine α (Imp- α) qui lie alors l'importine β (Imp- β). L'ensemble est alors transporté dans le pore nucléaire. Une fois dans le noyau les importines sont dissociées et retransportées du côté cytoplasmique afin d'être disponibles pour un autre transport.

Par ailleurs, Vpr ne possède pas de véritable séquence NLS mais une séquence atypique (Karni et al., 1998) qui va lui permettre d'interagir avec l'importine α (Gallay et al., 1996). Il semblerait que cette interaction soit indispensable pour le passage du pore par le

PIC en renforçant la liaison établie entre l'intégrase, la matrice et l'importine α (Bukrinsky and Adzhubei, 1999).

3.2.2- Autre mécanisme d'entrée dans les cellules quiescentes ou différenciées.

Il semble que Vpr soit également capable de permettre le passage du PIC dans les cellules inactives en déstabilisant la membrane nucléaire.

Ainsi, l'entrée de protéines Vpr libres par le pore nucléaire (figure 48A) pourrait conduire à une altération de l'architecture de l'enveloppe nucléaire (figure 48 B-C), permettant le passage du PIC dans le noyau (figure 48D). En effet il a été observé la formation d'hernies et de trous dans l'enveloppe nucléaire, facilitant l'entrée du virus par déstabilisation de la lamine nucléaire (Chang et al., 2004; de Noronha et al., 2001; Segura-Totten and Wilson, 2001).

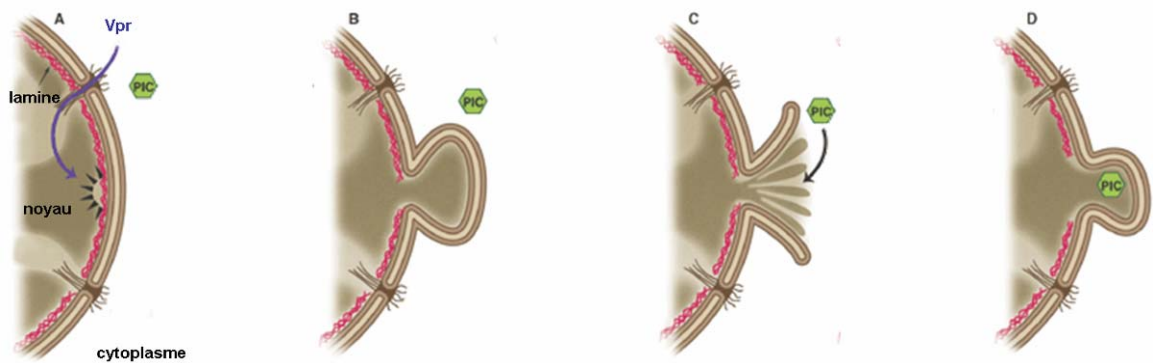


Figure 48 : L'entrée du PIC par déstabilisation de l'enveloppe nucléaire par Vpr.

D'après (Segura-Totten and Wilson, 2001) modifié.

Vpr entre dans le noyau par le pore nucléaire grâce à sa séquence NLS atypique et vient déstabiliser la lamine située sous la membrane nucléaire (A), celle-ci est déstabilisée (B) ce qui provoque sa rupture permettant ainsi l'entrée du PIC (C). La membrane nucléaire retrouve ensuite son intégrité et l'ADN viral peut rejoindre celui de la cellule hôte pour y être intégré (D).

Dans les cellules quiescentes ou différenciées, Vpr a donc un rôle essentiel pour l'entrée nucléaire.

3.3- Les effets sur le cycle cellulaire et l'apoptose.

Chez les patients infectés, Vpr est à l'origine d'une accumulation de cellules en phase G2 du cycle cellulaire, permettant une production virale optimale (Goh et al., 1998).

Les effets observés de Vpr sur le cycle cellulaire sont dus aux protéines encapsidées et non nouvellement formées, car le phénomène de blocage a lieu avant la phase

d'intégration du génome viral à celui de la cellule hôte. De plus, l'effet de blocage induit par Vpr est conservé dans de nombreux virus immunodéficients simiens, ce qui suggère un rôle important pour le virus (Planelles et al., 1996).

3.3.1- Généralités sur le cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire est divisé en différentes phases (figure 49) et les transitions entre chaque phase sont sous le contrôle de différents complexes et cascades protéiques. De cette façon, la cellule peut adapter sa progression dans le cycle en fonction des événements extérieurs (stress oxydatif, UV...) et intérieurs (dommage, réplication incomplète de l'ADN...).

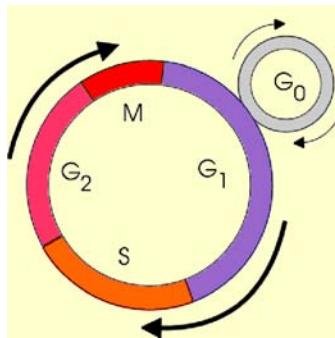


Figure 49 : Représentation schématique du cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire est composée de 4 grandes phases : La phase G1 qui constitue la phase de croissance cellulaire, la phase S au cours de laquelle l'ADN cellulaire est dupliqué, la phase G2 qui est une deuxième phase de croissance et enfin la phase M qui correspond à la mitose, c'est-à-dire à la phase de division cellulaire à proprement parler. Certaines cellules, comme les cellules dites quiescentes, sont dans une phase en dehors du cycle : la phase G0 au cours de laquelle aucune modification de l'ADN ni de la cellule n'a lieu.

Les complexes Cdk/Cycline (cyclin dependent kinase/cyclin) sont les complexes majeurs de contrôle du passage d'une phase à une autre (figure 50). En cas de problème mettant en jeu la survie et l'intégrité de la cellule, ces complexes peuvent bloquer la progression du cycle jusqu'à ce que le problème soit résolu ou induire la mort de la cellule si aucune réparation n'est possible ou si le blocage dure trop longtemps.

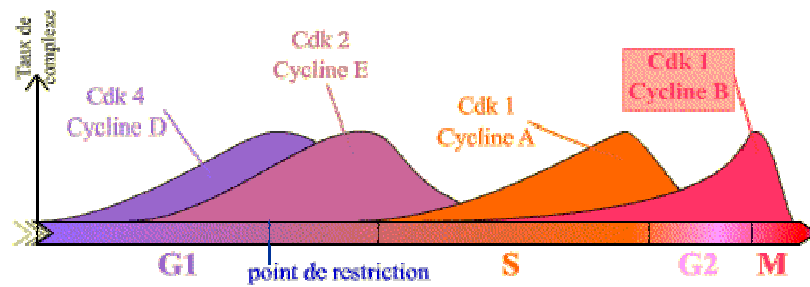


Figure 50 : Les complexes Cdk / Cycline impliqués dans les transitions entre les différentes phases du cycle cellulaire.

www.snv.jussieu.fr

Lors du cycle cellulaire, le passage d'une phase à l'autre est sous le contrôle de différents complexes protéiques qui permettent ou non la poursuite du cycle en fonction des anomalies éventuellement détectées. Chaque passage possède un complexe spécifique de contrôle composé d'une cycline et d'une kinase associée. Les taux de ceux-ci vont donc varier au cours du cycle.

3.3.2- Vpr et les voies de régulation du cycle cellulaire.

Vpr agit principalement sur les voies de régulation du cycle cellulaire mises en jeu lors des phénomènes de dommage à l'ADN qui provoque un arrêt du cycle en phase G2. De façon générale, Vpr va inhiber l'activité du complexe Cdc2/Cycline B (MPF=Mitosis Promoting Factor) qui régule le passage G2/M (He et al., 1995; Re et al., 1995) et induire la phosphorylation du variant X de l'histone 2A (H2A-X) qui marque les zones de l'ADN endommagé nécessitant une réparation par les endonucéases (Lai et al., 2005). L'inhibition du cycle cellulaire se fait de façon indirecte, en agissant sur les différentes cascades liées au complexe Cdc2/ Cyclin B (figure 51).

3.3.2.1- *Les effets sur la voie ATR (Rad3-related protein.)*

Vpr active la voie ATR (Roshal et al., 2003) et induit l'activation, par phosphorylation, de la protéine Chk1 (Checkpoint Kinase 1) (Li et al., 2007a), qui va inactiver la protéine CDC25 en la déphosphorylant. Le complexe MPF (Cdc2/Cyclin B) reste inactif et les cellules sont bloquées en phase G2.

La protéine Chk1 active également, en temps normal, la protéine Wee1 (Raleigh and O'Connell, 2000), ce qui provoque la phosphorylation du MPF sur la thréonine 14 et la tyrosine 15, bloquant l'accès au site de fixation de l'ATP sur le complexe et donc son inactivation.

Vpr va agir sur Wee1 de différentes façons :

- 1- en activant Chk1 (Zhu et al., 2003b),
- 2- en provoquant son autophosphorylation et donc un emballement du phénomène,
- 3- en recrutant une kinase intermédiaire encore inconnue et qui induirait son activation (Matsuda et al., 2006),
- 4- en relocalisant, dans le noyau, la sous unité B55 α de la phosphatase PP2A de façon à bloquer l'inactivation de Wee1 (Hrimech et al., 2000).

3.3.2.2- Les effets directs sur CDC25.

En temps normal, l'activité de CDC25 est régulée par son état de phosphorylation mais aussi par sa localisation cellulaire qui est sous le contrôle de la protéine 14-3-3. La protéine 14-3-3 est capable d'interagir avec la forme phosphorylée (active) de CDC25 pour l'emmener dans le cytoplasme et l'inactiver (Peng et al., 1997). Vpr sert de pont entre la forme non phosphorylée de CDC25 et la protéine 14-3-3 de façon à maintenir le pool de CDC25 activable non disponible, séquestré dans le cytoplasme et de maintenir les cellules en phase G2 (Goh et al., 2004; Kino et al., 2005).

De plus, en relocalisant la phosphatase PP2A dans le noyau, Vpr potentialise son effet d'inactivation sur CDC25 (Hrimech et al., 2000).

Par ailleurs, en interagissant avec MK2 (MAPKAP kinase-2), Vpr est capable de bloquer son activité kinase sur CDC25 (Huard et al., 2007) et ainsi d'induire sa séquestration dans le noyau le rendant indisponible pour activer le complexe MPF (Manke et al., 2005). Ainsi, Vpr possède une voie d'action supplémentaire pour bloquer le cycle en G2/M.

3.3.2.3- Les effets transcriptionnels sur les modulateurs du cycle cellulaire.

Le complexe MPF peut également être inhibé par la protéine p21 qui se lie à la cycline B et bloque le site de fixation de l'ATP rendant le complexe inactivable.

C'est le niveau d'expression de la protéine qui va déterminer si le cycle subit un blocage ou non, c'est donc en agissant sur son niveau d'expression que Vpr va agir sur le point de contrôle G2/M (Chowdhury et al., 2003). Le gène de p21 possède deux types de sites de fixation important sur son promoteur :

1- Six boîtes GC : elles permettent l'activation du gène *via* la fixation du facteur de transcription Sp1.

2- Trois sites de fixation du facteur p53, qui est activé lors du dommage à l'ADN. Or, nous avons vu précédemment que Vpr est capable d'interagir avec ces 2 facteurs de transcription. Vpr va donc coopérer avec Sp1 et également avec p53 pour augmenter le niveau d'activation du gène de p21 (Amini et al., 2004; Jayadev et al., 2007).

De plus, certains auteurs ont montré que Vpr était capable d'activer la voie ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) de réponse aux dommages de l'ADN, conduisant à la répression de l'expression des protéines du complexe cdc2/cyclineB par p53. Toutefois, ces résultats sont sujets à controverse (Nakai-Murakami et al., 2007).

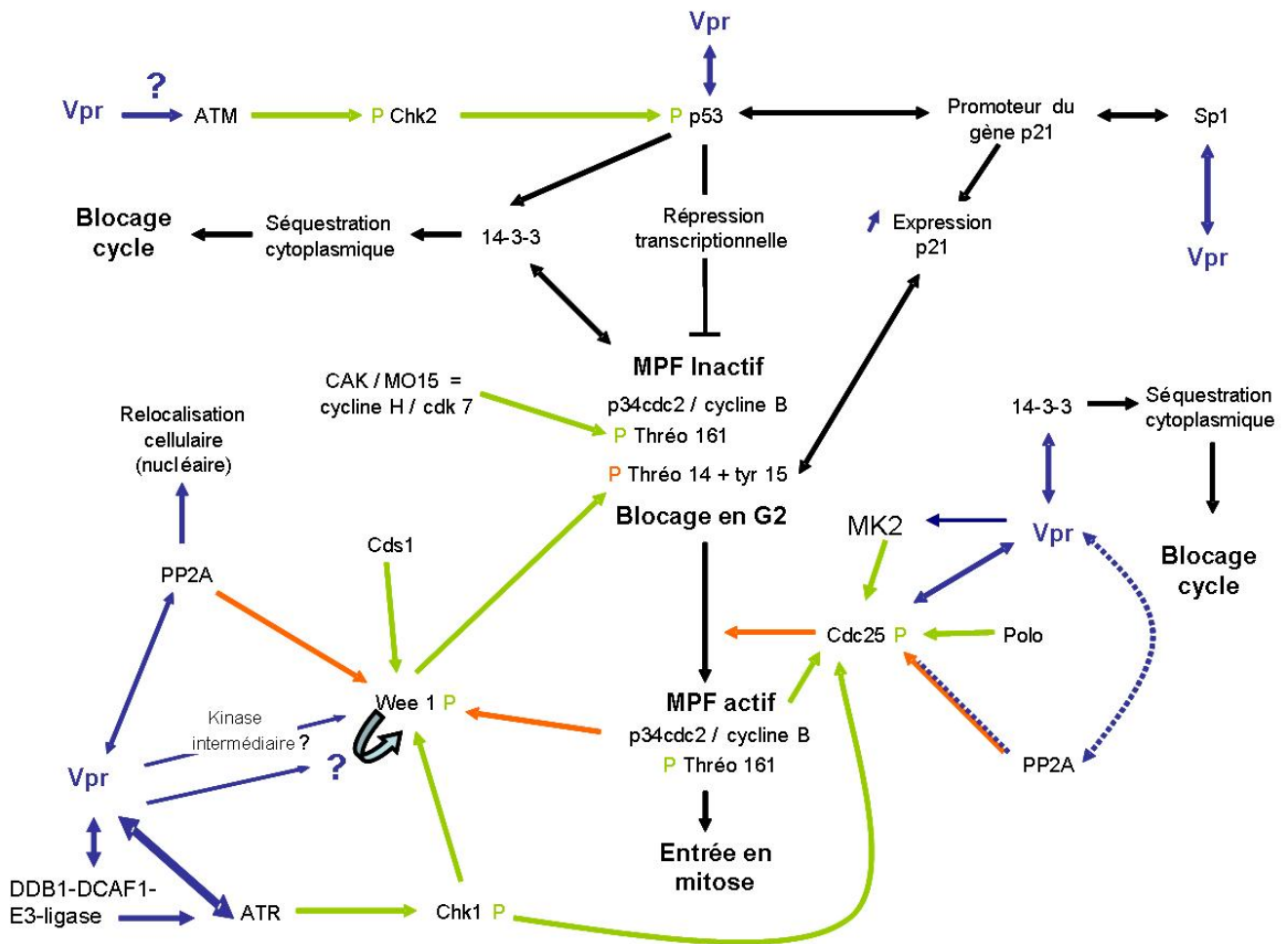


Figure 51 : Les différentes voies de régulation de la transition G2/M et les différentes actions de Vpr sur cette transition.



3.3.3- Vpr, un facteur apoptotique ?

L'induction de l'apoptose par Vpr peut être directement dépendante de l'arrêt du cycle cellulaire (Andersen et al., 2006) mais pas obligatoirement (Bolton and Lenardo, 2007). Elle est induite aussi bien dans des cellules infectées que dans les cellules saines environnantes *via* l'effet « bystander » (Levy et al., 1994; Levy et al., 1995). Cependant, dans les cellules infectées de façon productive, Vpr semble présenter également des effets anti-apoptotiques suivant le niveau de production des protéines virales (pour revue, (Moon and Yang, 2006)). Ainsi, lorsque le niveau d'expression de Vpr est faible, comme par exemple dans les premiers temps qui suivent l'infection, la cellule est protégée de l'apoptose par Vpr. Par contre, lorsque le niveau d'expression est élevé, Vpr favorise l'apoptose (Conti et al., 2000).

3.3.3.1-*Les effets pro-apoptotiques de Vpr.*

De nombreuses études montrent que la protéine Vpr est capable de provoquer l'apoptose des cellules, même non infectées. L'effet résulte essentiellement d'une perturbation du fonctionnement des mitochondries conduisant à l'activation de la voie des caspases par la protéine libre pouvant provenir du milieu extracellulaire (Chang et al., 2000; Muthumani et al., 2002b; Roumier et al., 2002; Watanabe et al., 2000). Comme pour le blocage du cycle cellulaire, Vpr semble posséder différents mécanismes d'actions (figure 53) :

- Une action directe sur les voies apoptotiques mitochondriales.

L'extrémité C terminale de Vpr (52-96) (Macreadie et al., 1997) est capable de lier l'ANT⁹ mitochondriale (Jacotot et al., 2000). Cette interaction conduit à la formation d'un canal perturbant la perméabilité membranaire de la mitochondrie et induisant la libération de Cytochrome c et l'activation de la caspase 9 (Muthumani et al., 2002a).

- Une action indirecte sur les voies apoptotiques mitochondriales.

En agissant sur le niveau de transcription de certains gènes cellulaires, Vpr peut moduler les effets apoptotiques. Ainsi, Vpr induit une augmentation de l'expression de la caspase 9, favorisant l'apoptose (Muthumani et al., 2002a). De plus, le facteur NF-kB est

⁹ La translocase des nucléotides adényliques (ANT) permet l'échange ATP / ADP entre le cytoplasme et la mitochondrie.

connu pour ces effets anti-apoptotiques en stimulant l'expression de gènes favorables à la survie de la cellule (TRAF-1, TRAF-2, C-IAP-1, CIAP-2, les membres de la famille Bcl2) (Beg and Baltimore, 1996; Beg et al., 1995; Chen et al., 2000). Vpr, en ayant une activité glucocorticoïde-like (Kino et al., 2002) supprime l'effet de NF- κ B en activant la synthèse de I κ -B (Auphan et al., 1997), diminuant ainsi l'expression des facteurs favorables à la survie cellulaire.

Par ailleurs, en jouant sur les voies de dommages à l'ADN lors de l'arrêt du cycle cellulaire, Vpr induit une augmentation de p53 qui conduit également à l'activation de la voie des caspases (Schuler and Green, 2001).

- Un effet via les voies de réparation du dommage à l'ADN.

Vpr interagit de façon directe avec l'enzyme responsable de l'excision des nucléotides lors de la réparation de l'ADN, ainsi qu'avec l'enzyme de réparation, l'uracile DNA glycosylase (UDG) (Bouhamdan et al., 1996; Selig et al., 1997). Cette interaction conduit au déclenchement de l'apoptose, mais les mécanismes exactes sont encore inconnus (Gaynor and Chen, 2001).

Par ailleurs, Vpr interagit avec le complexe DDB1-DCAF1-E3 ligase (figure 52a), *via* DCAF1, qui permet l'ubiquitination et la dégradation de protéines cellulaires régulatrices du cycle par le protéasome conduisant à l'activation du point de contrôle G2 et à l'apoptose des cellules (Dehart and Planelles, 2007; Le Rouzic et al., 2007; Wen et al., 2007). Le complexe, pour être activé, nécessite une étape de neddylation¹⁰ sur l'extrémité C terminale de Cul4A (Wu et al., 2000). Vpr est capable d'induire l'activation de la neddylation, permettant ainsi la polyubiquitination de Cul4A (Dehart and Planelles, 2008; Hrecka et al., 2007). Ce mécanisme serait responsable de la dégradation rapide des uracil DNA glycosylases, UNG2 et SMUG, par Vpr, empêchant le fonctionnement normal de la voie de réparation de l'ADN endommagé (figure 57b).

De plus, Vpr empêche la translocation nucléaire de DDB1 (Damage specific DNA Binding protein) en réponse à l'irradiation UV (figure 52b), ce qui diminue le taux de réparation dans les cellules infectées ; les erreurs, en s'accumulant, entraînent le blocage du cycle cellulaire et par la suite l'apoptose de la cellule (Dehart and Planelles, 2008; Schrofelbauer et al., 2007).

¹⁰ La neddylation est une modification post-traductionnelle des protéines par un polypeptide appelé NEDD8 en suivant un mécanisme très semblable à celui de l'ubiquitination.

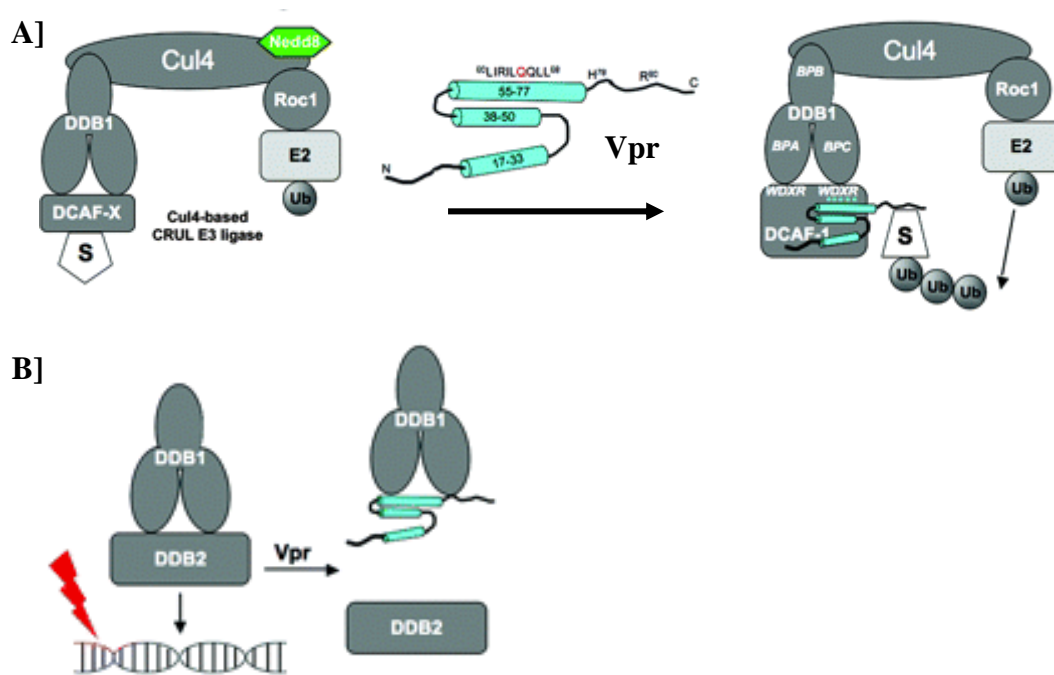


Figure 52 : Le complexe DDB1- DCAF1-E3 ligase.

D'après (Dehart and Planelles, 2008) modifié.

A] DCAF-1 peut interagir, *via* son motif WDXR, avec Vpr et la protéine à dégrader qui constitue le substrat (S) du complexe. Cela conduit à la polyubiquitination du substrat qui est ensuite dégradé par le protéasome. **B]** En interagissant avec DDB1, Vpr bloque son interaction avec DDB2 empêchant ainsi les mécanisme de réparation de l'ADN.

3.3.3.1- Les effets anti-apoptotiques de Vpr.

Lors des premiers temps de l'infection, après avoir induit l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M, Vpr agit sur le promoteur de la survivin (membre de la famille des IAP) pour augmenter son expression et inhiber l'apoptose induite par les facteurs extérieurs et l'infection (Zhu et al., 2003b). De plus, Vpr permet d'inhiber l'augmentation de l'expression de Bcl2 et Bax induite par les signaux apoptotiques, bloquant ainsi également une autre voie d'activation des phénomènes d'apoptose (Conti et al., 1998; Fukumori et al., 1998).

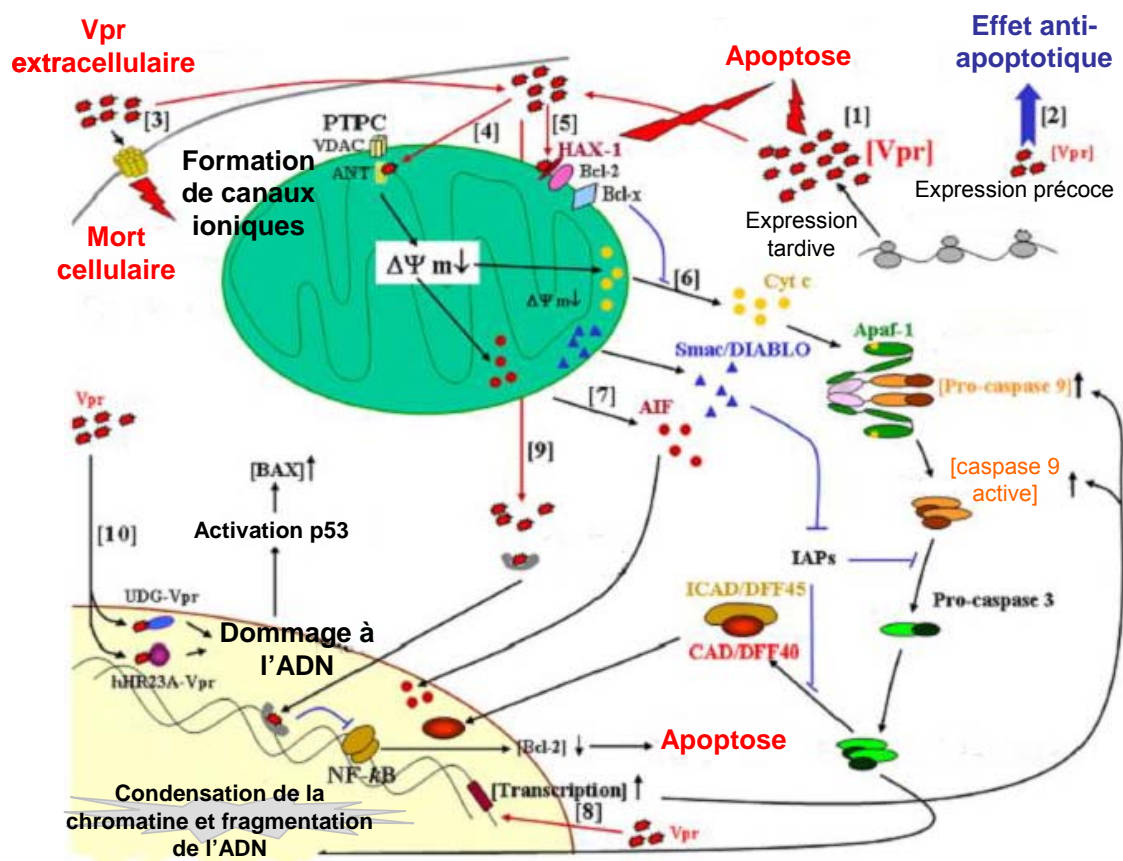


Figure 53 : Les différents mécanismes d'action de Vpr sur les voies apoptotiques

D'après (Moon and Yang, 2006) modifié

[1] un haut niveau d'expression de Vpr affecte le fonctionnement de la mitochondrie et induit l'apoptose de la cellule. [2] à l'inverse un faible niveau d'expression prévient les cellules de l'apoptose. [3] La protéine Vpr extracellulaire forme des canaux ioniques qui induit la mort de la cellule, ou bien, permettent l'entrée de Vpr dans la cellule, [4] Vpr interagit directement avec ANT et induit une variation du potentiel de membrane ($\Delta\Psi_m$), [5] Vpr induit une destabilisation de la mitochondrie qui conduit à la mort cellulaire, [6] la libération de cyt-c active la voie des caspases, [7] AIF induit une apoptose nucléaire. [8] Vpr affecte également la mitochondrie de façon indirecte en augmentant le niveau d'expression de la caspase 9, [9] ou en ciblant le récepteur des glucocorticoïdes et en supprimant NF- κ B. [10] Les effets sur la voie de la protéine p53 et de l'apoptose est incertaine.

3.4- Les Effets de Vpr sur la transcription virale.

Vpr est un transactivateur modéré du LTR viral *via* des effets indirects. Il est capable de faciliter la réplication dans les cellules en division (Eckstein et al., 2001). En effet, Vpr peut moduler l'activité du LTR en interagissant avec des facteurs liés à la transcription virale et à sa machinerie transcriptionnelle.

Tout d'abord, Vpr est capable d'interagir *via* son domaine basique C terminal avec l'extrémité N terminale de TFIIB¹¹ (Agostini et al., 1999). Cette interaction conduit à un changement de conformation de TFIIB qui facilite son assemblage avec l'ARN polymérase II (Kino and Pavlakis, 2004), conduisant à la stimulation de la transcription (Roberts and Green, 1994). De plus, outre l'effet qualitatif de l'interaction entre Vpr et TFIIB, un effet quantitatif est observé puisque le recrutement par Vpr permet d'augmenter la quantité de TFIIB recruté dans le complexe de pré-initiation favorisant ainsi la transcription virale (Kino and Pavlakis, 2004). Par ce mécanisme, vpr facilite l'expression rapide de la protéine Tat, permettant rapidement une production virale intense dans les cellules actives.

Le complexe ternaire Vpr-p21-p300 régule également l'expression du VIH-1. En effet, Vpr en se liant à Sp1, sur les sites correspondant du promoteur (Wang et al., 1995), peut également recruter la protéine p21 qui en interagissant avec p300 va favoriser la transcription virale (Cui et al., 2006), cet effet pouvant être modulé par une interaction avec p53 (Sawaya et al., 1998).

De plus, une étude a montré un effet direct de la protéine p21 qui en se fixant sur les sites NF- κ B par l'intermédiaire de p65 peut activer la transcription virale (Parker et al., 1996). Vpr étant responsable d'une augmentation de l'expression de cette protéine (Chowdhury et al., 2003), il favorise son effet direct sur le promoteur (Cui et al., 2006).

Enfin, Vpr stimule l'activité des facteurs de transcription NF- κ B et NF-IL6 impliqués dans l'activation de la transcription virale (Agostini et al., 1996; Forget et al., 2004; Roux et al., 2000). Vpr est capable d'induire en activant AP-1 la phosphorylation de I κ B, conduisant à la libération de NF- κ B, stimulant ainsi de façon indirecte la transcription (Varin et al., 2005).

De façon générale, les différentes études menées sur les effets de Vpr ont permis de mettre en évidence son importance dans la phase précoce de la transcription virale, en permettant son activation plus rapide et plus élevée, *via* le recrutement de facteurs activateurs sur le promoteur. De plus, la protéine Vpr libre sécrétée au niveau extracellulaire permet la réactivation des cellules infectées de façon latentes (Levy et al., 1994; Levy et al., 1995; Nakamura et al., 2002; Varin et al., 2005).

¹¹ **Le facteur de transcription IIB (TFIIB)** est un composant essentiel pour la formation d'un complexe d'initiation de la transcription lors de la transcription eucaryote et procaryote. TFIIB interagit avec le complexe promoteur contenant la TBP (TATA binding protein) pour faciliter l'interaction avec l'ARN polyméraseII et faciliter l'association de TFIIF.

Vpr possède donc de nombreux effets sur les différentes étapes du cycle viral et sur les modifications cellulaires permettant au virus d'infecter les cellules et de se répliquer dans les meilleures conditions et à un rythme soutenu. Elle est donc une des protéines virales les plus importantes et il est primordial de mieux comprendre ses mécanismes d'action pour pouvoir mieux les contrer.

Présentation du projet

En 2000, Avram. et collaborateurs mettaient en évidence deux protéines, CTIP1 (Bcl11a) et CTIP2 (Bcl11b), capables d'interagir avec les membres de la famille des facteurs de transcription COUP-TF (Avram et al., 2000) connus pour être impliqués dans la modulation de la transcription du VIH-1 (Rohr et al., 1999; Rohr et al., 2000). Elles ont la particularité de posséder plusieurs motifs en doigt de zinc dans leurs séquences (figure 54).

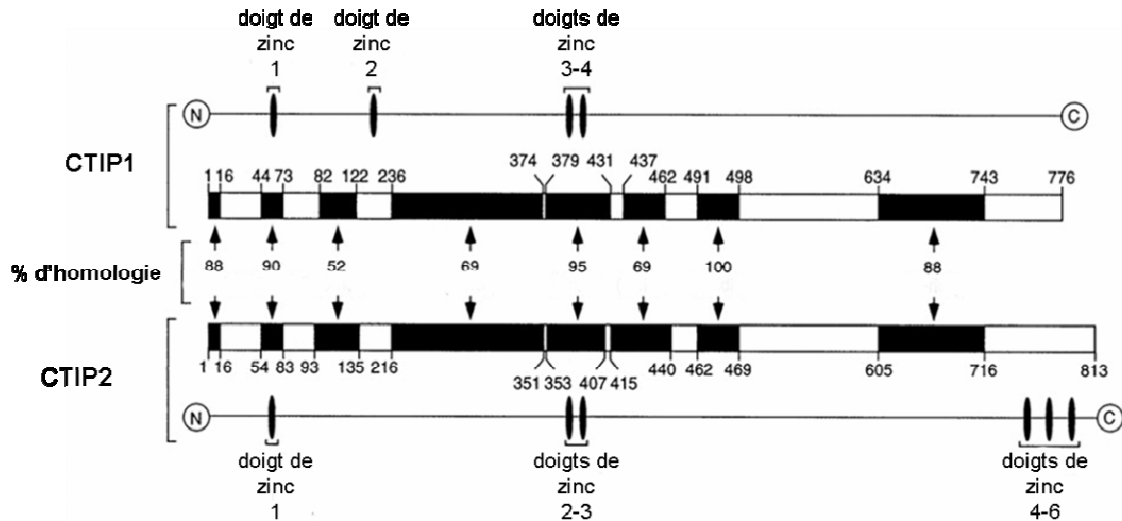


Figure 54 : Représentation schématique des protéines CTIP1 et CTIP2

D'après (Avram et al., 2000) modifié.

Les protéines CTIP1 et CTIP2 (COUP-TF Interacting Protein 1-2) présentent de fortes homologies de séquences. Elles sont caractérisées par la présence de motifs en doigts de zinc permettant leur interaction avec l'ADN.

Ces deux protéines sont fortement exprimées dans le cerveau et le système immunitaire, ainsi que dans le système nerveux (Avram et al., 2000; Leid et al., 2004; Satterwhite et al., 2001). CTIP2 permet le développement des projections axonales des motoneurones cortico-spinaux (Arlotta et al., 2005) et agit, dans le système immunitaire, sur la différenciation et la survie des thymocytes (Wakabayashi et al., 2003b), alors que CTIP1 agit sur le développement des lymphocytes B (Liu et al., 2003).

Les travaux antérieurs de l'équipe ont permis de mettre en lumière, dans les cellules microgliales, un effet répresseur de CTIP2 sur la réplication virale et un effet de relocalisation de la protéine virale Tat dans des structures nucléaires sphériques associées à la protéine HP1 α (Rohr et al., 2003a). Or, la protéine HP1 α est généralement liée à un état inactif de la chromatine, il semblerait donc que l'action de CTIP2 induise la

relocalisation de Tat dans des zones hétérochromatiniennes, ce qui favoriserait l'inhibition de la transcription (Rohr et al., 2003a).

Dans un premier temps, mon travail a donc consisté en l'étude des mécanismes moléculaires qui régissent l'inhibition de la transcription virale par CTIP2.

D'autre part, Les CTIPs ont également un impact sur le développement tumoral et l'apoptose. Ainsi, dans les souris KO pour CTIP2, les thymocytes semblent plus touchées par l'apoptose (Wakabayashi et al., 2003b), ce qui tend à démontrer un effet anti-apoptotique de ce facteur. Cet effet est également observé dans des lignées de cellules T (Grabarczyk et al., 2007; Kamimura et al., 2007b). De plus, des mutations ponctuelles et des délétions du gène de CTIP2 induisent des lymphomes, indiquant une fonction suppresseur de tumeur (Wakabayashi et al., 2003a). CTIP1, au contraire, serait à l'origine du déclenchement de leucémies myéloïdes (Nakamura et al., 2000). Les CTIPs semblent donc avoir un impact sur le cycle cellulaire.

Par ailleurs, des études ont montrées que le virus VIH-1 conduit, grâce à la protéine virale Vpr, à des modifications du cycle cellulaire, dans les lymphocytes, de façon à optimiser la production virale (Goh et al., 1998).

La protéine Vpr est capable, en interagissant avec le facteur de transcription Sp1 lié au promoteur du gène de p21, d'agir sur le niveau d'expression de cette protéine qui contrôle les points de passage du cycle cellulaire, (Amini et al., 2004; Vazquez et al., 2005).

L'étude des mécanismes moléculaires de CTIP2 sur le LTR ont permis de mettre en évidence l'interaction de CTIP2 avec le facteur de transcription Sp1 (figure 55). Le promoteur de p21 contenant également des sites de fixation pour ce facteur, nous avons cherché à déterminer si :

- CTIP2 était capable de moduler l'expression de p21 via les sites Sp1 de son promoteur, et si oui, quels sont les mécanismes mis en jeu.
- Et si CTIP2 avait un effet sur la surexpression de p21 induite par Vpr *via* les sites Sp1.

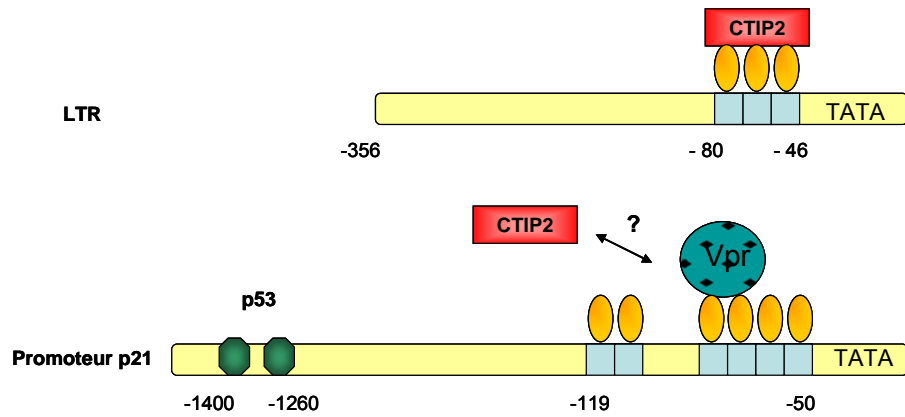


Figure 55 : Représentation des promoteurs du virus et du gène de p21, interaction via les sites Sp1 ?

Le facteur CTIP2 (en rouge) est recruté par Sp1 (en jaune) sur ses sites de fixation présent sur le promoteur pour induire une inhibition de la transcription virale (Marban et al., 2005). Le promoteur de p21 contient six sites de liaison pour Sp1 dans sa région proximale permettant la liaison de Vpr (en vert) et l'induction de la transcription de ce gène conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M. CTIP2 est-il capable d'interagir avec le promoteur de p21 et a-t-il un effet sur l'induction de la transcription par Vpr.

PUBLICATIONS

Publication 1

CTIP2 (COUP-TF Interacting Protein 2) réprime la phase initiale de la transcription des gènes du VIH-1 dans les cellules microgliales.

Au cours de la phase initiale régie uniquement par les facteurs cellulaires, Sp1 sert de point d'ancrage pour les facteurs COUP-TF (Rohr et al., 1997) et NF-IL6 (Schwartz et al., 2000) sur le promoteur viral pour activer la transcription.

Dans cet article, nous mettons en évidence le rôle inhibiteur de CTIP2 (COUP-TF Interacting Protein 2) sur la transcription et la réplication du VIH-1 : CTIP2 est capable d'inhiber l'activité stimulatrice de COUP-TF et de SP1.

Des expériences de GST Pull down nous ont permis de montrer que la région centrale de CTIP2 (145-434) (figure 58) pouvait former un complexe ternaire en s'associant avec les régions C terminale de SP1 et N terminale de COUP-TF. Ce complexe conduirait à une inhibition de l'activité stimulatrice induite par COUP-TF recruté par Sp1 sur le promoteur viral.

Ce complexe est visualisé en microscopie confocale dans des structures nucléaires sphériques associées à la protéine HP1 α qui est un marqueur de l'hétérochromatine. COUP-TF et SP1 semblent donc être relocalisés dans des zones transcriptionnellement inactives dans les cellules microgliales.

Dans un contexte cellulaire, des expériences d'immunoprécipitation chromatinienne (ChIP) et de retard sur gel montrent, que SP1 permet le recrutement de CTIP2 sur le promoteur proximal au niveau des boîtes GC et qu'il n'y a pas de compétition entre COUP-TF et CTIP2 pour la fixation à SP1. Ces résultats confirment la présence d'un complexe ternaire : SP1-CTIP2-COUP-TF sur le promoteur viral.

De plus, la protéine HP1 α mise en évidence au niveau des structures sphériques interagit avec l'extrémité C terminale de CTIP2.

Tous ces résultats montrent donc que SP1 permet de recruter CTIP2 sur le promoteur proximal, pour inhiber la transcription virale.

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

Céline Marban¹, Laetitia Redel¹, Stella Suzanne¹, Carine Van Lint², Dominique Lecestre¹, Sylvette Chasserot-Golaz³, Mark Leid⁴, Dominique Aunis¹, Evelyne Schaeffer¹ and Olivier Rohr^{1,5,*}

¹INSERM unité 575 Pathophysiology of Nervous System, Centre de Neurochimie, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France, ²Institute for Molecular Biology and Medicine, Laboratory of Molecular Virology, 12 rue des Professeurs Jeener et Brachet, 6041 Gosselies, Belgium, ³Unité CNRS UPR 2356, 5, rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France, ⁴Laboratory of Molecular Pharmacology, College of Pharmacy and Environmental Health Sciences Center, Oregon State University, Corvallis, Oregon 97331-3507 and ⁵IUT Louis Pasteur de Schiltigheim, 1 Allée d'Athènes, 67300 Schiltigheim, France

Received December 28, 2004; Revised and Accepted April 4, 2005

ABSTRACT

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gene transcription is characterized by two temporally distinct phases. While the initial phase relies solely on cellular transcription factors, the subsequent phase is activated by the viral Tat transactivator. We have previously reported that the subsequent phase of viral gene transcription can be repressed by the chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF)-interacting protein 2 (CTIP2) in human microglial cells [O. Rohr, D. Lecestre, S. Chasserot-Golaz, C. Marban, D. Avram, D. Aunis, M. Leid and E. Schaeffer (2003), *J. Virol.*, **77**, 5415–5427]. Here, we demonstrate that CTIP proteins also repress the initial phase of HIV-1 gene transcription, mainly supported by the cellular transcription factors Sp1 and COUP-TF in microglial cells. We report that CTIP2 represses Sp1- and COUP-TF-mediated activation of HIV-1 gene transcription and viral replication as a result of physical interactions with COUP-TF and Sp1 in microglial nuclei. Using laser confocal microscopy CTIP2 was found to colocalize with Sp1, COUP-TF and the heterochromatin-associated protein Hp1 α , which is mainly detected in transcriptionally repressed heterochromatic region. Moreover, we describe that CTIP2 can be recruited to the HIV-1 promoter via its association with Sp1 bound to the

GC-box sequences of the long terminal repeat (LTR). Since our findings demonstrate that CTIP2 interacts with the HIV-1 proximal promoter, it is likely that CTIP2 promotes HIV-1 gene silencing by forcing transcriptionally repressed heterochromatic environment to the viral LTR region.

INTRODUCTION

Infection of the central nervous system (CNS) by the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is associated with a spectrum of neurological damage, ranging from acute encephalopathies to AIDS dementia (1,2). The CNS constitutes a sanctuary and a reservoir for the virus despite antiretroviral therapies (3). Microglial cells, the CNS resident macrophages, may be particularly suitable for this purpose because they are long lived, HIV productive for several weeks and relatively immune to virus-induced cytopathology [reviewed in (4)]. Since microglial cells are the primary targets of HIV-1 productive infection within the CNS (5,6), investigation on HIV-1 repression in these cells are important for the global understanding of HIV pathogenesis and for the development of anti-HIV strategies.

HIV-1 gene transcription is a key step in the control of the virus life cycle [reviewed in (7)]. Viral gene transcription is characterized by two temporally distinct phases. The initial phase occurs immediately after integration and relies solely on cellular transcription factors. Most of the transcripts cannot elongate efficiently and terminate rapidly after initiation.

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

© The Author 2005. Published by Oxford University Press. All rights reserved.

The online version of this article has been published under an open access model. Users are entitled to use, reproduce, disseminate, or display the open access version of this article for non-commercial purposes provided that: the original authorship is properly and fully attributed; the Journal and Oxford University Press are attributed as the original place of publication with the correct citation details given; if an article is subsequently reproduced or disseminated not in its entirety but only in part or as a derivative work this must be clearly indicated. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oupjournals.org

However, a few transcripts elongate throughout the genome, resulting in transcription and expression of the viral transactivator Tat. The subsequent phase of transcription occurs when enough Tat protein has accumulated. Tat binds to TAR, recruits pTEFb complex and dramatically stimulates HIV-1 gene transcription [reviewed in (8,9)].

We have previously studied some of the cellular transcription factors that impact HIV-1 gene transcription in microglial cells. Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor I (COUP-TFI)/Ear3, Arp1/COUP-TFII and Ear2/COUP-TFIII proteins are the three members of the COUP-TF orphan nuclear receptors superfamily. We have described that the orphan nuclear receptor COUP-TFI/Ear3 (10,11) is expressed in numerous human CNS cell lineages, including microglial cells. COUP-TFI is an activator of HIV-1 gene transcription in oligodendrocytes (12), microglia (13) and T lymphocytes (14). Moreover, we have revealed the importance of functional interactions between the nuclear factor for interleukin 6 (NF-IL6), Sp1 and COUP-TFI in the regulation of the initial phase of HIV-1 gene transcription in brain cells (15). The transcription factor Sp1 is one of the crucial cellular proteins for efficient HIV-1 gene transcription (16–18). A number of studies have reported that Sp1 can serve as an anchor for indirect binding of other transcription factors to the HIV-1 long terminal repeat (LTR) region. In all cell types, an interaction between Sp1 and Tat is required for optimal HIV-enhancer activation (19). Moreover, Sp1 is able to recruit the Cyclin T1 subunit of P-TEFb to the LTR, which helps to bypass a requirement for TAR/Tat and promotes processive transcription without Tat (20). In microglial cells, the main HIV-1 target cells in the brain (6), Sp1 anchors COUP-TF (13) and NF-IL6 (15) to the three GC-boxes adjacent to the viral CATA box. The CATA box is used instead of the TATAA box for optimal HIV-1 gene transcription and replication (21). We have shown that Sp1 and COUP-TF interact and cooperate in the transcriptional activation of HIV-1 gene transcription (13). Moreover, COUP-TF can substitute to Sp1 association with the viral Tat protein to restore Tat function and HIV-1 replication in microglial cells (22). These results highlight the key roles of Sp1 and COUP-TF proteins in HIV-1 expression in microglial cells.

Members of the COUP-TF family have been shown to bind related zinc finger proteins named COUP-TF-interacting protein 1 (CTIP1) and 2 (CTIP2) that are highly expressed in brain and immune systems (23,24). Recent results support the selective contribution of these proteins in the development and function of the nervous and immune systems (24). We recently described that the nuclear cofactor CTIP2 inhibits the subsequent phase of HIV-1 gene transcription and viral replication by relocating the viral transactivator Tat protein to transcriptionally inactive regions of chromatin via Hp1 α (25). In the present work, CTIP2 overexpression leads to the repression of HIV-1 replication. In contrast, CTIP1 was unable to affect Tat function. Using confocal microscopy to visualize Tat subcellular distribution in the presence of each CTIP protein, we found that CTIP2, but not CTIP1, leads to the disruption of Tat nuclear localization and to its recruitment within CTIP2-induced nuclear ball-like structures. In addition, we showed that CTIP2 and Hp1 α associate with Tat to form a three-protein complex. These findings suggest that the

inhibition of HIV-1 expression by CTIP2 correlates with the recruitment of Tat within CTIP2-induced structures and its relocalization within inactive regions of chromatin.

On line with this study, we noticed that CTIP proteins also affect HIV-1 gene transcription in the absence of Tat, which means that CTIP proteins may also impair endogenous cellular transcription factor functions of importance for the initial phase of HIV-1 gene transcription.

Here, we report that CTIP proteins repress HIV-1 gene transcription via the proximal LTR region which binds Sp1 and COUP-TF transactivators. Since COUP-TF and Sp1 cellular transcription factors are two of the major contributors to HIV-1 gene transcription in microglial cells, we have postulated that Sp1- and COUP-TF-mediated LTR-driven activation may be impaired by CTIP1 and CTIP2. We report here that both CTIP1 and CTIP2 repress Sp1- and COUP-TF-mediated stimulation of HIV-1 gene expression. Since the CTIP2 repressive activity is much stronger than the CTIP1-mediated inhibition of HIV-1 replication, we focused our study on CTIP2. CTIP2-mediated repression of Sp1 and COUP-TF functions results from direct physical interactions of these cellular transcription factors with CTIP2. Association with CTIP2 forces Sp1 and COUP-TF relocation to CTIP2-induced subnuclear structures containing the heterochromatin-associated protein Hp1 α . Moreover, CTIP2 can be recruited to the HIV-1 promoter by a physical association with Sp1 bound to the GC-box regions of the LTR. Since Sp1 or COUP-TF transcription factors are necessary for the Tat function in microglial cells (22), CTIP2-mediated repression of COUP-TF and Sp1 functions may largely contribute to the previously described CTIP2-mediated impairment of Tat activity and viral replication in microglial cells (25).

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

Most of the constructs used in our assays were described previously: HIV-1 (LAI) 5' LTR chloramphenicol acetyltransferase (pLTR-CAT) (22), pGC-WAP-CAT (26), pLTR-LUC 287–535 (13), pLTR-CAT mutGC and pLTR-CAT Δ GC (22), pcDNA3, full-length constructs HA-CTIP1, Flag-CTIP2 and GST-CTIP2 (23), deletions constructs Flag-CTIP2 (25), RSV-COUP-TF, CMV-Sp1, GST-COUP-TF1, GST-COUP-TF2 and GST-COUP-TF3 (13).

Several plasmids were kindly provided by the following investigators: GST-Sp1 constructs were provided by H. Rotheneder (Vienna, Austria) (27) and pLTR-LUC by C. Van Lint (Gosselies, Belgium). pNL4-3 (28) was obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program, division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH.

To construct RFP-CTIP2, the expression vector Flag-CTIP2 was digested with EcoRI and the CTIP2 insert was subcloned into the EcoRI site of the pDSRed vector (Clontech). The GFP-Sp1 was constructed by isolating the XhoI-HindIII Sp1 insert from the GST-Sp1 expression vector and subcloned into the XhoI-HindIII sites of the pEGFP-C1 vector (Clontech).

Cell culture

The human microglial (provided by M. Tardieu, Paris, France) (29), the TZM-bl (30–32) and the HEK 293T cell lines were maintained in DMEM containing 10% fetal calf serum and 100 U/ml penicillin–streptomycin.

Viral replication

Microglial cells cultured in 12-well plates were transfected using the calcium phosphate coprecipitation method with HIV-1 pNL4-3 (1.5 µg), CMV-Sp1 (1 µg) or RSV-COUP-TF (1 µg) plasmids and the indicated HA-CTIP1 or Flag-CTIP2 expression vectors (0.1, 0.5 or 1 µg). Total amounts of DNA were identical in each experiment. Compensations were made by adding the corresponding empty vectors. Each transfection was carried out in duplicate and repeated a minimum of three separate times with two different plasmid preparations. HIV-1 replication was monitored as described previously (25).

CAT assays

Microglial cells cultured in 12-well plates were transfected using the calcium phosphate coprecipitation method with pLTR-CAT (3 µg), pGC-WAP-CAT (3 µg) or pLTR-CAT ΔGC (3 µg), CMV-Sp1 (1 µg) or RSV-COUP-TF (1 µg) plasmids and the indicated HA-CTIP1 or Flag-CTIP2 (0.1, 0.5 or 1 µg) expression vectors. Total amounts of DNA were identical in each experiment. Compensations were made by adding the corresponding empty vectors. Each transfection was carried out in duplicate and repeated a minimum of three separate times with two different plasmid preparations. CAT assays were carried out using standard techniques.

Co-immunoprecipitation assays

Microglial cells cultured in 100 mm diameter dishes were transfected using Lipofectamine™ 2000 Reagent (Invitrogen) with the indicated Flag-CTIP2 (30 µg). Twenty four hours post-transfection, the cells were washed twice with cold phosphate-buffered saline, harvested and prepared for nuclear extracts (12). Nuclear proteins were first diluted in TNE buffer [50 mM Tris, pH 8, 1% Nonidet, 2 mM EDTA, protease inhibitors cocktail (Roche)], cleared with Protein A/G Plus-Agarose (Santa Cruz Biotechnology) and finally incubated overnight with primary antibodies: anti-Sp1 (Sigma), anti-COUP-TF (kindly provided by J. E. Mertz, Madison, WI) or anti-Hp1α (kindly provided by R. Losson, IGBC, Strasbourg, France). The extracts were then immunoprecipitated by the addition of Protein A/G Plus-Agarose (Santa Cruz Biotechnology). After extensive washing with TNE buffer, the immunoprecipitates were processed for SDS-PAGE and western blot analysis.

Glutathione S-transferase (GST) pull-down assays

Production of GST fusion proteins was described previously (13) and visualized by Coomassie blue staining. The ³⁵S-labeled proteins were prepared by *in vitro* transcription and translation using the TNT® T7 Coupled Wheat Germ Extract System (Promega). GST pull-down assays were performed as described previously (25).

SDS-PAGE and western blot analysis

SDS-PAGE was performed using standard techniques. Proteins were detected using antibodies directed against the Flag epitope (M2 mouse monoclonal; Sigma), against the COUP-TF protein (kindly provided by J. E. Mertz) and against the Sp1 protein (Sigma). Proteins were visualized by chemiluminescence using the Super Signal Chemiluminescence Detection System (Pierce).

Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

The probe used in our experiments has been described previously (13) and corresponds to the three Sp1 binding sites of the HIV-1 proximal LTR region. Once produced, GST fusion proteins were eluted in glutathione buffer (50 mM Tris, pH 8, 20 mM reduced glutathione). Purified Sp1 (Promega) and GST fusion proteins were then incubated with the ³²P-labeled probe in binding buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 1 mM MgCl₂, 60 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT and 10% glycerol) at 4°C for 15 min. For supershift experiments, GST fusion proteins were incubated with the primary antibodies: anti-COUP-TF (kindly provided by J. E. Mertz), anti-CTIP2 and anti-Sp1 (Santa Cruz Biotechnology) for ~16 h before adding the probe. EMSA assays were performed as described previously (25).

Indirect immunofluorescence and confocal microscopy

Microglial cells cultured in 48-well plates were transfected or not using Lipofectamine™ 2000 Reagent (Invitrogen) with Flag-CTIP2, RFP-CTIP2 and/or GFP-Sp1 expression vectors. Cells were fixed and permeabilized as described previously (25). The coverslips were then incubated for 1 h at room temperature with primary antibodies directed against COUP-TF (Santa Cruz Biotechnology or kindly provided by J. E. Mertz), Sp1 (Sigma) and Hp1α proteins and/or against the Flag epitope (M2 mouse monoclonal; Sigma). The primary immunocomplexes were revealed by CY2- or CY3-labeled secondary anti-species antibodies. The stained cells were analyzed by confocal microscopy using a Zeiss laser scanning microscope (model 510 invert) equipped with a Planapo oil (63×) immersion lens (numerical aperture = 1.4).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays

TZM-bl and HEK 293T cells cultured in 100 mm diameter dishes were transfected using the calcium phosphate coprecipitation method with the indicated pLTR-LUC, pLTR-CAT mutGC and Flag-CTIP2 (30 µg) expression vector. ChIP assays were performed using the ChIP Assay Kit (Upstate) 48 h post-transfection. The primary antibodies used for the ChIP were anti-Sp1 (Upstate), anti-Hp1α (Upstate), anti-COUP-TF (Santa Cruz Biotechnology) and anti-Flag M2 mouse monoclonal (Sigma). DNA was subjected to PCR amplification using a 5' primer (5'-GATAAGGTAGAA-GAGGCC-3') corresponding to the LTR sequence located 293 nt 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 resulting PCR product (307 bp) was analyzed by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. Three separate experiments were performed.

RESULTS

CTIP1 and CTIP2 proteins repress HIV-1 gene transcription via the LTR proximal region

As previously shown, CTIP1 and CTIP2 proteins inhibited the LTR-driven transcription in transient transfection assays (Figure 1, lanes 2 and 3) (25). To delineate the LTR region responsible for CTIP1- and CTIP2-mediated HIV-1 gene transcriptional repression, microglial cells were transfected with a 5' deleted pLTR-CAT reporter plasmid in the presence or absence of CTIP1 and CTIP2 expression vectors. Deletion of the 5' region downstream of the two proximal GC-box sequences did not affect CTIP1 and CTIP2 ability to repress LTR-driven CAT activity (Figure 1, lanes 5 and 6), indicating that CTIP proteins repressive function can be mediated by the proximal region of the LTR encompassing two GC-box sequences, the CATA sequence (21) and the TAR region. We have previously observed that the cellular transcription factors, Sp1 and Sp3, are directly bound to the LTR GC-box sequences in microglial cells (13). Moreover, the orphan nuclear receptor COUP-TF is indirectly anchored to this region via its association with Sp1 (13). We have largely described that Sp1 and COUP-TF transcription factors are two of the major contributors to the initial phase of HIV-1 gene transcription in microglial cells (9,13,22). Taken together, these findings strongly suggest that CTIP repressive activity may result from impairment of endogenous Sp1 and COUP-TF protein functions.

CTIP1 and CTIP2 cofactors inhibit Sp1- and COUP-TF-mediated activation of HIV-1 gene transcription and related viral replication

To decipher the mechanism whereby CTIP proteins affect the initial phase of HIV-1 gene transcription, we investigated the impacts of CTIP proteins on Sp1 and COUP-TF functions. Microglial cells were transfected with pLTR-CAT plasmid together with the vectors expressing COUP-TF (Figure 2A) or Sp1 (Figure 2B) proteins and with increasing amounts of HA-CTIP1 or Flag-CTIP2 expression vectors. The two proteins were able to repress COUP-TF- and Sp1-mediated stimulations of CAT activity. As a control, we performed western blot experiments, indicating that COUP-TF and Sp1

expressions were not downregulated but slightly upregulated by the cofactors. Since overexpression of COUP-TF and Sp1 stimulates HIV-1 gene expression, this modest upregulation could not be responsible for the CTIPs repressive function. To correlate CTIP1 and CTIP2 repressive activity on LTR-driven transcription to the level of HIV-1 replication, we studied their impacts on Sp1- and COUP-TF-mediated stimulations of viral replication. Cells were transfected with HIV-1 pNL4-3 and COUP-TF (Figure 2C) or Sp1 (Figure 2D) expression vectors in the presence of increasing amounts of CTIP1 or CTIP2 expression vectors. The level of viral replication was investigated by quantifying p24 Gag expression in the culture supernatants 2 days after transfection. While both CTIP1 and CTIP2 inhibited COUP-TF (Figure 2C) and Sp1 (Figure 2D) activation of HIV-1 NL4-3 replication, the strongest repression was observed with CTIP2 (Figure 2C and D, lanes 6–8), indicating that the repressing activity of CTIP2 on HIV-1 replication cannot be explained only by its previously described capacity to repress the viral Tat protein (25). These results strongly suggest that CTIP1 and CTIP2 repress the initial phase of HIV-1 gene transcription through direct or indirect interactions with endogenous Sp1 and COUP-TF proteins.

The HIV-1 Tat function and the subsequent phase of the HIV-1 gene transcription also depend on Tat association with Sp1 or COUP-TF in microglial cells (22). Since CTIP2-mediated repressive activities are much stronger than those observed for CTIP1 and since CTIP2, but not CTIP1, inhibits the subsequent phase of the HIV-1 gene transcription, we focused our mechanistic investigation on CTIP2.

CTIP2 interacts with COUP-TF and Sp1 *in vitro* by two interfaces

To decipher the mechanism whereby CTIP2 represses COUP-TF and Sp1 stimulatory activities, we first examined whether these proteins were able to interact *in vitro*. GST pull-down assays were performed with *in vitro* translated ³⁵S-labeled CTIP2 and equal amounts of full-length or truncated GST-COUP-TF and GST-Sp1 fusion proteins (Figure 3A). Results show that CTIP2 bound specifically to GST-COUP-TF and GST-Sp1 (Figure 3A, lanes 3 and 8, respectively) but not to the control GST protein (Figure 3A, lanes 2 and 7, respectively).

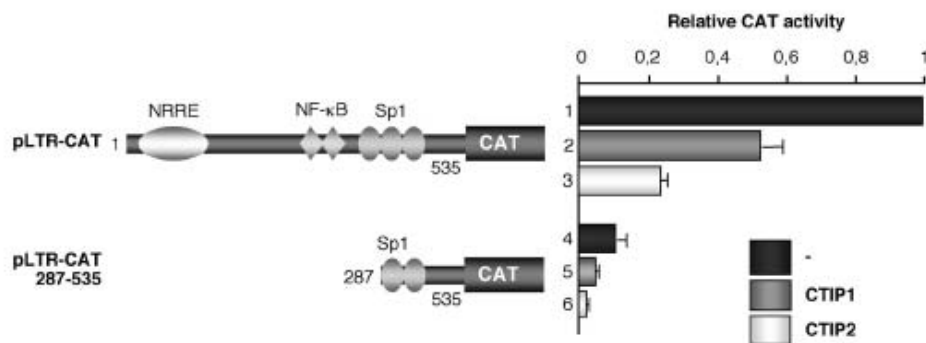


Figure 1. CTIP1 and CTIP2 proteins repress HIV-1 gene transcription via the proximal LTR region. Microglial cells were transfected with 3 μ g of pLTR-CAT or 3 μ g of pLTR-CAT (287–535) in the presence or absence of 1 μ g of HA-CTIP1 or Flag-CTIP2. Two days post-transfection, CAT activities were measured and expressed relative to the CAT activity obtained with pLTR-CAT alone with the standard deviations indicated (values correspond to an average of at least three independent experiments performed in duplicate).

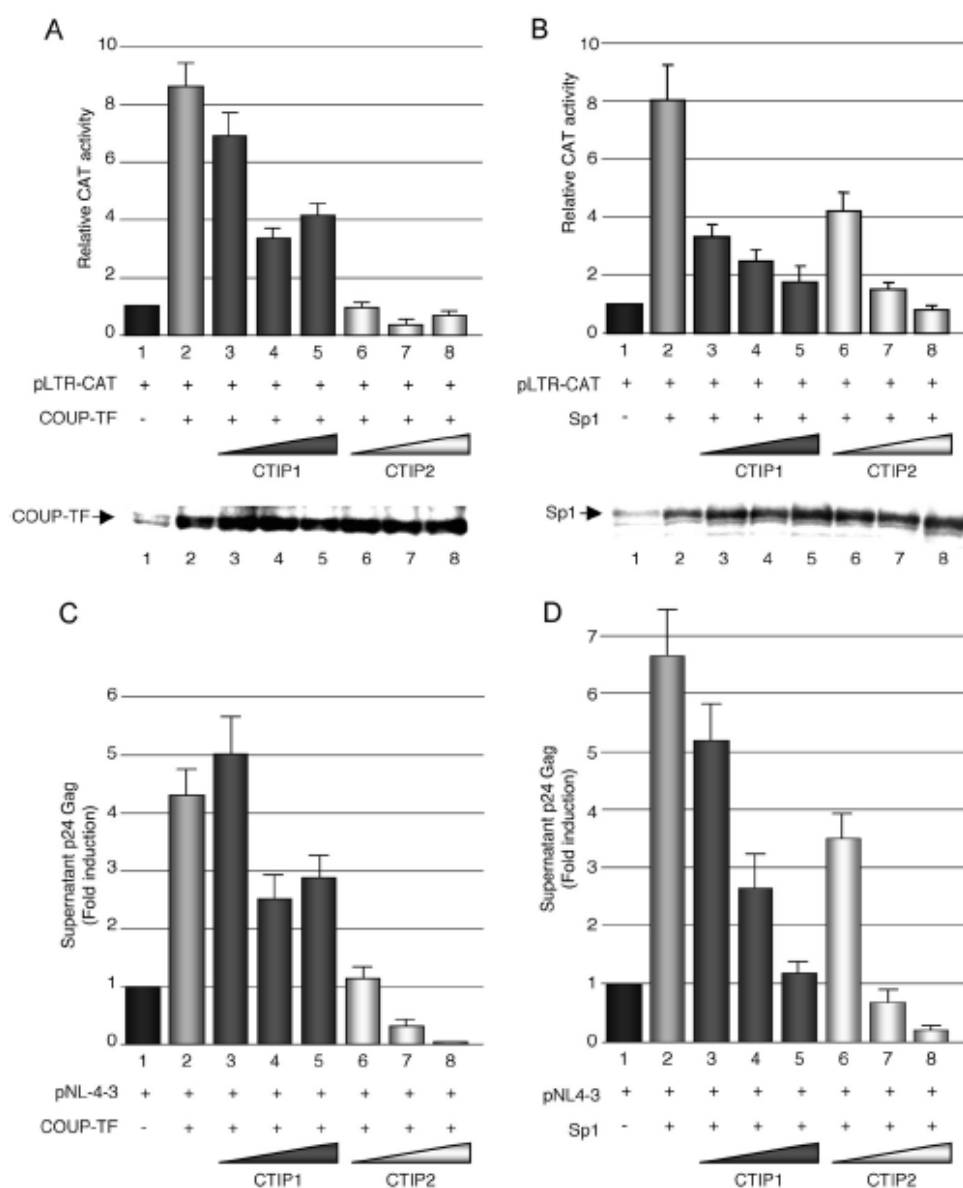


Figure 2. CTIP1 and CTIP2 inhibit Sp1- and COUP-TF-mediated activation of HIV-1 gene transcription and related viral replication. Microglial cells were cotransfected with 3 μ g of pLTR-CAT (A and B) or 3 μ g of pNL4-3 (C and D), 1 μ g of RSV-COUP-TF (A and C) or CMV-Sp1 (B and D) expression vectors and increasing amounts of HA-CTIP1 or Flag-CTIP2 (0.1, 0.5 or 1 μ g). (A and B) Two days post-transfection, CAT activities were measured and expressed relative to the value obtained with pLTR-CAT alone with the standard deviation indicated (values correspond to an average of at least three independent experiments performed in duplicate). Western blot experiments were performed on nuclear extracts with antibodies directed against COUP-TF or Sp1 proteins as indicated. (C and D) Two days post-transfection, culture supernatants were analyzed for p24 Gag contents and expressed relative to the value obtained with pNL4-3 alone taken as 1. Depending on the cell confluency, this value varied between 500 and 5000 pg/ml. Values correspond to an average of at least three independent experiments performed in duplicate.

Approximately 2–5% and 1–2% of the 35 S-labeled CTIP2 interacted with GST-COUP-TF and GST-Sp1, respectively. Moreover, the 49–148 region of COUP-TF (Figure 3A, lane 5) and the 622–788 region of Sp1 (Figure 3A, lane 11) were still able to mediate association with CTIP2, indicating that CTIP2 interacted with the N-terminal region of COUP-TF and the C-terminal region of Sp1, both of which include zinc finger domains.

To precisely delineate the region of CTIP2 protein that associates with Sp1 and COUP-TF, GST pull-down assays were performed with full-length GST-COUP-TF or GST-Sp1

fusion proteins and a series of *in vitro*-translated 35 S-labeled full-length and deletion mutants of CTIP2 (Figure 3B). The full-length as well as deletion mutants starting at position 350, 610 and 717 did mediate interaction with GST-COUP-TF (Figure 3B, lane 6) and GST-Sp1 (Figure 3B, lane 3) but not with the control GST protein (Figure 3B, lanes 2 and 5). These results show that CTIP2 is able to interact with Sp1 and COUP-TF via its C-terminal zinc finger domain region. We have previously shown that CTIP2 harbors two independent interaction domains with the viral Tat protein (25). This prompted us to determine whether an additional

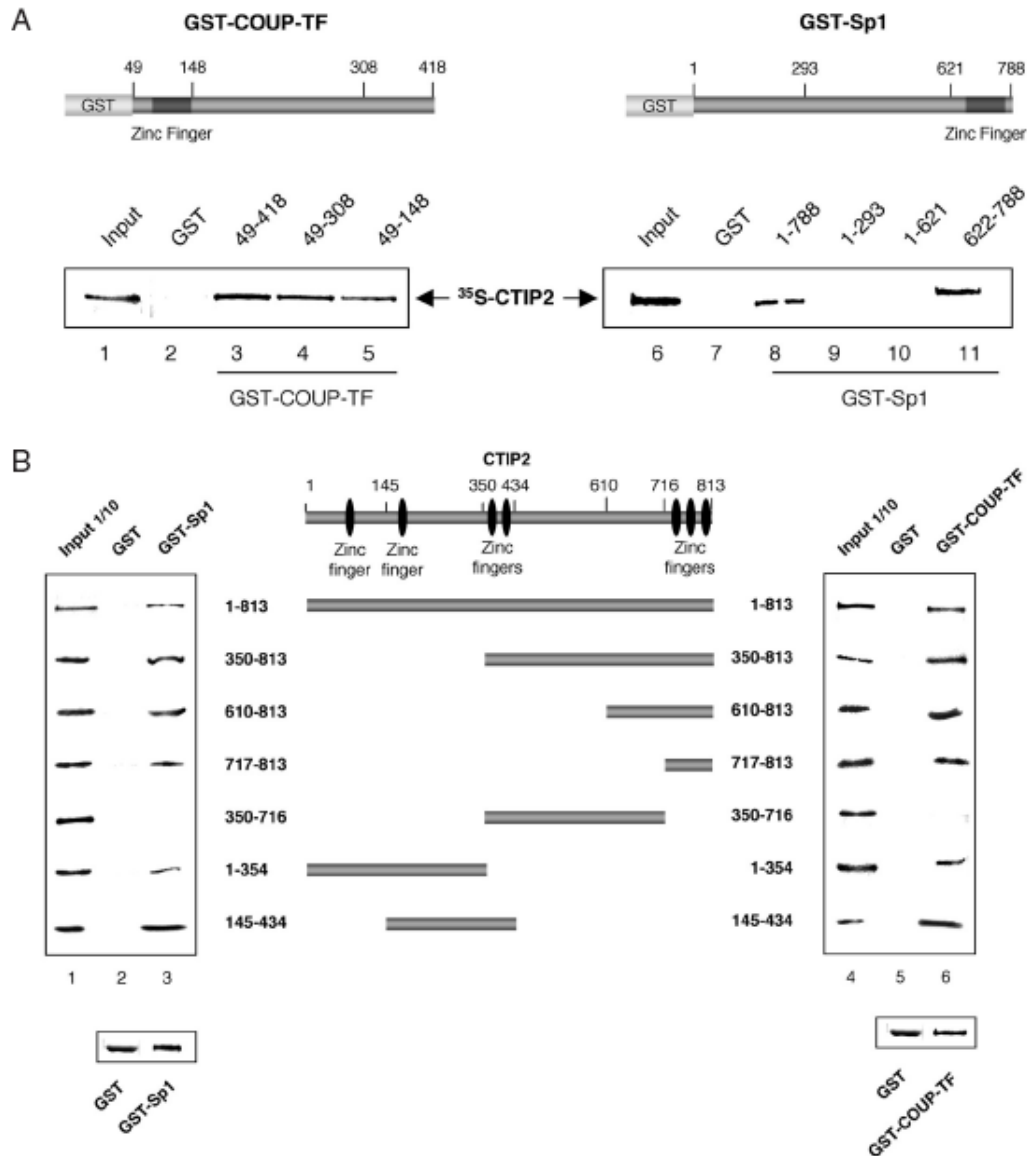


Figure 3. CTIP2 interacts *in vitro* with COUP-TF and Sp1 by two interfaces. (A) Upper panels: schematic representation of the COUP-TF and Sp1 proteins; lower panels: GST pull-down assays were performed with ^{35}S -labeled CTIP2 incubated with GST (lanes 2 and 7) or GST fusion proteins of the indicated COUP-TF domains (lanes 3–5) or Sp1 domains (lanes 8–11). Approximately 1% of the total ^{35}S -labeled CTIP2 obtained was loaded as input control (lanes 1 and 6). (B) GST pull-down assays were performed with ^{35}S -labeled full-length or truncated CTIP2 proteins incubated with GST (lanes 2 and 5), GST-COUP-TF (lane 6) or GST-Sp1 (lane 3) fusion proteins. Approximately 1% of the total ^{35}S -labeled proteins used were loaded as input control (lanes 1 and 4). Representative Coomassie stainings of GST, GST-Sp1 and GST-COUP-TF proteins were presented (B lower panels).

interaction interface was located in the N-terminal or the central region of CTIP2. To this end, GST pull-down experiments were performed with additional deletion constructs. As expected, the deletion mutant 350–716 was not able to interact with COUP-TF and Sp1, confirming that the C-terminal region of CTIP2 containing residues 717–813 mediates binding to these transcription factors. However, the 1–354 and the 145–434 constructs appeared to be able to restore interactions, suggesting that the central region of CTIP2 located between the residues 145 and 354 might be sufficient for COUP-TF and Sp1 association.

Thus, these findings indicate that CTIP2 interacts *in vitro* with the zinc finger domains of COUP-TF and Sp1 by two interfaces located in the central region (residues 145–354) and the C-terminal region (residues 717–813).

CTIP2 colocalizes with Sp1 and COUP-TF within *Hp1*α-associated structures

To visualize the association of CTIP2 with Sp1 and COUP-TF within the nucleus, Flag-CTIP2 transfected microglial cells were observed by immunofluorescence confocal laser

microscopy (Figure 4A). As previously described (25), anti-Flag immunostaining of Flag-CTIP2 revealed the formation of CTIP2-induced nuclear ball-like structures in microglial cells nuclei (Figure 4A, images 3, 8 and 13). Flag-CTIP2 appeared as concentrated at the periphery but absent within the structures. Interestingly, observations of RFP-CTIP2 (Figure 4B, images 1 and 5) fusion protein revealed the presence of CTIP2 at the periphery but also within the previously

described nuclear structures, suggesting that the Flag epitopes within these ball-like structures were probably not accessible to the anti-Flag antibodies. To control the nuclear location of RFP-CTIP2 expression, cells were transfected with RFP-CTIP2 and GFP-Lamin B expression vectors. As previously described (25), CTIP2-induced nuclear structures were located in the nucleus of microglial cells (C. Marban and O. Rohr, unpublished data). In the absence of CTIP2, endogenous

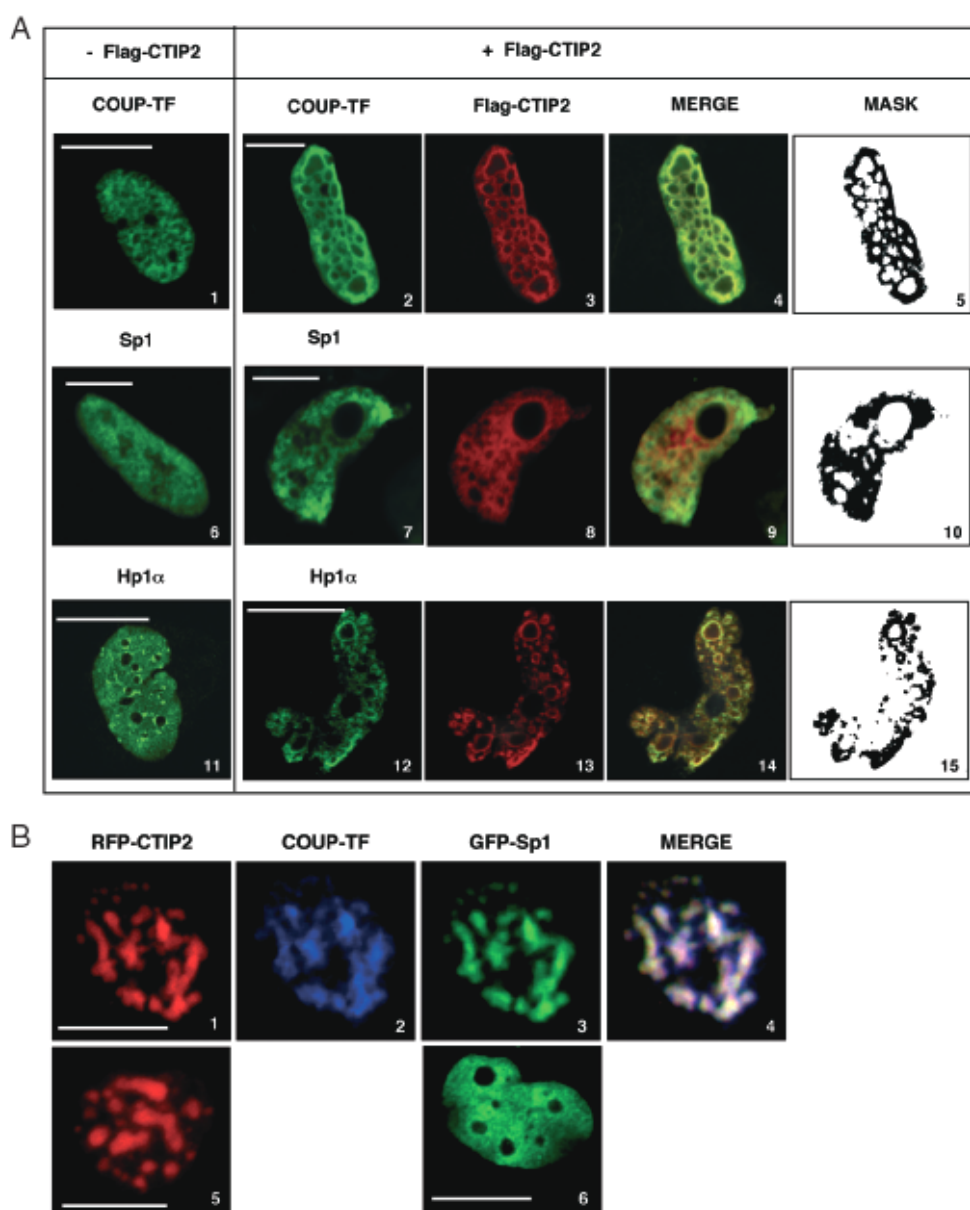


Figure 4. CTIP2 colocalizes with Sp1 and COUP-TF within Hp1 α -associated structures. (A) Microglial cells were transfected or not with Flag-CTIP2 as indicated. After being treated, endogenous Sp1, COUP-TF and Hp1 α proteins were immunodetected with primary anti-COUP-TF (Santa Cruz Biotechnology) (images 1 and 2), anti-Sp1 (images 6 and 7) and anti-Hp1 α antibodies (images 11 and 12). Overexpressed Flag-CTIP2 was detected with antibodies directed against the Flag epitope (images 3, 8 and 13). The primary immunocomplexes were revealed by CY2- or CY3-labeled anti-species secondary antibodies (green or red staining). Mask column (images 5, 10 and 15) shows the colocalized CY2 and CY3 stainings. (B) Microglial cells expressing RFP-CTIP2 (image 1) and GFP-Sp1 (image 3) were subjected to endogenous COUP-TF immunodetection with anti-COUP-TF antibodies (kindly provided by J. E. Mertz). COUP-TF immunocomplexes were stained by CY5- (blue staining) labeled anti-species secondary antibodies (image 2). Pattern of RFP-CTIP2 and GFP-Sp1 expressed alone are presented on images 5 and 6, respectively. (A and B) Coverslips were subjected to confocal microscopy analysis. Bar, 10 μ m.

COUP-TF and Sp1 proteins were expressed in the nucleoplasm with a speckled and diffused staining pattern (images 1 and 6). Moreover, in the presence of Flag-CTIP2, these transcription factors were at least partially located to CTIP2-induced nuclear structures (Figure 4A, images 2 and 7). Endogenous Sp1 (Figure 4A, images 9 and 10) and COUP-TF (Figure 4A, images 4 and 5) proteins colocalized with CTIP2 at the periphery of the immunostained structures. Up to 87 and 70% of endogenous COUP-TF and Sp1 proteins colocalized with CTIP2, respectively. No staining was observed inside the ball-like structures. We have reported that CTIP2 relocates the viral Tat transactivator to the heterochromatin-associated protein Hp1 α (25). Endogenous Hp1 α exhibited a diffused and speckled nuclear distribution in the absence of CTIP2 (Figure 4A, image 11). To visualize the presence of Hp1 α in CTIP2-induced structures in the absence of Tat, we performed immunodetection of endogenous Hp1 α in microglial cells expressing Flag-CTIP2. As shown in Figure 4A (images 14 and 15), endogenous Hp1 α colocalized with CTIP2, suggesting that endogenous COUP-TF, Sp1 and Hp1 α proteins are relocated to the same CTIP2-induced nuclear structures. To address whether COUP-TF and Sp1 also colocalized with CTIP2 inside the ball-like structures, we performed immunodetection of the endogenous COUP-TF protein with other different polyclonal antibodies (kindly provided by J. E. Mertz) in the presence of RFP-CTIP2 and GFP-Sp1 fusion proteins. As shown in Figure 4B (image 2), endogenous COUP-TF was observed inside the structures, confirming that the epitope accessibility to the antibodies is determinant to COUP-TF immunodetection. Since RFP-CTIP2 was expressed in ball-like structures (Figure 4B, images 1 and 5), GFP-Sp1 expressed alone was localized in the nucleoplasm with a diffused staining pattern (Figure 4B, image 6). Moreover, in the presence of RFP-CTIP2, GFP-Sp1 is relocated to CTIP2-induced structures (Figure 4B, image 3). COUP-TF and GFP-Sp1 relocation was not restricted to the periphery of the CTIP2-induced nuclear structures, since they were also detected inside the structures as shown by the presence of white staining resulting from colocalized red, blue and green staining (Figure 4B, image 4). Thus, endogenous Sp1 proteins were probably relocated within the heterochromatic structures too. However, they remained inaccessible to the currently used antibodies (Figure 4A, images 7 and 9). These results strongly suggest that the cellular transcription factors, Sp1 and COUP-TF, associate with CTIP2 in microglial cells.

CTIP2 interacts with Sp1, COUP-TF and Hp1 α in microglial cells

We have observed that CTIP2 colocalizes with Sp1, COUP-TF and the heterochromatin-associated protein Hp1 α in microglial cells. To test whether Sp1, COUP-TF, CTIP2 and Hp1 α are present in the same complex, we performed co-immunoprecipitation experiments on microglial nuclear extracts expressing or not the Flag-CTIP2 protein (Figure 5A). Anti-Flag western blot immunodetections performed on anti-COUP-TF (lanes 3 and 4), anti-Sp1 (lanes 6 and 7) and anti-Hp1 α (lanes 9 and 10) immunoprecipitated nuclear extracts indicated that CTIP2 interacted with COUP-TF (lane 4), Sp1 (lane 7) and Hp1 α (lane 10) in microglial cells. As a control,

experiments performed on CTIP2 non-expressing extracts (lanes 3, 6 and 9) or on non-immune serum (NIS) immunoprecipitated nuclear extracts (lanes 2, 5 and 8) confirmed the specificity of the Flag immunodetection and the specificity of the COUP-TF, Sp1 and Hp1 α immunoprecipitation experiments, respectively. Thus, CTIP2 may be able to recruit a protein complex, including the three proteins in the nucleus of microglial cells. To address how CTIP2 links COUP-TF and Sp1 to Hp1 α , we performed competition pull-down assays (Figure 5B). GST-COUP-TF and GST-Sp1 fusion proteins were incubated with both ³⁵S-labeled CTIP2 145–434 and CTIP2 717–813 in the presence of increasing amounts of ³⁵S-Hp1 α . Results clearly show that CTIP2 145–434 remained bound to GST-COUP-TF and GST-Sp1, while CTIP2 717–813 was displaced by Hp1 α . This displacement increased the amount of GST fusion proteins available for the CTIP2 145–434 binding. Hp1 α competed for COUP-TF and Sp1 binding to the C-terminal domain of CTIP2. These findings indicate that the 145–434 region of CTIP2 has a stronger binding affinity for COUP-TF and Sp1 than the 717–813 domain, which preferentially binds Hp1 α . Thus, CTIP2 may link COUP-TF and Sp1 bound to the 145–434 domain and Hp1 α bound to the 717–813 domain. To precisely examine the formation of a ternary complex between Sp1, COUP-TF and CTIP2, we performed GST pull-down experiments of mixed ³⁵S-labeled-Sp1 and -COUP-TF proteins with GST-CTIP2. As shown in Figure 5C, Sp1 and COUP-TF interacted together with CTIP2. Moreover, addition of increasing amounts of 145–434 CTIP2 or COUP-TF proteins did not compete each other for Sp1 binding (Figure 5D). Thus, COUP-TF and CTIP2 do not compete for Sp1 binding *in vitro*. Taken together, those findings strongly suggest the formation of a ternary complex occurring between Sp1, COUP-TF and CTIP2.

CTIP2 is anchored to the HIV-1 LTR by direct interactions with Sp1 bound to the LTR proximal region

CTIP proteins are DNA-binding proteins, which bind a consensus sequence related to the canonical GC-box (33). Moreover, we have previously described that COUP-TF activates HIV-1 transcription by direct protein–protein interactions with Sp1 bound to the proximal region of HIV-1 LTR (13). The association of CTIP2 with Sp1 and COUP-TF (Figure 5) led us to examine how CTIP2 interacts with the HIV-1 LTR to promote viral repression. To do that, we performed EMSA experiments with pure Sp1 proteins and bacterially produced GST-CTIP2 and GST-COUP-TF proteins that were incubated with a ³²P-labeled probe corresponding to the three Sp1 binding sites (GC-box) of the HIV-1 LTR proximal region. As expected, Sp1 bound to the probe to form a shifted nucleoprotein complex (Figure 6A, lanes 1 and 7). Interestingly, addition of GST-CTIP2 (lane 2) or GST-COUP (lane 3) but not GST (lane 4) separately promoted the formation of supershifted complexes, indicating that, as previously reported for COUP-TF (13), CTIP2 was anchored to the LTR by a physical interaction with Sp1. As a control, GST-COUP-TF and GST-CTIP2 proteins, incubated alone, were unable to directly interact with the probe (lanes 5 and 6). To confirm whether COUP-TF, CTIP2 and Sp1 form a ternary complex, we performed additional gel shift experiments in which increasing

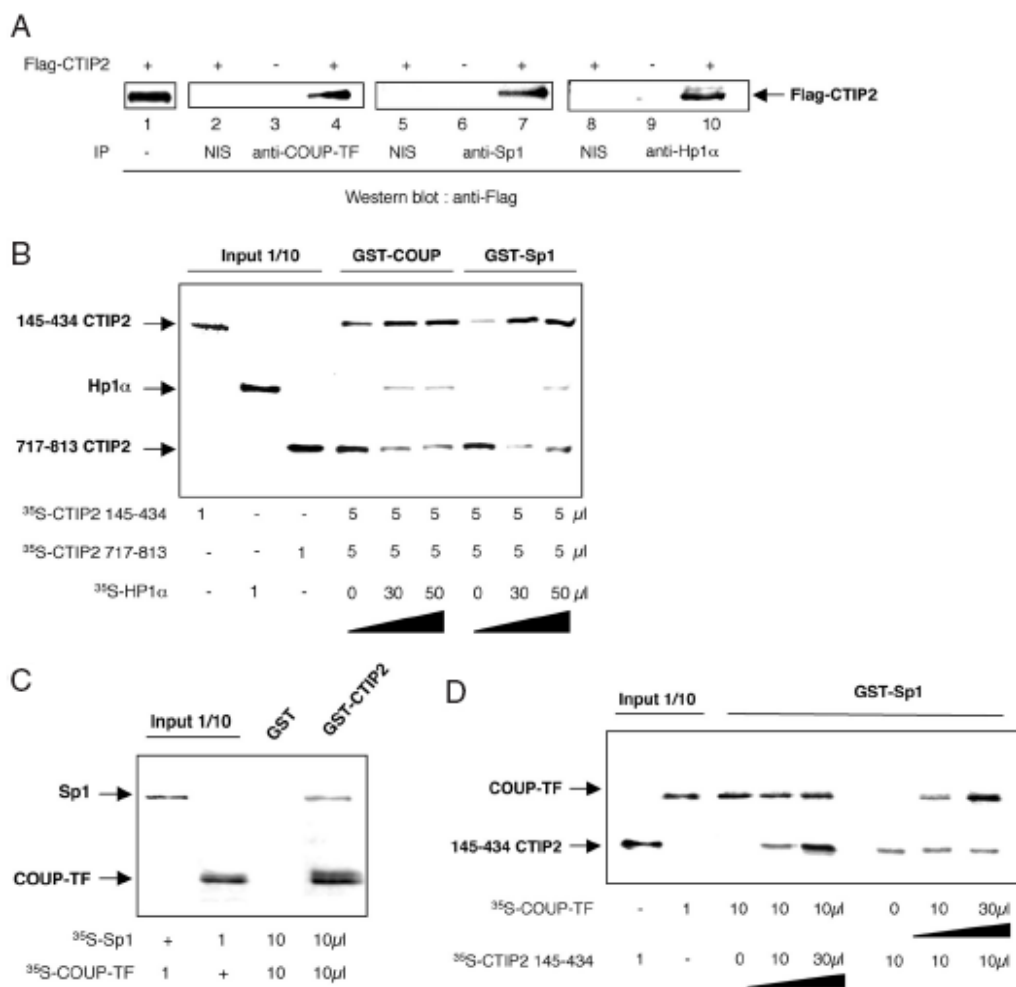


Figure 5. CTIP2 interacts with COUP-TF, Sp1 and Hp1 α in microglial cells. (A) Nuclear extracts of microglial cells expressing (lanes 2, 4, 5, 7, 8 and 10) or not (lanes 3, 6 and 9) Flag-CTIP2 were immunoprecipitated with antibodies directed against COUP-TF (lanes 3 and 4), Sp1 (lanes 6 and 7) or Hp1 α (lanes 9 and 10) proteins. Proteins were separated by SDS-PAGE and western blot analysis with anti-Flag antibodies were performed. (B) GST pull-down competition assays were performed with equal amounts of 35 S-labeled 145-434 and 717-813 CTIP2 proteins and increasing amounts of 35 S-labeled Hp1 α . Proteins were incubated with GST-COUP-TF or GST-Sp1 fusion proteins as indicated. (C) GST pull-down assays were performed with equal amounts of 35 S-labeled Sp1 and COUP-TF proteins and GST or GST-CTIP2 fusion proteins as indicated. (D) GST pull-down competition assays were performed with the indicated amounts of 35 S-labeled 145-434 CTIP2 and COUP-TF proteins and GST-Sp1. (A-D) Approximately 1% of the total 35 S-labeled proteins used were loaded as input control.

amounts of CTIP2 proteins were added to the binary Sp1/COUP-TF complex (lanes 9 and 10). As shown, the shifted complex formed by COUP-TF and Sp1 bound to the template (lane 8) was supershifted by increasing the amount of CTIP2 in a dose-dependent manner. Moreover, the intensity of the supershifted complexes also increased with CTIP2 quantity. Those findings are in favor of the formation of a ternary complex anchored to the HIV-1 Sp1 binding sites. To precisely examine this complex, the mixed three proteins were incubated with their respective antibody. EMSA experiments demonstrated that the complex observed in the presence of the three proteins (Figure 6A, lane 10 and Figure 6B, lane 1) was supershifted by the antibodies directed against CTIP2 (Figure 6B, lane 2) and COUP-TF (Figure 6B, lane 3) but not by non-immune serum (Figure 6B, lane 5) confirming the presence of the two proteins in the complex. Moreover,

incubation of the mixed three proteins with the anti-Sp1 antibodies (Figure 6B, lane 4) inhibited the formation of the nucleoprotein complex. Thus, impairing Sp1 binding to the proximal region of the HIV-1 LTR results in the total abolition of the CTIP2 and COUP-TF ability to bind this region of the viral promoter. These results confirm that both CTIP2 and COUP-TF interact with Sp1 bound to the LTR *in vitro*. Previously published EMSA experiments performed with nuclear extracts of microglial cells have revealed that this region of the viral promoter binds the cellular transcription factors, Sp1 and Sp3, in microglial cells (13). EMSA experiments performed with nuclear extracts of microglial cells expressing CTIP2 could not allow us to observe CTIP2 indirect binding to the LTR (C. Marban and O. Rohr, unpublished data). To bypass this technical issue and to address whether CTIP2 interacts with the viral promoter *in vivo*, ChIP assays were

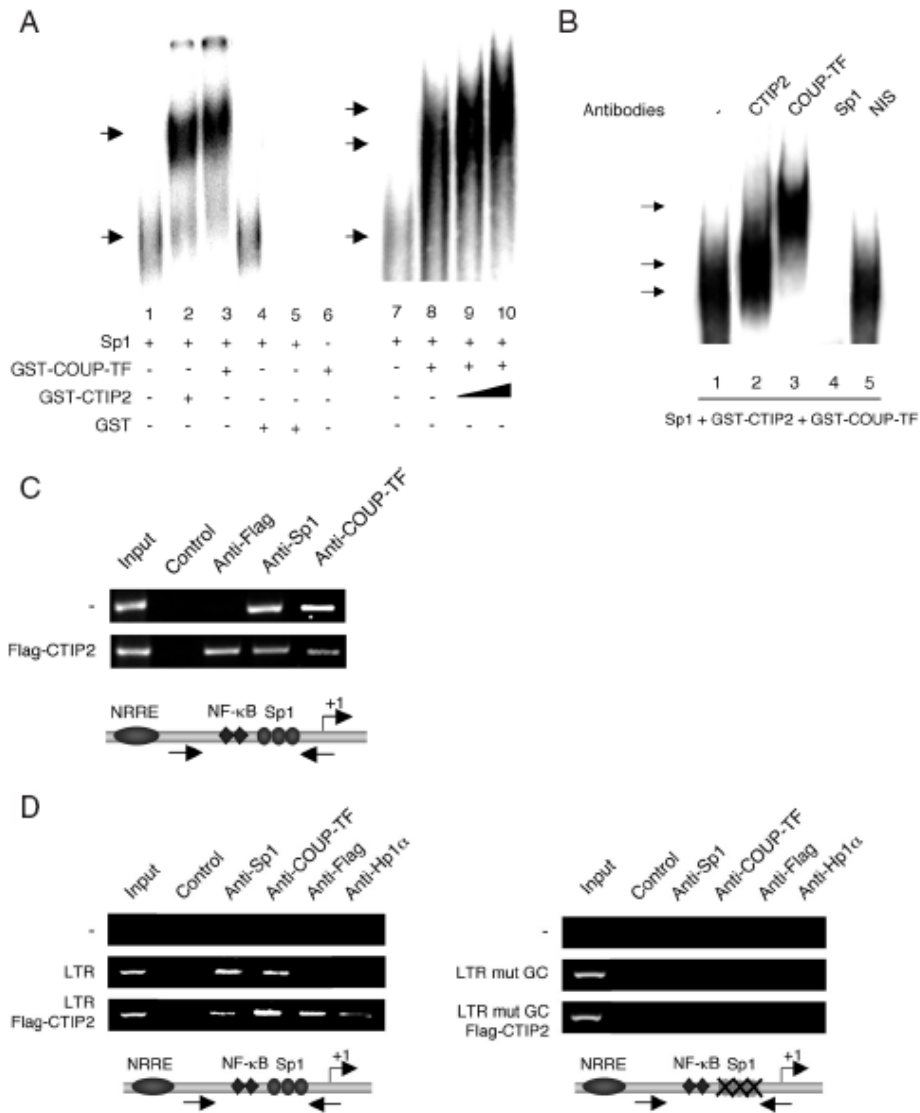


Figure 6. CTIP2 is anchored to the HIV-1 LTR by direct interactions with Sp1 bound to the LTR proximal region. (A and B) EMSA experiments were performed using purified Sp1, GST, GST-COUP-TF and GST-CTIP2 fusion proteins. Proteins were incubated with a ³²P-labeled probe corresponding to the three Sp1 binding sites located downstream of the LTR (LAI) TATAA sequence. (A) Increasing amounts of GST-CTIP2 proteins correspond to 5 μl (lane 9) and 10 μl (lane 10) of the used GST-CTIP2 preparation. Supershift experiments performed in (B) were carried out with non-immune serum (lane 5) and with antibodies directed against CTIP2 (lane 2), COUP-TF (lane 3), and Sp1 (lane 4). The specific shifted and supershifted complexes are presented. (C) The TZM-b1 cells, which contain a stably integrated LTR, were transfected or not with 30 μg of the indicated Flag-CTIP2 expression vector. (D) HEK 293T cells were transfected with 5 μg of the indicated pLTR (left panel) or pLTR mutGC (right panel) constructs and 10 μg of Flag-CTIP2 expression vector if indicated. (C and D) Input lanes correspond to positive controls conducted with a fraction of the lysates used for the immunoprecipitation. Control lanes correspond to negative controls, in which immunoprecipitation reactions were performed without antibodies. Anti-Flag, anti-Sp1, anti-COUP-TF and anti-Hp1α lanes represent amplification reactions from samples immunoprecipitated with the indicated antibodies. Results are representative of three independent experiments.

immunoprecipitated with the antibodies directed against Sp1 and COUP-TF in the context of the integrated LTR (Figure 6C, row 2). The same observations were made with the antibodies directed against Sp1 in the transiently transfected LTR context (Figure 6D, left panel). As shown in Figure 6C and D (left panel), CTIP2 interacted with the proximal region of the viral promoter. In addition, mutation of the Sp1 binding sites abolished the interaction of Sp1, COUP-TF and CTIP2 with this region of the viral LTR (Figure 6D, right panel). Taken together, our *in vitro* and *in vivo* findings suggest that the Sp1-mediated recruitment of CTIP2 to the LTR occurs in a cellular context. We could not detect Hpl α interactions with the proximal region of the LTR in the absence of CTIP2, suggesting that CTIP2 significantly increase the recruitment of Hpl α to the HIV-1 proximal promoter (Figure 6D, left panel). In addition, mutation of the Sp1 binding sites also abolished CTIP2-mediated recruitment of Hpl α (Figure 6D, right panel). Since Hpl α associates with heterochromatic regions, it is likely that CTIP2 promotes transcriptionally repressed heterochromatic environment to the viral LTR region.

Sp1 binding sites are dominant and sufficient but not absolutely necessary for transcriptional repression mediated by CTIP2

To address the importance of the HIV-1 LTR GC-box sequence for CTIP2 repressive function, we have transfected microglial cells with the pGC-WAP-CAT reporter plasmid in the presence of Sp1 and CTIP2 expression vectors (Figure 7A). As expected, this heterologous promoter, containing three consensus binding sites for Sp1, was highly inducible by ectopic Sp1 overexpression (lane 3). Interestingly, overexpression of CTIP2 also repressed Sp1-mediated transcriptional stimulation in the context of the GC-WAP promoter (lane 4),

indicating that Sp1 binding sites were sufficient for CTIP2 activity. These results also suggest that CTIP2 may be able to repress transcription of other Sp1-sensitive cellular genes.

To decipher whether CTIP2 repressive function is exclusively mediated by the Sp1 binding sites, we have further examined the LTR sequences responsible for CTIP2-mediated transcriptional repression. To do that, we have transfected microglial cells with pLTR-CAT vectors containing mutated or deleted GC-boxes in the presence or absence of CTIP2. As previously shown, CTIP2 expression resulted in a strong repression of the basal LTR-driven CAT activity (Figure 7B, lane 2). Mutation (lane 3) or deletion (lane 5) of the Sp1 binding sites resulted in a >90% impairment of the LTR transcriptional activity, confirming the importance of endogenous Sp1 and COUP-TF proteins, which bind to this region and stimulate the initial phase of LTR-driven transcription in microglial cells (13). Surprisingly, CTIP2 was still able to repress the low remaining transcriptional activity of the mutated (lane 4) and of the deleted (lane 6) LTR, suggesting that CTIP2 may also affect HIV-1 gene transcription via association with some other cellular transcription factors yet to be characterized.

DISCUSSION

In a recent work, we have revealed the importance of the cellular transcription factors, Sp1 and COUP-TF1/Ear3, in the regulation of HIV-1 gene transcription and replication in microglial cells (13). We have shown that the orphan nuclear receptor COUP-TF associates and cooperates with Sp1 in the activation of LTR-driven transcription. CTIP1 (Bcl11a, Evi9) and CTIP2 (Bcl11b, Rit1 β) are related transcriptional regulatory proteins that have been shown to bind members of

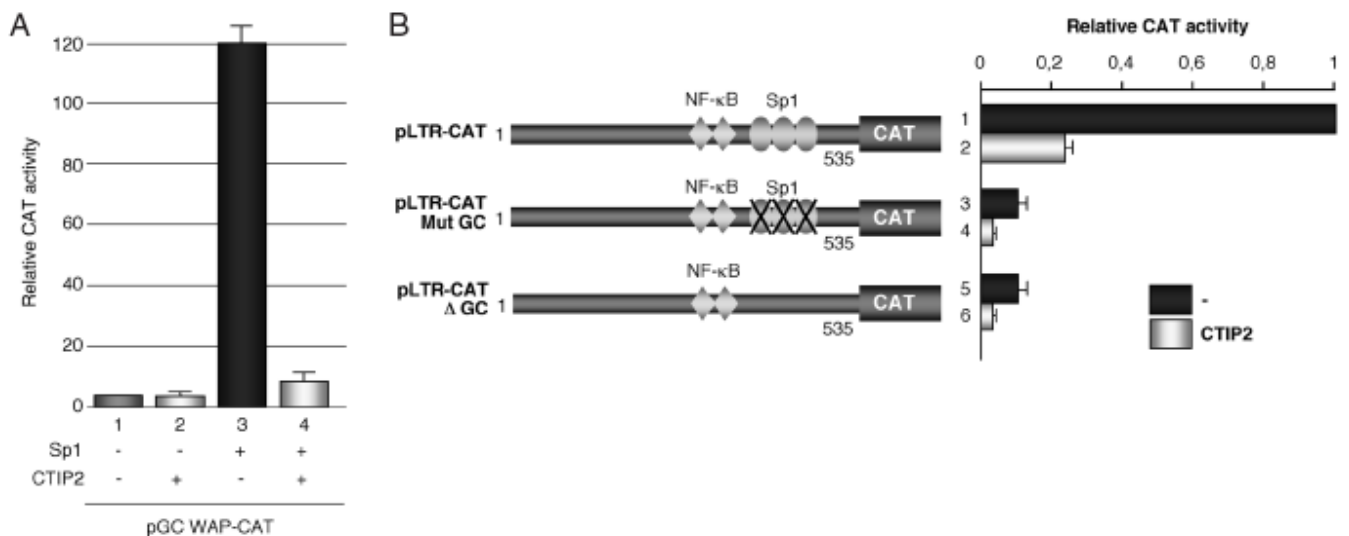


Figure 7. Sp1 binding sites are dominant and sufficient but not absolutely necessary for transcriptional repression mediated by CTIP2. (A) Microglial cells were transfected with 3 μ g of pGC-WAP-CAT reporter vector and 1 μ g of expression vectors as indicated. (B) Microglial cells were transfected with 3 μ g of pLTR-CAT, pLTR-CAT mutGC or pLTR-CAT Δ GC and 1 μ g of the indicated Flag-CTIP2 vector. Two days post-transfection, CAT activities were measured and expressed relative to the value obtained with the reporter plasmids pGC-WAP-CAT or pLTR-CAT alone with the standard deviations indicated (values correspond to an average of at least three independent experiments carried out in duplicate).

the COUP-TF family (23). In a more recent work, we have described that the nuclear cofactor CTIP2 inhibits the subsequent phase of HIV-1 gene transcription by relocating the viral Tat protein to transcriptionally inactive regions of chromatin via Hpl α (25).

Here, we addressed the mechanism whereby CTIP2 impairs the initial phase (prior to Tat expression) of HIV-1 gene transcription in microglial cells.

We report that CTIP proteins inhibit Sp1- and COUP-TF-mediated activation of HIV-1 gene transcription and replication in microglial cells. To decipher the mechanism whereby CTIP2 alters COUP-TF and Sp1 functions, we examined whether these proteins interact *in vitro* and in cells. GST pull-down experiments revealed that CTIP2 associates with the N-terminal region of COUP-TF and with the C-terminal region of Sp1 *in vitro*. In this way, CTIP2 presents two interfaces for Sp1 and COUP-TF interactions. COUP-TF and Sp1 proteins bind the central and the C-terminal region of CTIP2 *in vitro*. These results are consistent with the previously reported interface domains of Arp1 (COUP-TFII) with CTIP1 (23). Confocal microscopy observations of COUP-TF and Sp1 location in the presence or absence of CTIP2 reveal that CTIP2 colocalizes with COUP-TF and Sp1 within nuclear ball-like structures. Moreover, the heterochromatin-associated protein Hpl α is also present in these structures. There are three Hpl protein family members in mammals, Hpl α , Hpl β and Hpl γ . The Hpl α isoform is mainly detected in transcriptionally repressed heterochromatic region (36). Thus, the colocalization of CTIP2 with endogenous Sp1, COUP-TF and Hpl α proteins as reported here strongly suggests that these proteins are relocated to transcriptionally inactive regions of heterochromatin in microglial cells. Those CTIP2-induced structures may represent a new class of nuclear structures (25). Moreover, our observations may favor the hypothesis, suggesting that the formation of nuclear bodies inhibits HIV-1 gene transcription by sequestering a variety of factors required for transcriptional activation [reviewed in (37)].

Co-immunoprecipitation data indicate that the described subnuclear colocalization results from physical interactions between Sp1, COUP-TF, Hpl α and CTIP2 in the nucleus of microglial cells. Since Hpl α , Sp1 and COUP-TF proteins associate with CTIP2 in microglial cells, we address their respective interaction interfaces *in vitro*. Our findings show that the central zinc finger domain of CTIP2 may preferentially bind Sp1 and COUP-TF proteins, while the C-terminal region may bind to Hpl α . In the presence of the viral Tat transactivator, CTIP2 also associates with Hpl α via its C-terminal region. Taken together, these findings suggest a permanent association of CTIP2 with Hpl α via its C-terminal region. The central domain of CTIP2 may be reserved for the interactions with the functionally repressed transcription factors. Our observations indicate that COUP-TF and Sp1 could bind together to CTIP2 and that COUP-TF and CTIP2 do not compete for Sp1 binding. Those findings suggest the formation of a ternary complex, including COUP-TF, Sp1 and CTIP2 proteins. Thereby, CTIP2 links these transcriptional activators to transcriptionally repressed heterochromatic region. CTIP1 and CTIP2 proteins have been described as sequence-specific DNA-binding proteins (33). The core-binding site identified in this study is highly related to the canonical GC-box sequence. Since Sp1 anchors COUP-TF

to the GC-box sequence of the viral LTR region (12), we addressed how CTIP2 interacts with the HIV-1 promoter. Our findings demonstrate that CTIP2 is not able to directly bind the three viral GC-box sequences *in vitro*. CTIP2 is recruited to the HIV-1 LTR via its association with Sp1 bound to this region. Moreover, CTIP2 is not in competition with COUP-TF for Sp1-mediated anchorage to the viral promoter, indicating that the three proteins are linked together to the LTR *in vitro*. The ChIP experiments conducted in a cellular context confirm that CTIP2, Sp1 and COUP-TF proteins do bind the proximal region of the HIV-1 promoter in chromatin-integrated and non-integrated contexts.

The surprising reduction of Sp1 or COUP-TF binding to the viral promoter in the presence of CTIP2 apparently does not agree with the *in vitro* observations. We show that Sp1 anchors CTIP2 and COUP-TF to the HIV-1 LTR and that Sp1 binding to the GC-box sequence is necessary for CTIP2 recruitment to this region. Nevertheless, since Sp1 and COUP-TF proteins are not accessible to their related antibodies in the CTIP2-induced nuclear structures, one wonders whether the observation of reduced binding to the LTR may result from protein sequestration and/or chromatin environment. ChIP experiments also indicate that CTIP2 promotes Hpl α recruitment to the LTR encompassing the Sp1 binding sequences. Mutation of the Sp1 binding sites abolished this recruitment. Taken together, these results suggest that the Sp1-mediated anchorage of CTIP2 to the HIV-1 LTR region may recruit a large complex that promotes Hpl α association, heterochromatin environment and viral gene transcriptional silencing. In Jurkat cells, CTIP2 associates with the histone deacetylase SirT1 in a large complex. CTIP2-mediated recruitment of SirT1 to promoter template results in a deacetylation of the bound histones H3 and H4 and in a transcriptional repression (35). The chromatin structure close to the HIV-1 gene promoter is involved in viral post-integration latency phenomenon (38). Further studies will be necessary to examine the CTIP2-recruited complex that promotes HIV-1 gene silencing.

To control whether the CTIP2 repressive function is mediated by Sp1 binding sites, we have examined its ability to repress a heterologous promoter containing three consensus GC-boxes. Our findings reveal that GC-box sequences are sufficient for CTIP2-mediated repression of Sp1 stimulation, suggesting that CTIP2 may impact the transcriptional activity of other GC-box containing promoters. In agreement with these observations, CTIP2 is still able to repress LTR-driven transcriptional activity of a LTR deleted downstream of the GC-box sequences. Recruitment of CTIP1 to the template by a COUP-TF family member has been found to result in a transcriptional repression of a reporter gene harboring a COUP-TF binding site (23). In the context of the HIV-1 promoter, deletion of the previously described COUP-TF binding site did not impact CTIP2 repressive function. Moreover, EMSA and ChIP experiments demonstrate that CTIP2 interacts with the proximal region of the LTR excluding the COUP-TF binding sequence. Taken together, these findings indicate that the COUP-TF binding sequence, located downstream to the GC-box region, might not be implicated in the CTIP2 repressive functions. As widely reported, deletion of the LTR GC-box region results in a drastic (>90%) reduction of the LTR-driven transcriptional activity (13–15,22). These observations confirm the crucial contribution of Sp1 and

COUP-TF transcription factors to support viral gene transcription in microglial cells. Moreover, they highlight the importance of CTIP2-mediated repression of Sp1 and COUP-TF protein functions. Most of the 80% CTIP2-mediated reduction of the basal transcriptional level may be charged on to this repressive activity. Surprisingly, CTIP2 is still able to repress the 10% remaining transcriptional activity driven by a GC-box deleted LTR, suggesting that CTIP2 may also be able to repress the expression of mutated strains of virus. This remaining activity represents <10% of the global CTIP2-mediated repressive activity.

Nevertheless, we have previously suggested that COUP-TF restores the viral Tat function in the context of a GC-box mutated LTR by anchoring Tat to the basal transcriptional machinery (22). Interestingly, we observed that CTIP2 is also able to repress this functional cooperation (C. Marban and O. Rohr, unpublished data). These results suggest that, in this context, COUP-TF may bind CTIP2 via its N-terminal region and the general transcription factor TFIIB via its C-terminal part as described previously (39). Thus, in the absence of Sp1-mediated linkage to the GC-box region of the HIV-1 LTR, CTIP2 may bypass Sp1 association by a COUP-TF-mediated linkage to the basal transcriptional machinery. Moreover, this proposed indirect linkage might be weak since it appeared undetectable by ChIP experiments. Along this line, CTIP2 might also associate to some other cellular transcription factors yet to be characterized.

These studies fully complete those reporting CTIP2-mediated repression of the viral Tat function (25). Since Sp1 or COUP-TF association is necessary for Tat function in microglial cells (22), it can be postulated that CTIP2-mediated impairment of Sp1 and COUP-TF function contributes to the previously observed repression of Tat function.

The chromatin structure at the site of provirus integration is reminiscent to post-integration latency phenomenon (38). *In vitro*, latent T-cell clones frequently contain HIV-1 genome integrated in heterochromatin structures. This is in contrast to a productive infection where integration in or near heterochromatin is disfavored (40). No antiretroviral drugs that are currently available can inhibit transcription of HIV RNA from the integrated HIV proviral DNA in infected cells. Nevertheless, HDAC inhibitors are able to induce quiescent provirus, suggesting that derepression of heterochromatin structures may force viral expression from latently infected reservoirs (41,42). Thus, investigation on factors that may promote heterochromatin structures to the viral gene promoter, such as CTIP2, appears crucial for understanding these phenomena and for the development of new anti-HIV strategies. At this stage, further studies will be necessary to precisely examine the CTIP2-associated enzymatic activities that promote transcriptional silencing. In addition, since our investigations were restricted to the transcriptional step of the viral life cycle, it cannot be excluded that CTIP2 also counteracts other critical steps necessary to optimal viral replication. This possibility needs further clarification.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank R. Losson for providing Hpl α vectors and anti-Hpl α antibodies, H. Rotheneder for providing GST-SP1

vectors, J. E. Mertz for providing anti-COUP-TF antibodies and Ann Dekoninck for technical support. The following reagents were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: T2M-bl from Dr John C. Kappes, Dr Xiaoyun Wu and Tranzyme Inc. and pNL4-3 from Dr Malcolm Martin. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), by the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS), by grants from the French Ministry of Research ('ACI JC 5364' to O.R. and grant to S.S.) and by a grant to C.M. from the Conseil Régional d'Alsace. C.V.L. is a 'Maître de Recherches' at the 'Fonds National de la Recherche Scientifique' (FNRS, Belgium) and O.R. is a 'Maître de Conférences' at the 'IUT Louis Pasteur de Schiltigheim' (University of Strasbourg I, France). Work in the Leid Laboratory was supported by a grant from NIH (GM60852) and in part by grant number P30 ES00210 from the National Institute of Environmental Health Sciences, NIH. Funding to pay the Open Access publication charges for this article was provided by INSERM.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

1. Fauci, A.S. (1988) The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science*, **239**, 617–622.
2. Portegies, P. and Brew, B.J. (1991) Update on HIV-related neurological illness. *AIDS*, **5** (Suppl. 2), S211–S217.
3. Pialoux, G., Fournier, S., Moulignier, A., Poveda, J.D., Clavel, F. and Dupont, B. (1997) Central nervous system as a sanctuary for HIV-1 infection despite treatment with zidovudine, lamivudine and indinavir. *AIDS*, **11**, 1302–1303.
4. Kolson, D.L., Lavi, E. and Gonzalez-Scarano, F. (1998) The effects of human immunodeficiency virus in the central nervous system. *Adv. Virus Res.*, **50**, 1–47.
5. Peudenier, 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**, 152–161.
6. Perry, V.H., Lawson, L.J. and Reid, D.M. (1994) Biology of the mononuclear phagocyte system of the central nervous system and HIV infection. *J. Leukoc. Biol.*, **56**, 399–406.
7. Greene, W.C. and Peterlin, B.M. (2002) Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nature Med.*, **8**, 673–680.
8. 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**, 663–668.
9. Rohr, O., Marban, C., Aunis, D. and Schaeffer, E. (2003) Regulation of HIV-1 gene transcription: from lymphocytes to microglial cells. *J. Leukoc. Biol.*, **74**, 736–749.
10. 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**, 163–166.
11. Wang, L.H., Tsai, S.Y., Sagami, I., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1987) Purification and characterization of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor from HeLa cells. *J. Biol. Chem.*, **262**, 16080–16086.
12. 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**, 23572–23576.
13. 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.

14. 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**, 404–413.
15. 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.
16. 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**, 755–759.
17. Harrich,D., Garcia,J., Wu,F., Mitsuyasu,R., Gonzalez,J. and Gaynor,R. (1989) Role of SP1-binding domains in *in vivo* transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J. Virol.*, **63**, 2585–2591.
18. Sune,C. and Garcia-Blanco,M.A. (1995) Transcriptional trans activation by human immunodeficiency virus type 1 Tat requires specific coactivators that are not basal factors. *J. Virol.*, **69**, 3098–3107.
19. Perkins,N.D., Edwards,N.L., Duckett,C.S., Agranoff,A.B., Schmid,R.M. and Nabel,G.J. (1993) A cooperative interaction between NF-kappa B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *EMBO J.*, **12**, 3551–3558.
20. Yedavalli,V.S., Benkirane,M. and Jeang,K.T. (2003) Tat and trans-activation-responsive (TAR) RNA-independent induction of HIV-1 long terminal repeat by human and murine cyclin T1 requires Sp1. *J. Biol. Chem.*, **278**, 6404–6410.
21. van Opjnen,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**, 6883–6890.
22. Rohr,O., Schwartz,C., Hery,C., Aunis,D., Tardieu,M. and Schaeffer,E. (2000) The nuclear receptor chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor interacts with HIV-1 Tat and stimulates viral replication in human microglial cells. *J. Biol. Chem.*, **275**, 2654–2660.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Rohr,O., Sawaya,B.E., Lecestre,D., Aunis,D. and Schaeffer,E. (1999) Dopamine stimulates expression of the human immunodeficiency virus type 1 via NF-kappaB in cells of the immune system. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 3291–3299.
27. Karlseder,J., Rotheneder,H. and Wintersberger,E. (1996) Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1659–1667.
28. Adachi,A., Koenig,S., Gendelman,H.E., Daugherty,D., Gattoni-Celli,S., Fauci,A.S. and Martin,M.A. (1987) Productive, persistent infection of human colorectal cell lines with human immunodeficiency virus. *J. Virol.*, **61**, 209–213.
29. 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.
30. 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.
31. Platt,E.J., Wehrly,K., Kuhmann,S.E., Chesebro,B. and Kabat,D. (1998) Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophage-tropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.*, **72**, 2855–2864.
32. 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.
33. 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**, 555–563.
34. Luo,R.X., Postigo,A.A. and Dean,D.C. (1998) Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell*, **92**, 463–473.
35. 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.
36. Nielsen,A.L., Oulad-Abdelghani,M., Ortiz,J.A., Remboutsika,E., Chambon,P. and Losson,R. (2001) Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol. Cell*, **7**, 729–739.
37. Marcello,A., Lusic,M., Pegoraro,G., Pellegrini,V., Beltram,F. and Giacca,M. (2004) Nuclear organization and the control of HIV-1 transcription. *Gene*, **326**, 1–11.
38. 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.
39. Ing,N.H., Beekman,J.M., Tsai,S.Y., Tsai,M.J. and O'Malley,B.W. (1992) Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TFIIB (S300-II). *J. Biol. Chem.*, **267**, 17617–17623.
40. 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.
41. Ylisastigui,L., Archin,N.M., Lehrman,G., Bosch,R.J. and Margolis,D.M. (2004) Coaxing HIV-1 from resting CD4 T cells: histone deacetylase inhibition allows latent viral expression. *AIDS*, **18**, 1101–1108.
42. 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.

Publication 2

Le recrutement par CTIP2 d'enzymes de modification de l'ADN permet de réprimer transcriptionnellement le VIH-1 dans les cellules microgliales.

Au cours de l'infection des cellules, le génome du VIH-1 est intégré dans le génome de la cellule hôte. Cette intégration peut avoir lieu dans des zones transcriptionnellement actives, donnant lieu à une production virale. Mais, elle peut également se faire dans des zones transcriptionnellement inactives, conduisant alors à un phénomène de latence post-intégrative.

Les cellules microgliales, qui sont la principale cible du VIH-1 dans le système nerveux central, constituent un réservoir pour le virus.

Les différents travaux présentés ici, ont pour objectif de mettre en évidence le mode d'action utilisé par CTIP2 pour réprimer la transcription virale.

Une interaction physique entre CTIP2 et les HDACs 1 et 2 a été visualisée *in vivo* détectée grâce à des expériences d'immunoprécipitation. Les deux HDACs interagissent également d'un point de vue fonctionnel pour réprimer la transcription avec CTIP2.

Des expériences d'immunoprécipitation chromatinienne ont permis de mettre en évidence que la liaison de CTIP2 sur le promoteur viral *via* le recrutement de Sp1 conduit à une augmentation du recrutement des HDACs 1 et 2 sur le promoteur proximal et que ce recrutement induit une diminution du niveau d'acétylation de l'histone H3 au niveau du nucléosome 1 se qui induit un environnement répressif.

Cependant, aucun des complexes de remodelage de la chromatine connus contenant HDAC 1 et 2 n'a pu être identifié comme interagissant avec CTIP2.

En revanche, CTIP2 est capable d'interagir avec l'histone méthyltransférase SUV39H1, responsable de la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, qui permet l'association des protéines HP1 pour réprimer la transcription virale.

Les expériences de ChIP ont permis de démontrer le recrutement par CTIP2 d'un complexe multienzymatique sur le promoteur viral. Ainsi, en se fixant à SP1, CTIP2 recrute HDAC1 et 2 qui déacétylent l'histone H3 au niveau du nucléosome 1. CTIP2 va

ensuite recruter SUV39H1, qui méthyle le même site de l'histone H3, permettant ainsi la liaison des protéines HP1 et la formation de l'hétérochromatine.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing

Céline MARBAN, Stella SUZANNE, Franck DEQUIEDT, Stéphane DE WALQUE,
Laetitia REDEL, Carine VAN LINT, Dominique AUNIS and Olivier ROHR

The EMBO journal, 2007, vol. 26, pages 412–423

Pages 136-153 :

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

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601516>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Publication 3 (*non encore soumise à publication*)

CTIP2 et SUV39H1 répriment transcriptionnellement le gène p21.

CTIP2 est connu pour avoir un impact sur le développement tumoral et l'apoptose, et de façon générale sur le cycle cellulaire.

La protéine p21 est un acteur clef du cycle cellulaire. Il est régulé au niveau transcriptionnel par des facteurs de transcription et des modifications de la structure chromatinienne.

Tout comme le LTR du VIH-1, le promoteur du gène de la protéine p21 contient plusieurs sites Sp1 ; il constitue donc un site d'action potentiel pour CTIP2 qui est capable de se lier aux sites Sp1 en interagissant avec Sp1. L'objectif de ce travail a donc été de déterminer si les effets observés de CTIP2 sur le cycle cellulaire pouvaient s'expliquer par un recrutement de CTIP2 sur le promoteur de p21 à l'instar de ce qui a été observé pour le VIH-1.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence un effet répresseur de CTIP2 sur le gène de p21 *via* son recrutement sur le promoteur proximal visualisé en CHIP. De plus, les tests d'activité transcriptionnelle ont permis de montrer une coopération entre CTIP2 et des HDACs sensibles à la TSA (comme dans le cas du LTR viral), ainsi qu'avec la méthyltransférase SUV39H1. CTIP2 semble donc à l'origine de la création d'un environnement hétérochromatinien au niveau du promoteur du gène p21, qui conduit à une répression de la transcription et de l'expression de la protéine.

Par ailleurs, la protéine virale Vpr est à l'origine du blocage du cycle cellulaire en phase G2-M lors de l'infection par le VIH-1, pour favoriser la production virale. Ce blocage passe par une augmentation de l'expression de la protéine p21 induite notamment par l'interaction de Vpr avec Sp1 sur le promoteur du gène.

Nous avons mis en évidence le recrutement de Vpr sur les sites Sp1 du promoteur par des expériences de CHIP, qui est à l'origine de l'augmentation de la transcription de p21.

Des expériences de cytométrie en flux et des tests transcriptionnels ont permis de montrer que CTIP2 est capable de contre-carrer les effets de Vpr sur le cycle cellulaire et d'induire un déplacement de Vpr du promoteur en le relocalisant dans des structures nucléaires visualisées en microscopie confocale.

Ces différents résultats ont permis de mettre en évidence que l'établissement de la latence transcriptionnelle dans les cellules microgliales ne se résume sans doute pas seulement à une répression de la transcription virale, mais que CTIP2 agit à différents niveaux au cours de l'infection par le VIH-1. CTIP2 favoriserait également la latence par l'établissement d'un contexte cellulaire défavorable à l'expression virale se qui contribue d'autant plus à la mise en place de la latence dans les cellules microgliales.

p21^{WAF1} gene is transcriptionally silenced by CTIP2 and SUV39H1.

Stella Suzanne¹, Thomas Cherrier¹, Céline Marban¹, Boubeker Samah², Ruma Mukerjee³,
Christian Schwartz¹, Gabriel Gras², Bassel E. Sawaya³, Steven L. Zeichner⁴, Dominique Aunis¹,
Carine Van Lint^{5&} and Olivier Rohr^{16 * &}

¹ INSERM unité 575 Pathophysiology of Nervous System, Université Strasbourg 1, Institut de Virologie, 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France.

² CEA UMRE-01, service de Neurovirologie, DSV/DRM, 18 route de Panorama, F92265 Fontenay aux Roses, France.

³ Center for Neurovirology and Cancer Biology, College of Science and Technology, Temple University, Philadelphia, Pennsylvania 19122.

⁴ Children's Research Institute, Children's National Medical Center and Departments of Pediatrics and Microbiology, Immunology, and Tropical Medicine, George Washington University, Washington, DC, USA.

⁵ University of Bruxelles (ULB), Institute for Molecular Biology and Medicine (IBMM), Laboratory of Molecular Virology, 12 rue des Professeurs Jeener et Brachet, 6041 Gosselies, Belgium

⁶ IUT Louis Pasteur de Schiltigheim, 1 Allée d'Athènes, 67300 Schiltigheim, France.

& The authors have co-directed the present work

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: +33 388 45 66 01

Fax: +33 388 60 08 06

E-mail: olivier.rohr@iutlpa.u-strasbg.fr

Characters (including spaces) :

Keywords : CTIP2 / p21^{WAF1} / SUV39H1 / HIV-1

Running Head : p21 gene transcriptional silencing

ABSTRACT

Mainly regulated at the transcriptional level, the cellular cyclin-dependent kinase inhibitor CDKN1A/p21^{WAF1} (p21) is a major cell cycle controller involved in the DNA damage response, senescence, and tumor suppression. We report that COUP-TF-interacting protein 2 (CTIP2), recruited to the p21 gene promoter, silences p21 gene transcription through interactions with histone deacetylases and methyltransferases. Inhibitors of CTIP2-associated histone deacetylase and methyltransferase activities strongly stimulated p21 gene promoter. Importantly, treatments with Chaetocin, a specific SUV39H1 inhibitor, repressed histone H3 lysine 9 trimethylation at the p21 gene promoter, stimulated p21 gene expression and induced cell cycle arrest. In addition, CTIP2 and SUV39H1 were shown to be recruited to the silenced p21 gene promoter to cooperatively inhibit p21 gene transcription. Whereas CTIP2 directly favors HIV-1 transcriptional latency by silencing the HIV-1 promoter, induction of p21^{WAF1} gene upon HIV-1 infection benefits to viral expression. Here, we report that CTIP2 further abolishes Vpr-mediated stimulation of p21 and thereby indirectly contribute to HIV-1 latency. Altogether, our results demonstrate that CTIP2 is a constitutive p21 gene suppressor that prevent cells from apoptosis in cooperation with SUV39H1 and histone methylation. In addition, these results also revealed that CTIP2 counteracts HIV-1 Vpr and thereby indirectly contribute to HIV-1 transcriptional latency.

INTRODUCTION

The cyclin-dependent kinase inhibitor CDKN1A/ p21^{WAF1} (p21) is a key cell cycle controller that is mainly regulated at the transcriptional level (Gartel and Radhakrishnan, 2005). Induction of p21 results in G1-, G2- (Niculescu et al., 1998) or S-phase arrest (Ogryzko et al., 1997; Radhakrishnan et al., 2004). Both positive and negative regulation modulate p21 gene expression. A variety of cellular transcription factors such as p53, Sp1 or C/EBP stimulate the p21 gene promoter (for review (Gartel and Tyner, 1999)). Somewhat less is known about the negative regulation of p21 (Gartel and Radhakrishnan, 2005). Studies have identified direct negative regulatory effects exerted by Myc to the p21 gene promoter (Claassen and Hann, 2000; Gartel et al., 2001) and indirect effects through inhibition of p53. Epigenetic modifications such as DNA methylations and histone acetylations are crucial for p21 gene expression (Gartel and Radhakrishnan, 2005; Gartel and Tyner, 2002; Lagger et al., 2003; Suzuki et al., 2000) but the mechanism through which the epigenetic enzymes are recruited to the p21 gene promoter remains unclear. While p21 has been known for some time to play an important part in cell cycle regulation and the pathogenesis of several disorders including several cancers, recently, p21 has been described as a pivotal facilitator of the HIV-1 life cycle in macrophages, a key cell type in HIV disease pathogenesis. HIV-1 infection activates p21 expression, forcing a cell cycle arrest that is highly permissive for viral transcription (Thierry et al., 2004; Vazquez et al., 2005). HIV-1-induced p21 overexpression has been attributed to HIV-1 Vpr protein. Vpr stimulates p21 gene transcription in cooperation with the cellular transcription factor Sp1 which binds to the p21 gene promoter (Amini et al., 2004). Vpr has many other cellular effects (for review see : (Moon and Yang, 2006)) including indirect DNA damage, that also favor G2 arrest and apoptosis (Schrofelbauer et al., 2007). p21 is required to sustain G2 arrest after DNA damage (Bunz et al., 1998).

We have previously reported that the cellular cofactor COUP-TF-Interacting Protein 2 (CTIP2) represses HIV-1 gene transcription in microglial cells, the Central Nervous System (CNS) resident macrophages. In microglial cells, CTIP2 binds the HIV-1 promoter via Sp1 and recruits histone deacetylase (HDAC) and histone methyl transferase (HMT) activities to promote a heterochromatic environment and HIV-1 transcriptional silencing (Marban et al., 2005; Marban et al., 2007). The observation that CTIP2 can affect gene expression via HDAC and HMT recruitments to the viral promoter suggested that other genes might be target by similar mechanisms. CTIP2 has been observed to have many, sometimes apparently disparate effects in a variety of cell types and biological systems, but little unifying mechanistic data has been developed. CTIP2 is expressed in the brain and the immune system (Leid et al., 2004), CTIP2 plays a major role in the development of corticospinal motor neuron axonal projections to the spinal cord (Arlotta et al., 2005). In the SK-N-MC neuronal cell line, CTIP2 inhibits transcription

of the cdk inhibitor p57KIP2 transcription (Topark-Ngarm et al., 2006). Mostly described as a corepressor, CTIP2 participates to the activation of IL2 gene expression in CD4+ T lymphocytes (Cismasiu et al., 2006). CTIP2 regulates both differentiation and survival of thymocytes and is required for T-lymphocyte development. Thymocytes from CTIP2 KO mice are highly susceptible to apoptosis (Wakabayashi et al., 2003b), but CTIP2 gene deletions or point mutations induce thymic lymphomas in gamma-irradiated mice (Wakabayashi et al., 2003a). Recent studies confirmed that CTIP2 exerts anti-apoptotic activities in T cell lines (Grabarczyk et al., 2007; Kamimura et al., 2007b). All these convergent data prompted us to investigate the impact of CTIP2 on the cell cycle, specifically in HIV-1-infected macrophages and microglial cells.

Here, we report that CTIP2 is a key transcriptional regulator of p21 gene expression. Associated to the Sp1 binding sites of the p21 promoter, CTIP2 transcriptionally represses constitutive p21 gene expression in cooperation with HDAC and HMT activities. Treatment with trichostatin A (TSA, a class-I and -II HDAC inhibitor) and with chaetocin (a specific inhibitor of the HMT SUV39H1) activated p21 gene promoter activity. Whereas SUV39H1 cooperated with CTIP2 to repress p21 gene transcription, chaetocin treatments induced cell cycle arrest. Interestingly, since p21 gene expression was enhanced upon HIV infection, CTIP2 counteracts this Vpr-mediated effect and the subsequent cell cycle arrest. CTIP2 and Vpr were shown to be recruited to the p21 promoter *in vivo*. However, CTIP2 overexpression displaced Vpr from the p21 gene promoter thereby promoting p21 gene transcriptional silencing. Altogether, our results reveal histone methylation as an epigenetic modification involved in p21 transcriptional silencing, and suggest that CTIP2-mediated anti-HIV activity is a bimodal phenomenon. CTIP2 both recruits a repressive chromatin-modifying enzymatic complex to the HIV-1 promoter as previously demonstrated by our laboratory, and has an indirect effect on the cell cycle through p21 promoter repression.

RESULTS

CTIP2 impairs constitutive p21 gene transcription

To examine CTIP2-mediated transcriptional activity on the p21 gene promoter, we first transfected microglial cells with a full length p21 promoter-luciferase construct (p21-LUC) in the presence or not of CTIP2. Whereas overexpression of CTIP2 downregulated p21 gene transcription up to 80% (Figure 1A), knocking-down CTIP2 strongly stimulated (up to 6 fold) p21 promoter activity (Figure 1B). To evaluate p21 expression at the protein level, we performed immunodetection experiments using extracts from CTIP2 knocked-down cells (Figure 1C, column 2) and control cellular extracts (Figure 1C, column 1). The p21 protein was barely detectable in the control cell extracts, but was strongly increased in CTIP2-knocked down cells (Figure 1C, columns 1 and 2).

These results demonstrate that CTIP2 constitutively represses p21 gene transcription and the subsequent protein expression.

CTIP2 is recruited to the p21 gene proximal promoter in vivo to inhibit p21 gene transcription

To demonstrate the presence of CTIP2 on the p21 gene promoter in vivo, we performed ChIP experiments using microglial cells and a set of primers flanking the proximal Sp1 binding sites of the endogenous p21 promoter. As shown in figure 1D, CTIP2 as well as Sp1 associated with the proximal region of the p21 promoter. We recently reported that Sp1 protein acts as an anchor for CTIP2 to the HIV-1 promoter (Marban et al., 2005; Marban et al., 2007). Since the p21 gene promoter harbors six Sp1 binding sites, we mapped the Sp1 sites involved in CTIP2-mediated transcriptional repression by transfecting progressive 5'-deleted p21 reporter constructs. As shown in figure 1E, 5' truncations of the p21 promoter up to the Sp1 binding site region did not significantly impair CTIP2-mediated repression (Figure 1E, lanes 2 to 6). However, further deletion of the -246/-93 Sp1 binding sites (sites 1 and 2) not only abolished this repressive activity, but even caused an 4.5 fold increase in luciferase activity (Figure 1E, compare lane 7 to lane 2-6). Further mutations in the -93/+1 Sp1 binding sites (sites 3 to 6) did not change the CTIP2-mediated transcriptional effects observed with the -93 p21 promoter construct (data not shown). In addition, while CTIP2 knock-down activated of the full length P21 promoter activity, 5' deletion of the promoter region including the Sp1 sites 1 and 2, abrogated this activation (Figure 1F, lane 3).

Altogether, these results demonstrate both by ectopic expression and knock-down experiments that the CTIP2 cofactor negatively regulates p21 gene promoter activity and that deletion of only

the Sp1 sites located between bp –119 and –93 are required for the CTIP2-mediated repression. Furthermore, these data suggest that Sp1 proteins bound to sites 1 and 2 are involved in the recruitment of CTIP2 to the p21 gene promoter.

CTIP2 cooperates with TSA sensitive HDAC and SUV39H1 to repress p21 expression

We have recently shown that CTIP2 is associated with a chromatin-modifying multienzymatic complex that includes HDAC1, HDAC2 and SUV39H1 (Marban et al., 2007). To assess the potential role of these enzymes in p21 gene transcription, we first transfected microglial cells with the full length p21-LUC reporter plasmid. At 24h post-transfection, cells were treated or not with TSA (Figure 2A). TSA treatment stimulated p21 gene promoter activity up to 4 fold (Figure 2A column 2) in agreement with the previously reported involvement of TSA sensitive HDACs in the constitutive repression of p21 gene transcription (Murphy et al., 1999; Sowa et al., 1999). Furthermore, CTIP2 knock-down and TSA treatment synergistically activated p21 gene promoter activity up to 18 fold (Figure 2A column 4). These data also agree with the associations between CTIP2 and HDAC1 and 2 that we described (Marban et al., 2007) and with the previously described HDAC1 recruitment to the p21 promoter through Sp1 association (Lagger et al., 2003). We next focused on the potential role of SUV39H1 in p21 gene transcription. Treatments with increasing concentrations of chaetocin, a specific inhibitor of SUV39H1, activated p21 gene promoter activity in a dose dependent manner (Figure 2B) and produced cell cycle arrest (Figure 2D). Importantly, the level of trimethylation of histone H3 lysine 9 in the p21 promoter region decreased upon chaetocin treatment (Figure 2C), confirming, in the context of the p21 promoter, the inhibitory effect of chaetocin on SUV39H1-mediated trimethylation. To further address the role of SUV39H1 in p21 gene repression, we investigated, the recruitment of this histone methyltransferase to the p21 gene promoter using ChIP assays. As shown in figure 3A, SUV39H1 was constitutively associated with the p21 promoter *in vivo*. Functionally, SUV39H1 knock-down strongly activated the p21 promoter activity in a dose-dependent manner (Figure 3B). We have recently reported that CTIP2 interacts with SUV39H1 and favors its recruitment to the HIV-1 promoter (Marban et al., 2007). To examine whether SUV39H1 cooperates with CTIP2 in p21 promoter repression, we performed CTIP2 and SUV39H1 knock-down and overexpression experiments in microglial cells expressing p21-promoter reporter constructs (Figure 3C). Knocking-down SUV39H1 expression caused a 3-fold stimulation of p21 gene promoter activity (Figure 3C, column 2), and the combined knock-down of both SUV39H1 and CTIP2 cooperated to stimulate p21 gene promoter activity up to 9 fold (Figure 3C, column 4). Moreover, while overexpression of SUV39H1 alone only slightly repressed p21 gene promoter activity in a dose dependent manner (Figure 3D, columns 2 to 4), the combined overexpression of both CTIP2 and

SUV39H1 synergistically repressed p21 promoter activity up to 80% (Figure 3D, columns 6 to 8). This functional repressive cooperation supports the model that CTIP2 mediates recruitment of SUV39H1 to the p21 promoter, as we have observed in the context of the HIV-1 promoter (Marban et al., 2007). Altogether, these results demonstrate the involvement of SUV39H1 and the cooperation of CTIP2 and SUV39H1 in p21 gene transcriptional silencing and in cell cycle control.

P21 gene transcription is upregulated upon HIV-1 infection in primary "microglial like" cells

Infection of macrophages by HIV-1 activates p21 mRNA production and promotes G2/M cell cycle arrest that is highly permissive for viral transcription. (Thierry et al., 2004; Vazquez et al., 2005). To examine whether p21 expression is modified in microglial cells, we infected human primary macrophages and "microglial like" cells with the HIV-1 Bal isolate and quantified p21 mRNA by quantitative RT-PCR (Figure 4A). p21 mRNA production was stimulated by HIV-1 infection in primary macrophages as previously described (Vazquez et al., 2005). Interestingly, the same range of activation was observed in infected primary "microglial like" cells suggesting the need for p21-induced events for efficient HIV-1 expression in microglial cells too. More importantly, these results suggest that p21 induction may be a good target for transcriptional silencing factors involved in HIV-1 latency. Thus, we logically looked at CTIP2-mediated activity in both HIV-1 infected primary monocytic-derived cell types.

CTIP2 represses HIV-1 replication in human primary macrophages and "microglial like" cells

To investigate CTIP2 function in HIV-1 infected primary cells, we transfected primary macrophages and primary macrophage-derived "microglial like" cells with a complete HIV-1 infectious provirus (pNL4-3) in the presence or not of the CTIP2 expression. As shown in figure 4B, CTIP2 overexpression repressed HIV-1 replication up to 70% in both human primary cell types tested. These results confirm, in cultured primary cells, the previously observed repressive activity of CTIP2 in a microglial cell line. Moreover, these results also prompt us to investigate the impact of CTIP2 on p21 gene expression and the resulted cell cycle status in the context of HIV-1 infection.

CTIP2 impairs Vpr-mediated stimulation of p21 gene transcription and the resulted cell cycle arrest.

To determine whether CTIP2 impacts Vpr-induced cell cycle arrest, we examined the cell cycle status of doxycycline-inducible Vpr-expressing cells (Yoshizuka et al., 2005) with or without CTIP2 overexpression. Quantification of DNA content by flow cytometry confirmed the ability of Vpr to induce G2/M cell cycle arrest (Figure 5A, panel 3). Whereas the cell cycle status was

slightly impacted by CTIP2 overexpression in the absence of Vpr (Figure 5A, panel 2), Vpr-induced G2/M block was completely abolished (Figure 5A, panel 4). Vpr and CTIP2 expression were verified by western blot experiments (Figure 5A, lower panels). Vpr-induced cell cycle arrest could be a consequence of p21 gene transcriptional activation. As shown on figure 5B and 5C, Vpr expression stimulated p21 gene promoter activity and subsequent p21 protein expression. To examine whether Vpr directly affects p21 gene promoter activity *in vivo*, we performed ChIP experiments targeting the proximal region of the promoter. As shown in figure 5D, Vpr was found associated with the p21 gene proximal promoter *in vivo*. Interestingly, overexpression of CTIP2 repressed Vpr-induced p21 gene transcription (Figure 5E, columns 3 to 5) and p21 protein expression (Figure 5F), as suggested by the ability of CTIP2 to impair Vpr-mediated cell cycle arrest. To examine the recruitment of CTIP2 and Vpr to the p21 promoter, we performed additional ChIP experiments. As shown in figure 5G, since Vpr expression slightly affected CTIP2 recruitment to the p21 promoter proximal region (Figure 5G column 8), CTIP2 overexpression impaired Vpr association with the same region (Figure 5G, column 12). As a control, expression of Vpr and CTIP2 did not significantly modify Sp1 binding to the GC-rich regions of the p21 promoter (Figure 5G, columns 2 to 4). To assess CTIP2-mediated relocation of Vpr in microglial cells, we observed CTIP2 and Vpr cellular localizations by confocal microscopy. Since Vpr-GFP alone localized in the nucleus and the cytoplasm of the cells (Figure 6A, panels 1 and 2), coexpression of RFP-CTIP2 with Vpr-GFP relocated Vpr in characteristic CTIP2-induced ball like structures (Figure 6A, panels 5 to 7). To visualize microglial cells nuclei, genomic DNA was stained with Topro 3 (Figure 6A, panels 2 to 7). As shown, CTIP2 and Vpr colocalized in the same structures (Figure 6A, panels 7), suggesting that CTIP2 can displace Vpr from the p21 promoter to subnuclear structures. Recent studies reported that Vpr-mediated cell cycle arrest resulted from impairment of DNA damage response events. To examine whether CTIP2 also affects this Vpr function, we assessed histone H2AX phosphorylation in nuclear extracts from cells expressing or not Vpr and CTIP2 (Figure 6B). Since Vpr strongly induced H2AX immunodetection (Figure 6B, lane2), CTIP2 overexpression completely abolished this effect (Figure 6B, lane 3) indicating that CTIP2-mediated anti-Vpr activity is not limited to repression of p21 gene transcription.

Altogether, these results revealed CTIP2 as a major p21 gene transcriptional silencer and a potent anti-Vpr cellular factor.

DISCUSSION

In addition to its role in DNA damage response, p21 is involved in differentiation, senescence, tumor suppression and HIV-1 expression (Gartel and Tyner, 2002; Thierry et al., 2004; Vazquez et al., 2005).

Here we demonstrate that CTIP2 is a constitutive transcriptional repressor of p21 gene transcription. The observed presence of endogenous CTIP2 at the p21 gene promoter in vivo is fully consistent with the undetectable level of the p21 protein in untreated condition. Moreover, the activation of p21 expression in CTIP2 knocked down cells provide further evidences for the constitutive repressive activity of CTIP2. Since we have previously demonstrated that CTIP2 is recruited to the HIV-1 promoter via Sp1 (Marban et al., 2005), we decided to determine the Sp1 binding regions involved in CTIP2-mediated repression. The -119/-93 binding sites (site 1 and 2) appeared necessary for CTIP2-mediated repression. The association of CTIP2 with HDAC1 and HDAC2 has been well documented (Marban et al., 2007) (Cismasiu et al., 2005; Topark-Ngarm et al., 2006). Thus, the surprising stimulation of the -93/+1 construct mediated by CTIP2 overexpression may be explained by an artificial titration of HDAC1 that would favor p53-mediated transactivation of p21 expression, as suggested by Lager et al. (Lager et al., 2003). The fact that CTIP2 knock-down did not affect the -93/+1 transcriptional activity further supports this hypothesis. Of note, we did not observe significant CTIP2-mediated modification of p53 expression or p53 acetylation (data not shown). To extend our investigations, we focused on CTIP2-associated enzymatic activities. Since, HDAC activities have been previously shown to favor p21 expression (for review see (Ocker and Schneider-Stock, 2007)), we have limited our investigations in this field. However, we observed that CTIP2 knock-down cooperates with TSA treatment to stimulate the p21 promoter, as previously described for the HIV-1 promoter (Marban et al., 2007). These results revealed that the functional cooperation of CTIP2 with TSA-sensitive HDAC (here HDAC1 and HDAC2) is not limited to the HIV-1 promoter (Marban et al., 2007) and confirmed the CTIP2-mediated recruitment of the enzymes to the targeted promoters. More interesting was the stimulation observed after Chaetocin treatment. The SUV39H1 inhibitor (Greiner et al., 2005) strongly stimulated p21 gene transcription and G2 cell cycle arrest. These observations were consistent with an observed decrease in methylation of the histone H3 lysine 9 at the p21 promoter confirming an effective inhibition of endogenous SUV39H1 activity. In the line, we found endogenous SUV39H1 associated with the p21 promoter in vivo and we demonstrated its functional cooperation with CTIP2 in p21 gene transcriptional silencing. These results provide the first evidence of SUV39H1 involvement in p21 gene transcriptional silencing. In addition, they also suggest that chaetocin could be used as an anti-proliferative pharmacological tool. Recently, chaetocin has been proposed as a promising antimyeloma agent (Isham et al., 2007). As previously suggested for HDAC inhibitors, chaetocin anti-meyloma

activity has been linked to oxidative stress (Pei et al., 2004). Our results suggest that at least a part of chaetocin's pro-apoptotic activity may be mediated by inhibition of SUV39H1 HMT activity at the p21 gene promoter and thus by induction of p21-mediated cell cycle arrest. We report that SUV39H1 and CTIP2 cooperate to silence p21 gene transcription and thereby favor cell cycle progression. The previously reported anti-apoptotic activities of CTIP2 have been attributed to its involvement in the maintenance of genomic integrity (Kamimura et al., 2007a) and in the modulation of intrinsic apoptotic pathways (Grabarczyk et al., 2007). Our results further demonstrate that at least a part of CTIP2-mediated anti-apoptotic activity may be attributed to p21 gene transcriptional silencing. HIV-1 infection of macrophages stimulates p21 expression and induces cell cycle arrest (Vazquez et al., 2005). Interestingly, G2 arrest favors HIV-1 expression as a result of NF- κ B, C-Jun and CBP recruitment to the viral promoter (Thierry et al., 2004). Mechanistically, HIV-1-induced p21 expression and cell cycle arrest have been attributed to HIV-1 Vpr functions. Apart from CTIP2 repression of HIV-1 replication in human primary macrophage and microglial cells, our results demonstrated that CTIP2 abrogates Vpr-induced cell cycle arrest, suggesting an impact of CTIP2 on Vpr-mediated transcriptional activation of the p21 gene. Vpr has been described to collaborate with the cellular Sp1 transcription factor to stimulate p21 promoter in human astrocyte (Amini et al., 2004). In microglial cells, we observed a Vpr-mediated transcriptional stimulation of p21 gene expression as a result of Vpr recruitment at the endogenous p21 gene promoter *in vivo*. However, CTIP2 repressed Vpr-mediated transcriptional activation of p21 expression. Our ChIP assays suggest that CTIP2 antagonises Vpr binding to the p21 gene promoter and thereby counteracts Vpr function. Recently, Vpr-mediated cell cycle arrest has been described as a consequence of DNA damage events. Surprisingly, CTIP2 overexpression also abrogates Vpr-mediated DNA damage events. These results further highlight that since Vpr affects the p21 signaling pathway at different levels, CTIP2-mediated inhibition of Vpr is also a multimodal process.

Altogether, CTIP2 appears as a constitutive p21 gene repressor that counteracts HIV-1 Vpr and prevents cells from apoptosis by cooperating with chromatin modifying enzymes, specifically SUV39H1.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

Most of the constructs used in our assays have been described previously: pcDNA3, pFLAG-CTIP2, pNL4.3, pVSV.G and; pRFP-CTIP2 in (Marban et al., 2005) pMyc-SUV39H1, pshRNA-SUV39H1 in (Schotta et al., 2004). pshRNA-CTIP2 in (Marban et al., 2007); pHA-Vpr and the different deletions mutant of p21-LUC in (Amini et al., 2004)

Cell culture

The human microglial cell line (Janabi et al., 1995) and HEK 293T cell lines were maintained in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum and 100 U/ml penicillin–streptomycin. Primary macrophages and monocyte-derived microglia-like cells were isolated, prepared and cultured as described in (Leone et al., 2006). Inducible Vpr expressing HEK cells were described in (Yoshizuka et al., 2005).

Cell cycle analysis.

Cell cycle status has been accessed by propidium iodide (PI) DNA staining and flow cytometry analysis. Briefly, trypsinized cells were washed and resuspended in PI staining solution for 30 min. Flow cytometric analysis was performed in a FACScalibur instrument (Becton Dickinson, San Jose, CA). Cell cycle analysis was performed using CellQuest software (Becton Dickinson).

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), CTIP2 (Santa Cruz), p21 (Santa Cruz), the HA epitope (Covance) and β -actin (Sigma). Proteins were visualized by chemiluminescence using the Super Signal Chemiluminescence Detection System (Pierce).

Luciferase assays

Microglial cells cultured in 48-well plates were transfected with the indicated vectors using the calcium phosphate co-precipitation method. Two days later, cells were collected and luciferase activity was determined using the Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega). Values correspond to an average of at least three independent experiments performed in duplicate.

HIV-1 infection and viral replication

Macrophages and Microglial like cells were cultured and prepared as previously described (Leone et al., 2006). Cultured in 24-well plates, cells were transfected using lipofectamine 2000 with HIV-1 pNL4-3 and the expression plasmids as indicated. Total amounts of DNA were normalized with the corresponding empty vector. For infection experiments, cells were infected with HIV-1 Bal. HIV-1 replication was monitored as described previously (Leone et al., 2006). Values correspond to an average of at least three independent experiments carried out in duplicate.

Immunofluorescence staining and confocal microscopy observation

Microglial cells cultured in 24-well plates were transfected using Lipofectamine™ 2000 Reagent (Invitrogen) with pRFP-CTIP2 and pVpr-GFP expression vectors. Cells were fixed and permeabilized as previously described (Marban et al., 2005). 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 inverted) equipped with a Planapo oil (63X) immersion lens (numerical aperture = 1,4).

Chromatin immunoprecipitation assays

HEK 293T and Microglial cells cultured in 100-mm-diameter dishes were transfected (or not as indicated) using the calcium phosphate co-precipitation method with the indicated vectors. ChIP assays were performed using the ChIP assay kit (Upstate) 48 h post-transfection. The primary antibodies used for ChIP were as follows: anti-CTIP2 (Abcam), anti-Sp1 (Upstate), anti-HA (Convance), anti-triMeK9/H3, anti-SUV39H1 (Abcam). Treatments with chaetocin were performed at a final concentration of 200nM for 24 h. Immunoprecipitated DNA was subjected to real-time PCR quantification and normalized to the non specific GAPDH promoter enrichment.

mRNA Quantification

RNAs from HIV-1 Bal infected cells were extracted with RNeasy® Plus Mini Kit (QIAGEN) and retrotranscription was performed with Superscript III (Invitrogen). cDNA were quantified and normalised to the β Actin mRNA level.

ACKNOWLEDGMENTS

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)

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 "Directeur de Recherches" of the FNRS.

REFERENCES

- Amini, S., Saunders, M., Kelley, K., Khalili, K. and Sawaya, B.E. (2004) Interplay between HIV-1 Vpr and Sp1 modulates p21(WAF1) gene expression in human astrocytes. *J Biol Chem*, **279**, 46046-46056.
- 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.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, **282**, 1497-1501.
- 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**, 6753-6764.
- Cismasiu, V.B., Ghanta, S., Duque, J., Albu, D.I., Chen, H.M., Kasturi, R. and Avram, D. (2006) BCL11B participates in the activation of IL2 gene expression in CD4+ T lymphocytes. *Blood*, **108**, 2695-2702.
- Claassen, G.F. and Hann, S.R. (2000) A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9498-9503.
- Gartel, A.L. and Radhakrishnan, S.K. (2005) Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res*, **65**, 3980-3985.
- Gartel, A.L. and Tyner, A.L. (1999) Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res*, **246**, 280-289.
- Gartel, A.L. and Tyner, A.L. (2002) The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther*, **1**, 639-649.
- Gartel, A.L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F. and Tyner, A.L. (2001) Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4510-4515.
- Grabarczyk, P., Przybylski, G.K., Depke, M., Volker, U., Bahr, J., Assmus, K., Broker, B.M., Walther, R. and Schmidt, C.A. (2007) Inhibition of BCL11B expression leads to apoptosis of malignant but not normal mature T cells. *Oncogene*, **26**, 3797-3810.
- Greiner, D., Bonaldi, T., Eskeland, R., Roemer, E. and Imhof, A. (2005) Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9. *Nat Chem Biol*, **1**, 143-145.
- Isham, C.R., Tibodeau, J.D., Jin, W., Xu, R., Timm, M.M. and Bible, K.C. (2007) Chaetocin: a promising new antimyeloma agent with in vitro and in vivo activity mediated via imposition of oxidative stress. *Blood*, **109**, 2579-2588.
- 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.
- Kamimura, K., Mishima, Y., Obata, M., Endo, T., Aoyagi, Y. and Kominami, R. (2007a) Lack of Bcl11b tumor suppressor results in vulnerability to DNA replication stress and damages. *Oncogene*, **26**, 5840-5850.
- Kamimura, K., Ohi, H., Kubota, T., Okazuka, K., Yoshikai, Y., Wakabayashi, Y., Aoyagi, Y., Mishima, Y. and Kominami, R. (2007b) Haploinsufficiency of Bcl11b for suppression of lymphomagenesis and thymocyte development. *Biochem Biophys Res Commun*, **355**, 538-542.

- Lagger, G., Doetzlhofer, A., Schuettengruber, B., Haidweger, E., Simboeck, E., Tischler, J., Chiocca, S., Suske, G., Rotheneder, H., Wintersberger, E. and Seiser, C. (2003) The tumor suppressor p53 and histone deacetylase 1 are antagonistic regulators of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21/WAF1/CIP1 gene. *Mol Cell Biol*, **23**, 2669-2679.
- 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.
- Leone, C., Le Pavec, G., Meme, W., Porcheray, F., Samah, B., Dormont, D. and Gras, G. (2006) Characterization of human monocyte-derived microglia-like cells. *Glia*, **54**, 183-192.
- 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.
- Marban, C., Suzanne, S., Dequiedt, F., de Walque, S., Redel, L., Van Lint, C., Aunis, D. and Rohr, O. (2007) Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing. *Embo J*, **26**, 412-423.
- Moon, H.S. and Yang, J.S. (2006) Role of HIV Vpr as a regulator of apoptosis and an effector on bystander cells. *Mol Cells*, **21**, 7-20.
- Murphy, M., Ahn, J., Walker, K.K., Hoffman, W.H., Evans, R.M., Levine, A.J. and George, D.L. (1999) Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev*, **13**, 2490-2501.
- Niculescu, A.B., 3rd, Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C. and Reed, S.I. (1998) Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol*, **18**, 629-643.
- Ocker, M. and Schneider-Stock, R. (2007) Histone deacetylase inhibitors: signalling towards p21cip1/waf1. *Int J Biochem Cell Biol*, **39**, 1367-1374.
- Ogryzko, V.V., Wong, P. and Howard, B.H. (1997) WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol*, **17**, 4877-4882.
- Pei, X.Y., Dai, Y. and Grant, S. (2004) Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors. *Clin Cancer Res*, **10**, 3839-3852.
- Radhakrishnan, S.K., Feliciano, C.S., Najmabadi, F., Haegebarth, A., Kandel, E.S., Tyner, A.L. and Gartel, A.L. (2004) Constitutive expression of E2F-1 leads to p21-dependent cell cycle arrest in S phase of the cell cycle. *Oncogene*, **23**, 4173-4176.
- 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.
- Schrofelbauer, B., Hakata, Y. and Landau, N.R. (2007) HIV-1 Vpr function is mediated by interaction with the damage-specific DNA-binding protein DDB1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 4130-4135.
- Sowa, Y., Orita, T., Hiranabe-Minamikawa, S., Nakano, K., Mizuno, T., Nomura, H. and Sakai, T. (1999) Histone deacetylase inhibitor activates the p21/WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites. *Ann N Y Acad Sci*, **886**, 195-199.
- Suzuki, T., Yokozaki, H., Kuniyasu, H., Hayashi, K., Naka, K., Ono, S., Ishikawa, T., Tahara, E. and Yasui, W. (2000) Effect of trichostatin A on cell growth and

- expression of cell cycle- and apoptosis-related molecules in human gastric and oral carcinoma cell lines. *Int J Cancer*, **88**, 992-997.
- Thierry, S., Marechal, V., Rosenzweig, M., Sabbah, M., Redeuilh, G., Nicolas, J.C. and Gozlan, J. (2004) Cell cycle arrest in G2 induces human immunodeficiency virus type 1 transcriptional activation through histone acetylation and recruitment of CBP, NF-kappaB, and c-Jun to the long terminal repeat promoter. *J Virol*, **78**, 12198-12206.
- Topark-Ngarm, A., Golonzhka, O., Peterson, V.J., Barrett, B., Jr., Martinez, B., Crofoot, K., Filtz, T.M. and Leid, M. (2006) CTIP2 associates with the NuRD complex on the promoter of p57KIP2, a newly identified CTIP2 target gene. *J Biol Chem*, **281**, 32272-32283.
- Vazquez, N., Greenwell-Wild, T., Marinos, N.J., Swaim, W.D., Nares, S., Ott, D.E., Schubert, U., Henklein, P., Orenstein, J.M., Sporn, M.B. and Wahl, S.M. (2005) Human immunodeficiency virus type 1-induced macrophage gene expression includes the p21 gene, a target for viral regulation. *J Virol*, **79**, 4479-4491.
- Wakabayashi, Y., Inoue, J., Takahashi, Y., Matsuki, A., Kosugi-Okano, H., Shinbo, T., Mishima, Y., Niwa, O. and Kominami, R. (2003a) Homozygous deletions and point mutations of the Rit1/Bcl11b gene in gamma-ray induced mouse thymic lymphomas. *Biochem Biophys Res Commun*, **301**, 598-603.
- 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. (2003b) Bcl11b is required for differentiation and survival of alphabeta T lymphocytes. *Nat Immunol*, **4**, 533-539.
- Yoshizuka, N., Yoshizuka-Chadani, Y., Krishnan, V. and Zeichner, S.L. (2005) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr-dependent cell cycle arrest through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Virol*, **79**, 11366-11381.

Titles and legends to Figures

Figure 1 **Associated with the p21 proximal promoter region in vivo, CTIP2 impairs constitutive p21 gene transcription via the proximal –246/-93 Sp1 binding sites**

Microglial cells (A, B) and 293T cells (C) were transfected with the indicated amounts of vectors in the presence of the p21-Luc plasmid. Luciferase activities (A, B) are presented relative to the activity of the p21-LUC cotransfected with the control empty vector. The protein levels (C) were accessed by western blot with the indicated antibodies 48h post- transfection. **(D)** To detect association of CTIP2 and Sp1 with the p21 promoter, ChIP experiments were performed in microglial cells with the indicated antibodies. Immunoprecipitated DNA was subjected to real-time PCR quantification with primers targeting the endogenous p21 promoter proximal region. Specific enrichments of the p21 promoter in the immunoprecipitated material were normalized to enrichments in non specific GAPDH DNA and presented relative to the control. **(E,F)** Microglial cells were transfected with the p21-LUC constructs in the presence or absence of the pFlag-CTIP2 or the pShRNA-CTIP2 plasmids as indicated. Luciferase assays were performed 48h post transfection. Results are presented relative to the basal level of each p21-LUC constructs taken as one.

Figure 2 **TSA and chaetocin stimulate p21 gene transcription**

(A, B) Microglial cells were transfected with the p21-LUC reporter plasmid in the presence or absence of the pSuper-shRNA-CTIP2 as indicated. 24h post-transfection, cells were treated with 450 μ M TSA or the indicated amount of chaetocin for 24 h and assessed for LUC activity. (C) Microglial cells were treated or not with 200nM of chaetocin and subjected to ChIP experiments with anti-H3 trimethylated lysine 9. Immunoprecipitated DNA was subjected to real-time PCR quantification with primers targeting the endogenous p21 promoter proximal region. Specific enrichment of the p21 promoter in the immunoprecipitated material were normalized to enrichments in non-specific GAPDH DNA and presented relative to the control. (D) 293T cells were treated with the indicated amount of chaetocin for 24h before being assessed for cell cycle status by flow cytometry.

Figure 3 **CTIP2 cooperates with SUV39H1 to repress p21 gene transcription**

(A) ChIP experiments were performed in microglial cells with the indicated antibodies. Immunoprecipitated DNA was subjected to real-time PCR quantification with primers targeting the endogenous p21 promoter proximal region. Specific enrichment of the p21 promoter in the immunoprecipitated material were normalized to enrichments in non specific GAPDH DNA and presented relative to the control. (B, C, D,) Microglial cells were transfected with the p21-LUC reporter plasmid in the presence or absence of the indicated vectors. LUC assays were performed 48h post-transfection and results presented relative to the basal level.

Figure 4 **Since P21 gene expression is upregulated by HIV-1 infection, CTIP2 inhibits HIV-1 replication in human primary macrophages and in human primary microglial like cells**

(A) RNAs from HIV-1/Bal infected cells were extracted and assessed for p21 mRNA expression. Inductions at each time points are presented relative to the control GAPDH level. (B) Cells were transfected with HIV-1 pNL4-3 in the

presence or absence (control cells) of the Flag-CTIP2 expression vector. HIV-1 Reverse transcriptase activity was assessed 24, 48 and 72h post-transfection. Inhibition of HIV-1 replication is presented relative to the activity detected with the HIV-1-infected control cells. RT activity in control cells (without Flag-CTIP2) varied between 0 to 197 pg/ml

Figure 5 CTIP2 impairs Vpr-mediated stimulation of p21 gene transcription and the resulted cell cycle arrest

(A) 293T cells inducible for HIV-1 Vpr expression, were transfected with the Flag-CTIP2 expression vector or the control vector 24h before being treated with Doxycyclin. Cell cycle status were accessed by flow cytometry. Controls of Vpr and CTIP2 expressions are presented. Microglial cells (B and E) and 293T cells (C and F) were transfected with the indicated amounts of expression vectors in the presence of the p21-Luc plasmid. Luciferase activities (B and E) are presented relative to the activity of the p21-LUC complemented by the control empty vector. The protein levels (C and F) were accessed by western blot with the indicated antibodies 48h post-transfection. (D and G) 293T cells were transfected or not with the HA-Vpr and the Flag-CTIP2 expression vectors 48h before being processed for ChIP assays. Immunoprecipitated DNA was subjected to real-time PCR quantification with primers targeting the endogenous p21 promoter proximal region. Specific enrichment of the p21 promoter in the immunoprecipitated material were normalized to enrichments in non specific GAPDH DNA and presented relative to the control.

Figure 6 CTIP2 relocates Vpr to subnuclear structures and inhibits Vpr-induced DNA-damages

(A) Microglial cells were transfected with pVpr-GFP alone (panels 1, 2 and 3) or together with pRFP-CTIP2 plasmid (panels 4 to 10). Cells were fixed 24h post-transfection and confocal analysis were performed. (B) nuclear extracts from 293T cells expressing HA-Vpr or/and Flag-CTIP2 were assessed for H2AX expression by western blot experiments. β -actine immunodetection is presented as a control.

Figure 1

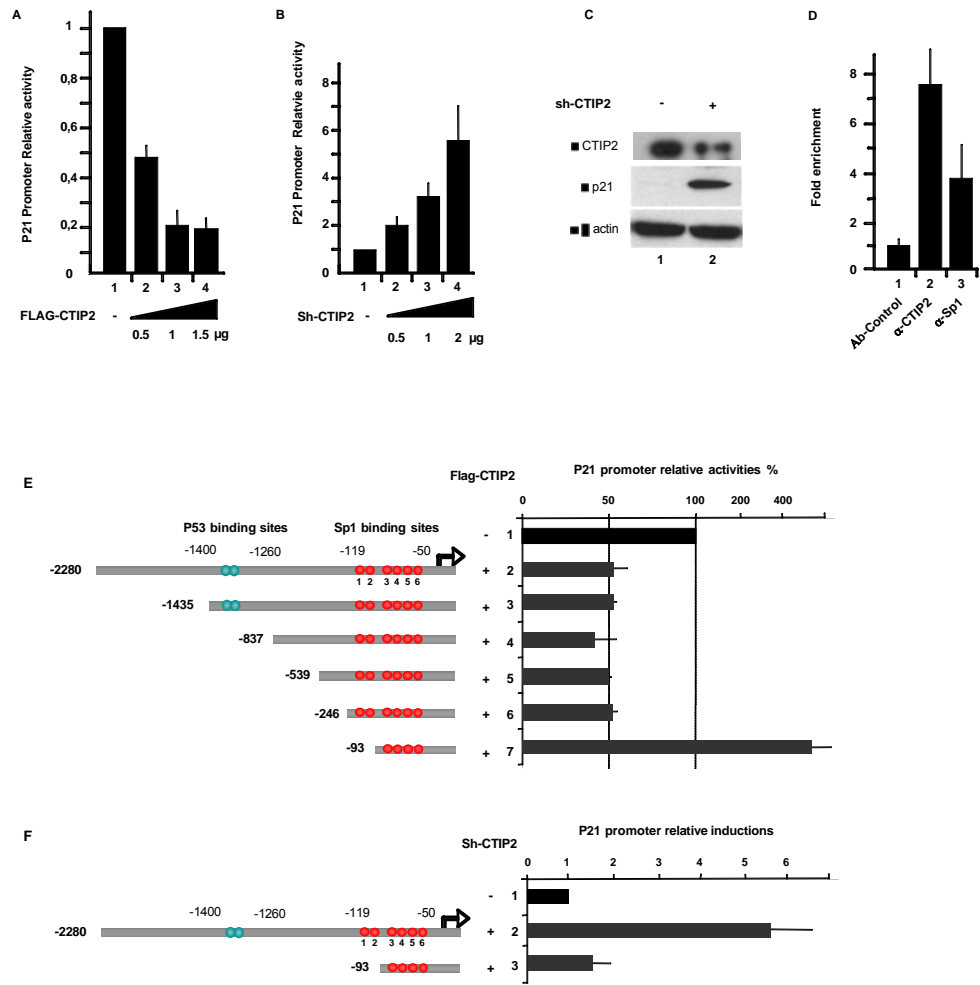


Figure 2

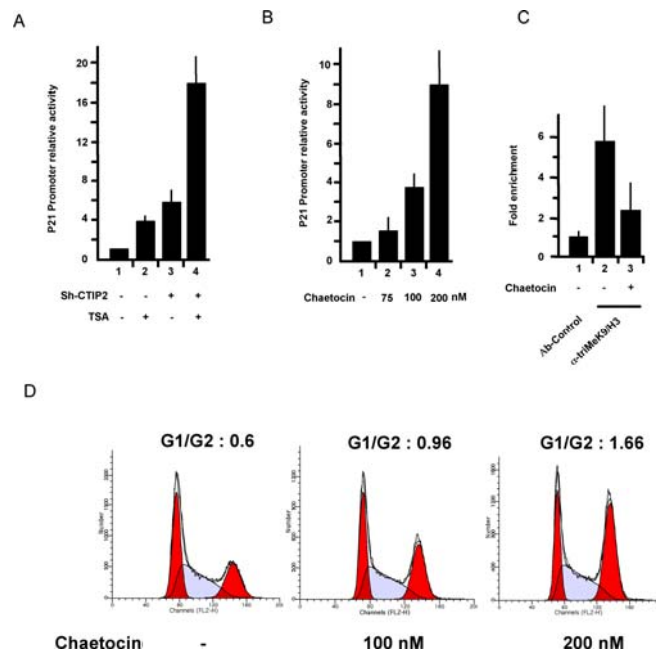


Figure 3

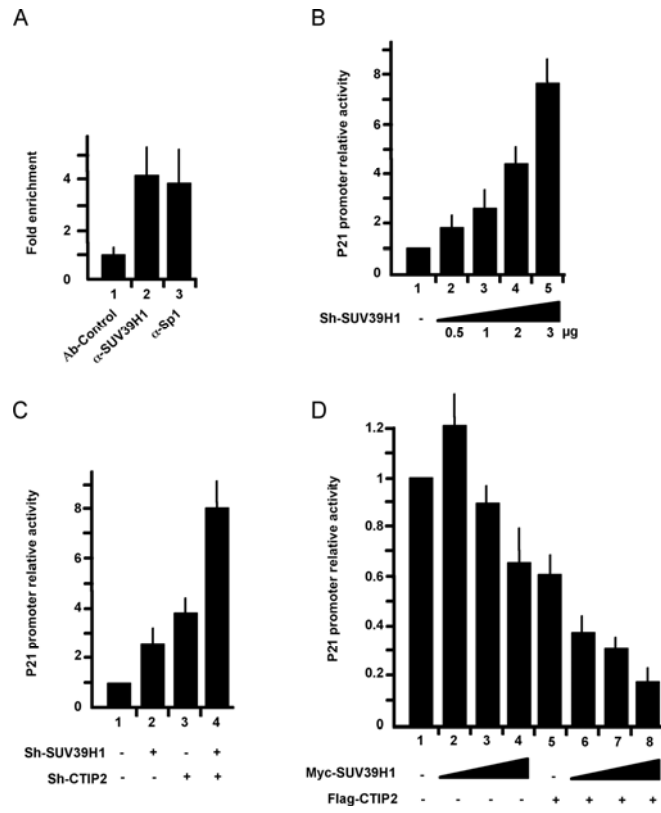


Figure 4

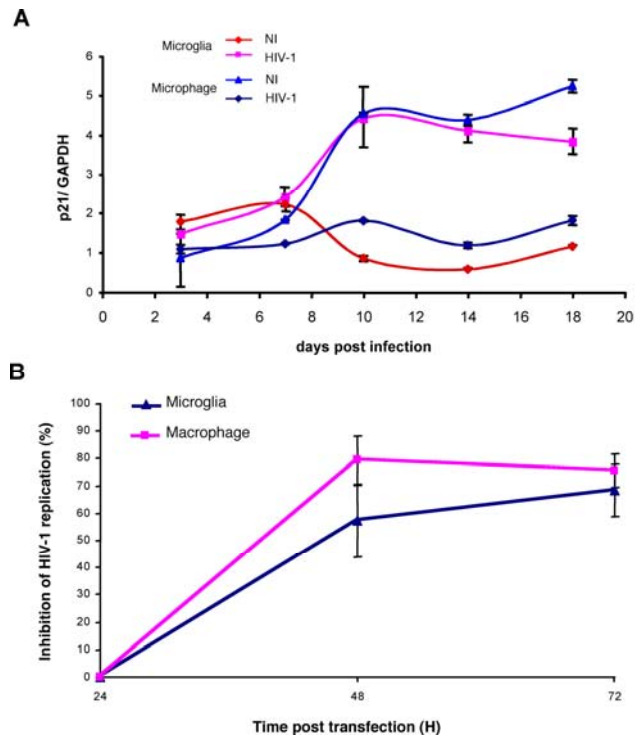


Figure 5

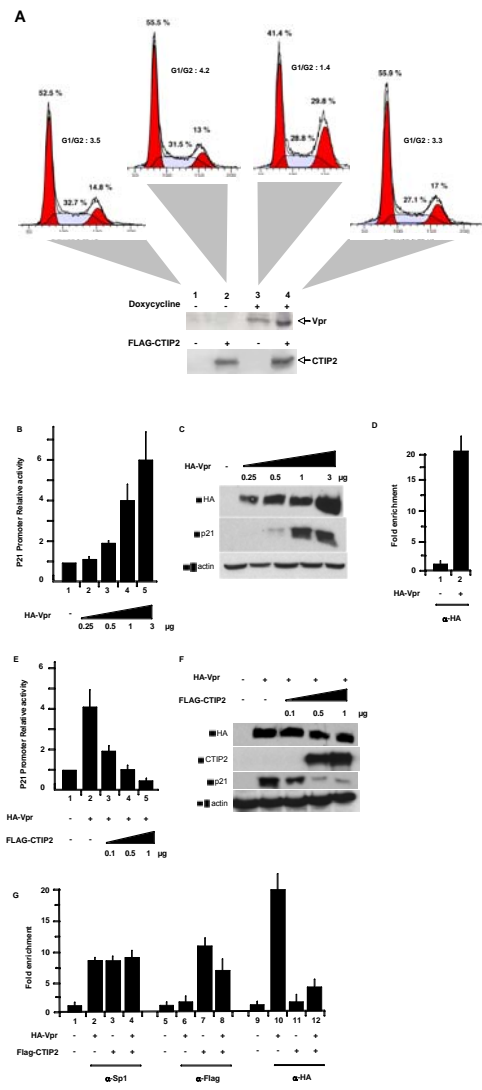
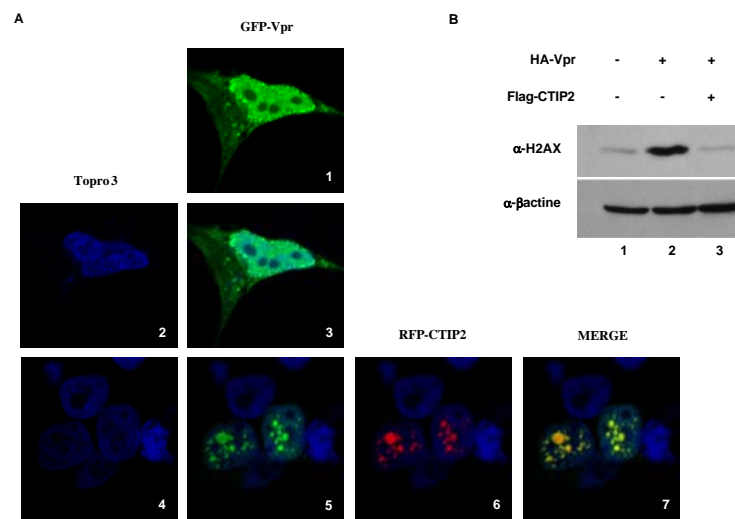


Figure 6



Discussion

Lors de l'infection, la particule virale fusionne avec la cellule cible, le génome viral est rétrotranscrit en ADN et il peut s'intégrer au génome de la cellule hôte. Cette insertion a lieu en majorité dans des zones transcriptionnellement actives de la chromatine, mais elle se fait aussi parfois dans l'hétérochromatine inactive, où nous observons un phénomène de latence post-intégrative. Tant que l'environnement chromatinien du provirus n'est pas modifié, le génome viral ne s'exprimera pas. Or, les thérapies actuelles ciblent les cellules dans lesquelles la réplication virale est active ; les cellules infectées de façon latente sont donc inaccessibles aux thérapies et constituent un sanctuaire pour le virus, permettant ainsi la recolonisation de l'organisme lors de l'arrêt des traitements même lorsque la virémie est indétectable (Chun et al., 1997b; Finzi et al., 1997; Wong et al., 1997). Ce phénomène est d'autant plus accentué au niveau du système nerveux central que le passage au travers de la barrière hémato-encéphalique des différentes molécules thérapeutiques est faible (Staprans et al., 1999; Taylor and Pereira, 2000).

Il a été montré récemment que les cellules microgliales, qui sont la principale cible du VIH-1 au niveau du système nerveux central, constituent le réservoir du VIH-1 (Barber et al., 2006). Il est donc important de mieux comprendre les mécanismes d'action du virus dans ce type cellulaire afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques capables supprimer ou au moins de réduire les réservoirs permettant à terme d'éradiquer totalement le virus (Pomerantz, 2002).

Des premières études réalisées au laboratoire ont mis en évidence le potentiel répresseur du cofacteur nucléaire CTIP2 (COUP-TF Interacting Protein 2) sur la phase tardive de la transcription virale (sous le contrôle de Tat) *via* la formation de structures hétérochromatiniennes associées à HP1 α (Rohr et al., 2003a). Du fait de son effet répresseur de la transcription et de la mise en place parallèle de structures transcriptionnellement inactives, CTIP2 pourrait être responsable de l'apparition de la latence dans les cellules microgliales. Il était donc important d'étudier les mécanismes moléculaires de la mise en place de ce phénomène dans ce type cellulaire.

La latence se mettant en place au cours de la phase précoce de la transcription virale (en absence de Tat), nous nous sommes intéressés aux effets de CTIP2 à ce moment précis.

CTIP2 : un répresseur de la phase précoce de la transcription virale dans les cellules microgliales.

1- CTIP2 réprime la phase précoce de la transcription virale via le promoteur proximal.

Des expériences de quantification de la réplication virale dans des cellules microgliales « like » primaires en présence de CTIP2 ont permis de confirmer les résultats obtenus précédemment au sein du laboratoire sur les lignées cellulaires : CTIP2 étant donc un répresseur de la production virale dans les lignées et dans les cellules primaires, nous avons ainsi validé notre modèle d'étude. (**Publication 3**).

Par ailleurs, des tests d'activité transcriptionnelle réalisés en absence de Tat dans notre lignée ont mis en évidence l'importance de la région proximale contenant des boîtes GC dans l'activité inhibitrice de CTIP2 sur la transcription virale au cours de la phase précoce. Ces résultats montrent que les effets de CTIP2 ne sont pas médiés par une fixation sur les sites de COUP-TF situé en N terminal du promoteur (**Publication 1**) comme pouvait le laisser suggérer la capacité de cette protéine à interagir avec COUP-TF (Avram et al., 2000). Le promoteur proximal est donc suffisant pour permettre l'action de CTIP2 au cours de la phase précoce de la transcription virale dans les cellules microgliales.

De plus, dans ces cellules, des études précédentes ont permis d'identifier le promoteur proximal comme étant une zone de fixation pour les facteurs de transcription Sp1, Sp3, COUP-TF et NF-IL6 sur les boîtes GC. Cette séquence permet également la coopération de Sp1 et COUP-TF pour transactiver la transcription virale (Rohr et al., 1997; Schwartz et al., 2000). Ainsi, d'autres tests, réalisés sur le promoteur total en présence de la surexpression de COUP-TF et Sp1, montrent que CTIP2 est capable d'inhiber l'activation due à la coopération de ces deux facteurs mise en évidence précédemment (**Publication 1**).

2- CTIP2 forme un complexe ternaire avec COUP-TF et Sp1 sur le promoteur proximal.

Des expériences de co-immunoprécipitation ont permis d'identifier la zone centrale de CTIP2 [145-434] et la zone N-terminale [717-813] comme étant les zones d'interaction avec les motifs en doigt de zinc des protéines COUP-TF [49-418] et Sp1

[622-788]. Nous n'observons pas de phénomène de compétition entre les différents facteurs, ce qui suggère la présence d'un complexe ternaire (**Publication 1**). D'autre part, il a été montré que CTIP2 est capable de fixer l'ADN sur les boîtes GC (Avram et al., 2002) mais nos travaux sur le promoteur viral n'ont pas confirmé ces résultats. Nous avons mis en évidence par ailleurs que le facteur Sp1 sert de point d'ancrage au complexe sur le promoteur au niveau des boîtes GC. Il semblerait donc qu'en formant ce complexe ternaire sur le promoteur, CTIP2 bloque l'effet transactivateur des facteurs Sp1 et COUP-TF sur la transcription virale.

CTIP2 est à l'origine de la formation de structures hétérochromatiniennes dans les cellules microgliales.

A l'instar des études sur la transcription lors de la phase tardive (Rohr et al., 2000), nous observons en microscopie confocale une colocalisation des facteurs Sp1, COUP-TF et CTIP2 dans des structures nucléaires sphériques associés à la protéine HP1 α lors de la phase précoce de la transcription (c'est-à-dire en absence de Tat) (**Publication 1**).

La protéine HP1 α est recrutée sur l'histone H3 méthylé sur la lysine 9 lors du processus de formation de l'hétérochromatine et du « silencing » des gènes cellulaires (Bannister et al., 2001; Grewal and Moazed, 2003; Lachner et al., 2001). Il semble donc que CTIP2 induise la formation de structures hétérochromatiniennes dans les cellules microgliales parallèlement à son activité répressive de la transcription virale. Nous avons donc émis l'hypothèse que les structures pouvaient être dû à un remodelage de la chromatine induite par CTIP2 au niveau du promoteur viral.

L'intégration du LTR au sein du génome cellulaire a lieu entre 2 nucléosomes particuliers Nuc 0 et Nuc 1 (Jordan et al., 2003; Verdin, 1991; Verdin et al., 1993), où Nuc 1 bloque le site de départ de la transcription. L'initiation de la transcription nécessite un remodelage de la chromatine pour que le complexe de préinitiation puisse avancer sur l'ADN (Henderson et al., 2004; Verdin et al., 1993). Par ailleurs, la modulation de l'état de la chromatine et de son accessibilité pour la machinerie transcriptionnelle est sous le contrôle de différentes réactions de modification des histones telle que l'acétylation (Hebbes et al., 1994). Il a déjà été fait état de recrutement d'activités enzymatiques histone déacetylase sur le promoteur viral pour moduler son activité. En effet, les facteurs de transcription YY1, LSF, NF-kB p50 et les récepteurs aux hormones thyroïdiennes

recrutent HDAC1 sur le promoteur viral pour réprimer sa transcription dans les cellules T (Coull et al., 2000; He and Margolis, 2002; Hsia and Shi, 2002; Williams et al., 2006).

Nous avons donc cherché à déterminer si dans les cellules microgliales, CTIP2 était capable de recruter des facteurs tels que les HDAC afin d'induire un remodelage de la chromatine provoquant une répression de la transcription et à long terme, une latence post-intégrative.

1- CTIP2 interagit avec HDAC 1 et 2.

Un complexe multiprotéique de 1 à 2 MDa a été identifié associé à CTIP2 dans des extraits de cellules T (Jurkat). Les auteurs ont fait état d'une interaction physique et fonctionnelle entre CTIP2 et SIRT1, une HDAC de classe III insensible à la TSA, au sein de ce complexe (Senawong et al., 2003). Nous avons réalisé des dosages d'activité enzymatique qui ont montré que CTIP2 est associé à des HDAC de classe I et/ou II qui sont sensibles à la TSA; toutefois, nous n'avons pas pu mettre en évidence une association avec les HDAC de classe III (**Publication 2**). Des expériences de co-immunoprécipitation nous ont permis d'affiner nos résultats et de montrer une interaction physique entre CTIP2 et les HDAC 1 et 2 (HDAC de classe I), confortant ainsi les résultats obtenus par dosages enzymatiques mais allant à l'encontre des résultats publiés par Senawong et collaborateurs. Cependant, cette équipe a identifié la séquence [171-350] comme étant la zone d'interaction entre CTIP2 et SIRT1 ; or, dans notre contexte cellulaire, nous avons précédemment mis en évidence que le domaine [145-434] de CTIP2 interagit avec Sp1, COUP-TF et Tat, alors que le domaine [717-813] permettrait l'interaction avec HP1 α (**Publication 1**). Ainsi, il semble peu probable que SIRT1 puisse se fixer également sur la même séquence que Sp1; en effet, CTIP2 ne pouvant lier seul le promoteur, il nécessite la fixation à Sp1 afin d'agir et ne peut donc interagir avec SIRT1. De plus, nous avons identifié la séquence [1-145] de CTIP2 comme étant le site de liaison des HDAC 1 et 2 (**Publication 2**). De ce fait, nous pouvons envisager que les complexes mis en jeu vont être différents d'un type cellulaire à un autre, à l'instar des facteurs de transcription impliqués (Rohr et al., 2003b).

Par ailleurs, toutes les interactions ayant lieu sur des sites différents, nous avons émis l'hypothèse que le recrutement de ces différents partenaires sur le promoteur viral pouvait être dû à la fixation de CTIP2 à Sp1. En se liant au promoteur, CTIP2 induirait ainsi le

recrutement d'une activité histone déacétylase, connue pour être impliquée dans les mécanismes de répression de la chromatine (Hassan et al., 2007; Hebbes et al., 1994). Des tests transcriptionnels montrent en effet, une action répressive dose dépendante et coopérative des 2 HDAC avec CTIP2 sur l'activité du promoteur viral sous forme intégrée et épisomal. Ces résultats sont confirmés au niveau de la réplication du virus dans les cellules microgliales mettant en évidence l'effet coopératif de CTIP2 et des HDAC sur la transcription virale et confortent l'idée de la formation d'un complexe lié *via* Sp1 sur le promoteur viral pour réprimer son activité (**Publication 2**).

2- CTIP2 recrute les HDACs 1 et 2 sur le promoteur viral et induit une déacétylation locale de l'histone H3.

Des expériences d'immunoprécipitation réalisées sur des cellules microgliales infectées confirment cette hypothèse en mettant en avant un recrutement de CTIP2, HDAC 1 et 2 sur le promoteur viral intégré (**Publication 2**). Dans un premier temps, nous avons identifié les sites SP1 comme lieu de recrutement de ce complexe. Nous avons également mis en évidence la présence de HDAC 1 et 2 au niveau du nucléosome 1, qui bloque le site d'initiation de la transcription du VIH-1. De plus, ce recrutement est corrélé à une déacétylation locale de l'histone H3 au niveau du nucléosome 1.

Par la suite, après infection de cellules knock-out pour CTIP2 et quantification des transcrits initiés et élongués, nous avons constaté que CTIP2 inhibe l'étape d'initiation, nous donnant ainsi un argument de plus en faveur d'un blocage de l'initiation de la transcription virale par CTIP2 *via* le recrutement de facteurs de remodelage de la chromatine. Nous remarquons aussi que lors du Knock-down de CTIP2, le recrutement de HDAC1 est augmenté sur le promoteur, ce qui semble en contradiction avec la nécessité de la présence de CTIP2 pour recruter HDAC1 sur le promoteur (**Publication 2**). Ceci peut s'expliquer par la présence d'autres partenaires de HDAC1 pouvant permettre son recrutement sur le promoteur viral *via* les sites SP1 en l'absence de CTIP2, comme par exemple les facteurs YY1 et LSF, connus pour favoriser la liaison d'HDAC1 au promoteur dans les lymphocytes T (Coull et al., 2000; Doetzlhofer et al., 1999).

D'autre part, des résultats obtenus dans des lymphocytes T CD4+ quiescents insensibles aux trithérapies montrent que si l'on bloque les HDAC par un traitement à l'acide Valproïque (inhibiteur des HDAC de classe I et II), nous observons une réduction de leur nombre (Lehrman et al., 2005). Les travaux de Ylisastigui et collaborateurs ont mis en

évidence un blocage du recrutement de HDAC 1 dans des LTCD4 quiescents, permettant une reprise de la réplication (Ylisastigui et al., 2004). Il semble donc que la présence des HDAC joue un rôle primordial dans la mise en place et le maintien de la latence dans ces cellules. Enfin, nos résultats préliminaires font également état d'un rôle capital des HDAC recrutées par CTIP2 dans la répression de la transcription virale dans les cellules microgliales. Cet ensemble de données nous laisse donc supposer que CTIP2 recruterait les HDAC afin d'induire un remodelage de la chromatine conduisant à l'extinction du promoteur viral.

3-CTIP2 recrute un complexe de remodelage de la chromatine sur le promoteur viral pour bloquer son activité.

Les HDAC 1 et 2 sont connues comme faisant parti de plusieurs complexes de remodelage de la chromatine. Ainsi, les complexes sin3, NuRD et Co-Rest sont recrutés par les histones méthylées *via* leurs sous-unités MDB2 et p66 afin de modifier la position des nucléosomes et activer la transcription des gènes (de Ruijter et al., 2003; Flaus and Owen-Hughes, 2004). Or, nous n'avons pu identifier aucun de ces complexes liés à CTIP2 (résultats non publiés). Il semble donc que CTIP2 soit capable de moduler l'état de la chromatine par l'intermédiaire d'un complexe non encore identifié mais contenant toutefois HDAC 1 et 2.

Les phénomènes d'acétylation et de méthylation des histones sont fortement liés dans le contrôle de la transcription des gènes. Ainsi des interactions physiques et fonctionnelles ont été mises en évidence entre des HDAC et SUV39H1 (Reed-Inderbitzin et al., 2006; Vaute et al., 2002). L'activation ou la répression de la transcription des gènes secondaire à la méthylation des histones va être fonction de la nature du site touché (Kouzarides, 2002). La méthylation des résidus arginines de l'histone H3 conduit à une activation de la transcription, alors que la méthylation des résidus lysines est associée à une répression.

Le résidu K9/H3 méthylé conduit à une répression de la transcription et constitue un site de fixation spécifique pour les protéines de la famille HP1 (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001) qui sont les marqueurs de l'hétérochromatine.

Nous avons mis en évidence la présence de la protéine HP1 α dans les structures nucléaires induites par CTIP2 (**Publication 1**), nous laissant ainsi supposer la présence d'une méthyltransférase au sein du complexe.

Dans les cellules eucaryotes le résidu K9/H3 est spécifiquement méthylé par SUV39H1 (Rea et al., 2000), et cette méthyltransférase semble la seule capable de permettre le recrutement de HP1 *via* son chromodomaine (Stewart et al., 2005).

Nos expériences de CHIP nous ont permis de mettre en évidence la capacité de CTIP2 à recruter SUV39H1 et les différentes formes de HP1 sur le promoteur viral (**Publication 2**). Ce recrutement est corrélé à une augmentation du niveau de méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 au niveau du nucléosome 1.

De plus, SUV39H1 ne semble pas isolément avoir d'effet sur la transcription et la réplication virale. La présence de CTIP2 est ainsi indispensable afin de visualiser un effet coopératif de SUV39H1 sur le promoteur viral.

Ce recrutement conduisant à un « silencing » des gènes viraux semble donc résulter des interactions physiques entre SUV39H1 et le domaine [145-434] de CTIP2 visualisées lors des expériences d'immunoprécipitation et entre le domaine [717-813] de CTIP2 et HP1 α mises en évidence précédemment (**Publications 1 et 2**).

Le domaine [145-434] de CTIP2 est donc impliqué 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 est indispensable à l'établissement d'une structure hétérochromatinienne stable (Stewart et al., 2005). Nous pouvons ainsi, émettre l'hypothèse d'un recrutement du facteur répresseur HP1 α sur le promoteur du VIH-1 par l'intermédiaire de SUV39H1 afin de stabiliser la structure hétérochromatinienne dans le but de maintenir l'état de latence.

Par ailleurs, lors des expériences de Knock-Down, nous diminuons le recrutement de SUV qui est corrélé à une diminution de la triméthylation de H3/K9 et à une diminution du recrutement de HP1 β et γ . Par contre, nous n'observons pas de diminution du recrutement de HP1 α sur le promoteur viral. Par ailleurs, la stimulation des cellules U1 infectées de façon latente par le PMA ne s'accompagne pas d'une diminution du recrutement de HP1 α (**Publication 2**).

Ces résultats suggèrent que les mécanismes moléculaires de mise en place de la latence induite par CTIP2 sont différents de ceux mis en jeu pour la levée de celle-ci et que les différentes protéines HP1 ont des rôles différents.

Le rôle de SUV39H1 et de la protéine HP1 γ dans la mise en place de la latence a également été identifié dans des lymphocytes (du Chene et al., 2007), confortant les résultats présentés précédemment dans les cellules microgliales. Cela montre également que, le complexe recruté par CTIP2 que nous avons décrit pourrait être généralisé.

Ainsi les différentes études réalisées ont permis de montrer la capacité de CTIP2 à inhiber la transcription virale en recrutant sur le promoteur intégré un complexe capable d'induire une structure hétérochromatinienne répressive.

CTIP2 recrute 2 enzymes, HDAC1 et HDAC2, qui déacétylent l'histone H3 du nucléosome 1 situé sur le site d'initiation du promoteur stabilisant le nucléosome dans sa position. Ce facteur bloque ainsi l'initiation de la transcription, il recrute également l'histone méthyltransférase, SUV39H1, qui conduit à la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 permettant ainsi la liaison des protéines HP1 et la formation de l'hétérochromatine qui place le promoteur viral dans un environnement transcriptionnel inactif.

CTIP2 contribue donc à la mise en place de la latence post-intégrative dans les cellules microgliales et ainsi à la formation de réservoirs insensibles aux thérapies actuelles.

Les sites Sp1 sont-ils indispensables à l'effet répresseur de CTIP2 sur la transcription virale ?...

Au cours de notre étude nous avons étudié la capacité de CTIP2 à réprimer un promoteur ne contenant que les 3 boîtes GC consensus de façon à déterminer le rôle primordial de Sp1 dans le recrutement de CTIP2 sur le promoteur viral. Nous avons ainsi pu observer que les sites Sp1 sont suffisants pour permettre l'activité répressive de CTIP2 sur le promoteur viral. De plus, lors de tests transcriptionnels, la délétion ou la mutation des sites Sp1 conduit à une diminution drastique (90%) de l'activité transcriptionnelle du LTR, montrant l'importance des sites Sp1 dans la stimulation du promoteur viral. Mais, CTIP2 reste tout de même capable d'inhiber les 10% d'activité du promoteur viral restant. Il semblerait donc que les trois boîtes GC du promoteur minimal soient suffisantes mais pas absolument nécessaires à l'activité répressive de CTIP2 (**Publication 1**). CTIP2 serait donc capable de réprimer la transcription des gènes du VIH-1 par un autre mécanisme, indépendant des sites Sp1.

Par ailleurs, les travaux de Cucciolla et collaborateurs ont mis en évidence que CTIP2 régule l'expression du facteur p57^{kip2} en agissant sur sa région promotrice [-87/-113], laquelle contient deux sites Sp1 (Cucciolla et al., 2008). Les auteurs ont émis l'hypothèse d'un mécanisme d'action de CTIP2 dû soit à son recrutement direct sur le promoteur, soit à un recrutement de CTIP2 associé au complexe de remodelage de la

chromatine NuRD (contenant des HDAC de classe I) (Topark-Ngarm et al., 2006). Nos résultats, ainsi que les données de la littérature, montrent donc que CTIP2 pourrait agir sur d'autres promoteurs *via* une interaction avec les sites Sp1, ainsi que par le recrutement d'activités histones déacétylases.

Un autre effet possible de CTIP2 ?

Exprimé dans le cerveau et le système immunitaire (Leid et al., 2004), CTIP2 permet le développement des projections des neurones corticospinaux (Arlotta et al., 2005). Par ailleurs, CTIP2 est connu pour avoir un impact sur le développement des lymphocytes T et comme étant un facteur anti-apoptotique (Grabarczyk et al., 2007; Wakabayashi et al., 2003b). Ces résultats suggèrent un effet de CTIP2 sur le cycle cellulaire, mais son mécanisme d'action est encore inconnu.

Une des protéines régulatrices clé du cycle cellulaire, p21, est modulée au niveau transcriptionnel ; son promoteur possède de nombreux sites Sp1 que nous avons identifié précédemment comme des sites d'action potentiel de CTIP2. L'activation de sa transcription par des facteurs tels que par exemple la protéine p53, Rb, le TGF β ou encore les récepteurs des glucocorticoïdes va conduire à un arrêt du cycle cellulaire lorsque la cellule est en contact avec des stimuli de stress et lors de détériorations de l'ADN (Li et al., 1998; Liu et al., 1996a; Zhu et al., 2003a). La protéine p21, en provoquant la phosphorylation du complexe p34cdc2/cyclin B, conduit à son inactivation et au blocage du cycle cellulaire en G2/M (figure 51) (pour revue, (Gartel and Radhakrishnan, 2005)). Par ailleurs, les HDAC (et plus particulièrement HDAC1) ont été identifiées comme interagissant avec le promoteur de p21 afin d'induire sa répression (Lagger et al., 2003; Lagger et al., 2002).

Toutes ces données nous ont encouragé à étudier l'impact que pouvait avoir CTIP2 sur le cycle cellulaire dans les cellules microgliales *via* la modulation de l'expression de cette protéine.

1- CTIP2 réprime la transcription du gène de p21 *via* son recrutement sur les boîtes GC.

Une première série de tests transcriptionnels nous ont permis de mettre en évidence une inhibition de la transcription du promoteur de p21 par CTIP2 *in vivo*. Ce résultat a ensuite été confirmé par l'observation d'une augmentation de l'expression de la

protéine p21 lors d'un Knock-Down dirigé contre la protéine CTIP2 endogène (**Publication 3**). CTIP2 a donc un effet répresseur constitutif sur le promoteur endogène de p21 ce qui peut expliquer le faible niveau d'expression de cette protéine en l'absence de toute stimulation : CTIP2 permettrait ainsi la progression du cycle cellulaire.

Nos expériences de ChIP nous ont permis de visualiser *in vivo*, le recrutement de CTIP2 sur le promoteur du gène de p21 au niveau des boîtes GC correspondant aux sites de liaison de Sp1. Des tests transcriptionnels réalisés sur des promoteurs tronqués ont montré l'importance des sites 1 et 2 [-119/-93] pour l'effet répresseur de CTIP2 (**Publication 3**). En effet, en l'absence de ces sites, nous observons une forte stimulation de l'activité transcriptionnelle malgré l'expression de CTIP2.

Dans la littérature, HDAC1 est décrite comme entrant en compétition avec la protéine activatrice p53 pour sa fixation à Sp1 afin de réprimer la transcription de p21. Lors d'un stress cellulaire HDAC1 se détache de Sp1 favorisant l'activité stimulatrice de p53 (Lagger et al., 2003). Une hypothèse pourrait de ce fait expliquer notre résultat : CTIP2 surexprimé dans le cytoplasme en l'absence des sites de fixation nécessaires, peut lier HDAC1, diminuant ainsi sa fraction entrant en compétition avec p53 pour le site Sp1 numéro 3 [-82/-77]. De ce fait, p53 peut se fixer plus facilement et induire une transactivation de p21. Cette hypothèse est vérifiée par l'absence d'effet du Knock-Down de CTIP2 sur le promoteur tronqué [-93/+1] (**Publication 3**). Dans ce contexte, HDAC1 n'est plus recruté par CTIP2 : elle peut donc entrer en compétition avec p53 pour le site de fixation et bloquer son effet activateur. Nous n'avons par ailleurs observé aucune modification du niveau d'expression de p53 induite par CTIP2 (Données non publiées) qui aurait pu également être à l'origine de la stimulation transcriptionnelle plus importante de p21 en l'absence des sites permettant la repression par CTIP2. En effet, l'augmentation du niveau d'expression de p53 peut conduire à un arrêt du cycle cellulaire en G2/M via une stimulation du promoteur de p21 (Taylor et al., 1999). CTIP2 réprime donc de façon ubiquitaire le niveau transcriptionnel de p21 par l'intermédiaire des deux premiers sites Sp1 de son promoteur [-119/-93].

Nous nous sommes alors intéressé aux complexes enzymatiques associé à CTIP2 sur ce promoteur.

2- CTIP2 recrute un complexe de remodelage de la chromatine sur le promoteur de p21 pour réprimer son activité de façon constitutive.

De nombreuses études ont mis en évidence que lors de l'application d'inhibiteurs de HDAC (TSA, butyrate...), qu'on observait un effet stimulateur sur l'expression de la protéine p21, conduisant à un arrêt du cycle cellulaire (pour revue voir (Ocker and Schneider-Stock, 2007). De plus, CTIP2 est connu pour interagir avec les HDAC 1 et 2 sensibles à la TSA (Cismasiu et al., 2005; Topark-Ngarm et al., 2006). CTIP2 pourrait donc constituer un intermédiaire entre les HDAC et le promoteur de p21, facilitant ainsi leur recrutement sur le promoteur de façon à induire une répression de son expression. Ce phénomène, en plus de l'effet précédemment décrit concernant la compétition entre p53 et HDAC 1, pourrait expliquer une partie de la stimulation de l'expression de p21 provoquée par les inhibiteurs de HDAC.

Le traitement de cellules Knock-Down pour CTIP2 avec un inhibiteur des HDAC des classes I et II (TSA) montre un effet coopératif de CTIP2 et des HDAC sensibles à la TSA sur l'activité transcriptionnelle de p21 (**Publication 3**). Ces résultats sont en accord avec nos observations précédentes sur le promoteur viral. CTIP2 semble donc également agir avec les HDAC 1 et 2 afin d'induire la répression constitutive de ce gène.

Afin de confirmer la présence d'un complexe identique à celui mis en évidence dans l'extinction de la transcription du génome viral (**Publications 1 et 2**), nous avons voulu déterminer si la méthyltransférase SUV39H1 agissait également sur le promoteur de p21. Ainsi, le traitement à la Chaetocine, un inhibiteur sélectif de SUV39H1 (Greiner et al., 2005), induit une activation transcriptionnelle de p21 concomitante à une diminution de la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 et au blocage du cycle cellulaire en G2/M de façon dose dépendante. Cela confirme donc l'implication de la méthylation des histones dans la modulation du cycle cellulaire et plus particulièrement celle de la méthyltransférase SUV39H1.

Nous avons confirmé ces résultats par des tests transcriptionnels dans des cellules surexprimant ou présentant un Knock-Down de SUV39H1 et de CTIP2. On observe alors un effet coopératif de ces deux protéines sur la transcription du gène de p21, et des expériences de ChIP nous ont permis de visualiser le recrutement de SUV39H1 sur le promoteur proximal (**Publication 3**).

Il semble donc que CTIP2 recrute sur le promoteur du gène de p21 des partenaires enzymatiques identique à ceux recrutés sur le promoteur viral. Nous pouvons donc

émettre l'hypothèse que CTIP2 induit une répression transcriptionnelle de p21 *via* la formation d'un environnement hétérochromatinien au niveau de son promoteur.

3- L'implication de p21 dans l'infection par le VIH-1.

Au cours de l'infection par le VIH-1, la protéine virale Vpr agit sur le cycle cellulaire de façon à optimiser la production virale (Goh et al., 1998). Pour se faire Vpr active la transcription de p21 pour induire un blocage du cycle en G2/M dans les macrophages (Vazquez et al., 2005) comparable à celui induit par la Chaétocine dans les cellules microgliales (**Publication 3**). Cette activation de p21 a été attribuée à une action transcriptionnelle de Vpr *via* sa fixation à Sp1 sur les boîtes GC du promoteur de p21 dans les astrocytes (Amini et al., 2004). Nous nous sommes donc intéressé à l'action possible de CTIP2 sur l'effet de Vpr *via* les sites Sp1.

Dans un premier temps, nous avons confirmé dans des cellules microgliales « like » primaires obtenus à partir de macrophages différenciés que l'infection par le VIH-1 induisait bien une augmentation de l'expression de p21, à l'instar de ce qui a été précédemment décrit dans les macrophages (Vazquez et al., 2005) et les lymphocytes (Bartz et al., 1996) (**Publication 3**). Ces différents résultats nous confortent dans l'idée que notre lignée cellulaire constitue un bon modèle d'étude de l'infection des cellules microgliales par le VIH-1.

4- Des effets multiples de CTIP2 contrecarrent les effets de la protéine virale Vpr sur le cycle cellulaire.

Dans les cellules microgliales, nous avons observé grâce à la technique de ChIP, la liaison de Vpr sur le promoteur proximal de p21 permettant ainsi de montrer son recrutement sur les sites Sp1 du promoteur de p21 pour la première fois. En effet les données bibliographiques laissaient supposer sa liaison sans pour autant la démontrer formellement (Amini et al., 2004; Chowdhury et al., 2003; Vazquez et al., 2005). De plus, nos expériences montrent que CTIP2 est capable de réprimer l'augmentation de l'expression de p21 en agissant directement sur le niveau de fixation de Vpr sur le promoteur, conduisant à un déblocage du cycle cellulaire visualisé en cytométrie de flux (**Publication 3**).

De plus, CTIP2 semble affecter la localisation cellulaire de Vpr. En effet, en l'absence de CTIP2, la protéine Vpr est présente en microscopie confocale dans

l'ensemble de la cellule avec marquage plus important au niveau de la membrane nucléaire. En présence de CTIP2, nous observons une relocalisation de Vpr au niveau nucléaire au sein de structures denses qui colocalisent avec CTIP2 (**Publication 3**). Nous avons par ailleurs mis en évidence une interaction physique entre CTIP2 et Vpr par co-immunoprécipitation (données non publiées), ce qui pourrait expliquer la relocalisation de Vpr.

Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'en plus de l'effet sur la transcription de p21, CTIP2 contre-carre les effets de Vpr en bloquant ses différentes fonctions au sein de la cellule au cours de l'infection. En effet, en relocalisant Vpr au niveau nucléaire, CTIP2 pourrait perturber l'entrée nucléaire du génome viral, le blocage du cycle cellulaire nécessaire à l'expression virale ainsi que la stimulation de la transcription virale induite par Vpr. CTIP2 agit donc de façon multimodale sur les différentes fonctions de Vpr.

Par ailleurs, les différentes études publiées montrent que Vpr agit sur les voies de dommages à l'ADN (Chowdhury et al., 2003; Roshal et al., 2003) et les voies apoptotiques mitochondriales (Chang et al., 2000; Muthumani et al., 2002b; Roumier et al., 2002; Watanabe et al., 2000) ; d'autre part, les effets anti-apoptotiques de CTIP2 ont été précédemment attribués à sa capacité à maintenir l'intégrité génique (Kamimura et al., 2007a) et à moduler les voies apoptotiques (Grabarczyk et al., 2007).

Vpr provoque une augmentation de la quantité du variant d'histone H2AX phosphorylé (Lai et al., 2005), correspondant à un marquage des zones de l'ADN endommagé nécessitant une réparation. Lors de la surexpression de CTIP2, nos résultats montrent une diminution de la forme phosphorylée de cette protéine induite par Vpr. Ces données confirment donc, que CTIP2 est capable de moduler les effets de Vpr à différents niveaux et pas seulement d'un point de vue du blocage du cycle cellulaire *via* p21 (**Publication 3**).

Nos études ont ainsi permis de mettre en évidence que l'établissement de la latence transcriptionnelle dans les cellules microgliales ne se résume sans doute pas seulement à une répression de la transcription virale, mais que CTIP2 agit à différents niveaux au cours de l'infection par le VIH-1. En effet, en réprimant l'expression de p21 et les effets de Vpr sur le cycle viral et les voies de dommage à l'ADN, CTIP2 favoriserait également la latence par l'établissement d'un contexte cellulaire défavorable à l'expression virale.

Conclusions et perspectives

Dans un premier temps, les différentes études réalisées ont permis de montrer la capacité de CTIP2 à inhiber la transcription virale, au cours de la phase précoce, en recrutant sur le promoteur intégré un complexe capable d'induire une structure hétérochromatinienne.

En effet, en interagissant avec des cofacteurs cellulaires, CTIP2 induit un remodelage de la chromatine au niveau du promoteur viral afin d'inhiber sa transcription dans les cellules microgliales. Nous avons ainsi pu déterminer que le domaine N-terminal [1-354] de CTIP2 est responsable du recrutement des enzymes HDAC1 et HDAC2 sur le promoteur du VIH-1 ; le domaine [145-434] permet à CTIP2 d'être recruté par l'intermédiaire des facteurs de transcription cellulaires Sp1 et COUP-TF fixés sur les boîtes GC de la séquence LTR et de recruter la méthyltransférase SUV39H1; et le domaine C-terminal [717-813] intervient dans le recrutement de HP1 α sur le promoteur viral.

Grâce à ces différentes interactions, une fois CTIP2 ancré au promoteur par l'intermédiaire de Sp1, il recrute HDAC 1 et HDAC 2 grâce à son domaine N-terminal provoquant la déacétylation de l'histone H3 sur la lysine 9. Le domaine central de CTIP2 recrute également SUV39H1 permettant la méthylation du résidu K9/H3 et créant de cette façon un site de fixation pour les protéines HP1 (figure 56).

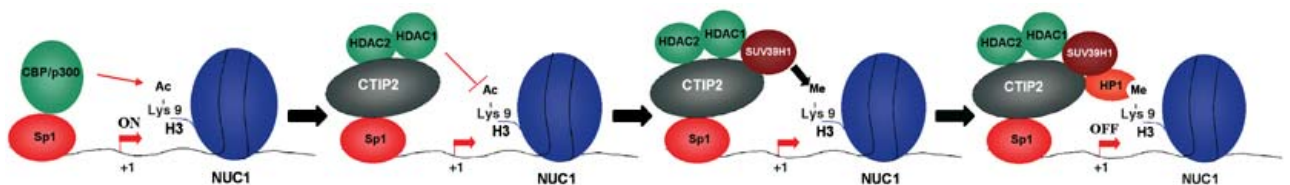


Figure 56 : les différentes étapes de la mise en place d'un environnement hétérochromatinien autour du promoteur viral grâce à CTIP2

(Marban et al., 2007)

CTIP2 recrute sur le promoteur viral, *via* Sp1, un complexe contenant HDAC 1, HDAC 2, SUV39H1 et HP1 conduisant à la formation d'une structure hétérochromatinienne autour du promoteur permettant la mise en place d'une latence post-intégrative.

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 VIH-1. CTIP2 contribue donc à la mise en

place de la latence post-intégrative dans les cellules microgliales et ainsi à la formation de réservoirs insensibles aux thérapies actuelles.

Il reste donc maintenant à déterminer si ce mécanisme peut se généraliser à d'autres types cellulaires tels que les lymphocytes T CD4+. Le but à long terme est de développer des thérapies visant CTIP2 et/ou les enzymes du complexe qui lui est associé, afin de lever l'état de latence et rendre ces cellules accessibles aux thérapies ciblant les cellules actives.

Dans un deuxième temps, CTIP2 étant capable d'interagir avec Sp1, nous avons également mis en évidence un effet répresseur constitutif de ce facteur sur l'expression de la protéine régulatrice du cycle cellulaire : p21.

Sur son promoteur, contenant également des boîtes GC, CTIP2 est recruté via Sp1 sur la séquence [-119/-93]. Tout comme pour le promoteur viral, CTIP2 recrutent ensuite des HDACs sensibles à la TSA ainsi que la méthyltransférase SUV39H1 conduisant à une extinction de l'expression du gène (figure 57).

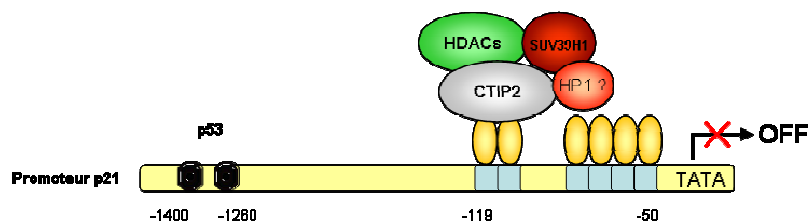


Figure 57 : L'extinction de l'expression de p21 par CTIP2

CTIP2 recrute par l'intermédiaire des deux premiers sites Sp1 du promoteur un complexe enzymatique conduisant à l'inhibition de la transcription du gène de p21. La présence de HP1 n'a pas encore été confirmée.

Par ailleurs, nous avons montré que la protéine virale Vpr est capable d'interagir avec le promoteur du gène de p21 pour induire son expression afin de bloquer le cycle cellulaire en phase G2/M et de permettre une réplication virale optimale lors de l'infection des cellules microgliales.

Cependant, CTIP2 est capable de réprimer l'effet de Vpr en diminuant son recrutement sur le promoteur et en induisant sa relocalisation nucléaire dans des structures denses (figure 58).

CTIP2 peut ainsi réprimer l'expression de p21 et ainsi de contre-carrer ses effets sur le cycle cellulaire qui se retrouve débloqué.

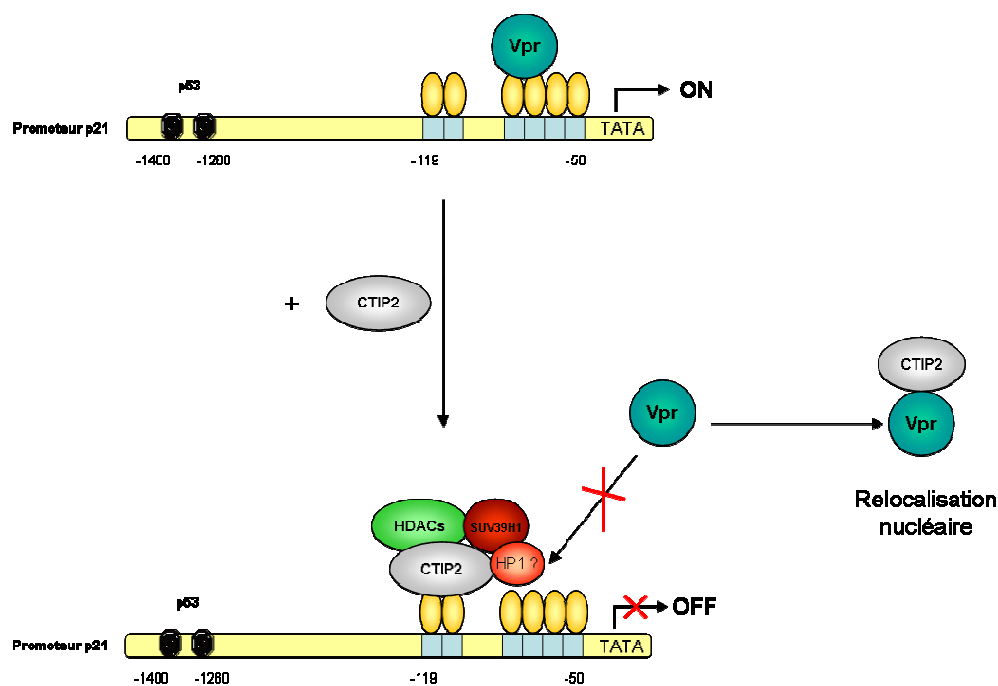


Figure 58 : CTIP2 contre-carre les effets de Vpr sur le promoteur de p21

En présence de Vpr, CTIP2 induit sa relocalisation cellulaire dans des structures nucléaires denses et diminue son recrutement sur le promoteur.

La poursuite du projet va consister à déterminer la nature des différents facteurs du complexe. Ainsi, il faudrait confirmer que les HDACs sensibles à la TSA présentent sont bien HDAC 1 et HDAC 2, que SUV39H1 induit bien le recrutement de protéines HP1 sur le promoteur de p21 et enfin que les effets observés suite au traitement à la chaétocine résultent bien d'un effet sur p21 *via* SUV39H1 et non pas uniquement d'un impact du traitement sur les voies du stress oxydatif induisant le blocage du cycle. Pour cela nous envisageons l'utilisation d'une lignée cellulaire mutée pour le gène de p21 et de comparer les effets de la chaétocine dans ces cellules avec celui précédemment observé dans les cellules sauvages.

Nous chercherons également à déterminer si les phénomènes de méthylation de l'ADN peuvent être impliqués dans les mécanismes de modulation par CTIP2 de la transcription du gène de p21. En effet, CTIP2 est capable d'interagir avec les Dnmt et pourrait donc ainsi en les recrutant sur le promoteur moduler le niveau transcriptionnel du gène de p21.

Ces résultats ont permis de mettre en évidence que CTIP2 agit à différents niveaux au cours de l'infection par le VIH-1 afin de favoriser la latence : premièrement, au niveau de la transcription virale en induisant la formation d'un environnement chromatinien répressif ; et, deuxièmement, en réprimant l'expression de p21, CTIP2 favorise

également la latence par l'établissement d'un contexte cellulaire défavorable à l'expression virale.

Il n'est donc pas à exclure que CTIP2 puisse moduler la transcription d'autres gènes pour induire la latence transcriptionnelle post-intégrative dans ce type cellulaire. Ainsi son ciblage par les thérapies pourrait permettre de bloquer plusieurs effets cellulaires et transcriptionnels induits par l'infection permettant la latence virale et donc de permettre un meilleur effet des thérapies actuelles.

Annexe 1 : Nouvelle nomenclature des enzymes de modification de la chromatine chez l'Homme

Déméthylases		Méthyltransférases	
Ancienne nomenclature	Nouvelle nomenclature	Ancienne nomenclature	Nouvelle nomenclature
LSD1/BHC	KDM1	SUV39H1	KMT1A
JHDM1a/FBXL11	KDM2A	SUV39H2	KMT1B
JHDM1b/FBXL10	KDM2B	G9a	KMT1C
JHGM2a	KDM3A	EuHMTase/GLP	KMT1D
JHDM2b	KDM3B	ESET/SETDB1	KMT1E
JMJD2A/JHDM3A	KDM4A	CLL8	KMT1F
JMJD2B	KDM4B	MLL1	KMT2A
JMJD2C/GASC1	KDM4C	MLL2	KMT2B
JMJD2D	KDM4D	MLL3	KMT2C
JARID1A/RBP2	KDM5A	MLL4	KMT2D
JARID1B/PLU-1	KDM5B	MLL5	KMT2E
JARID1C/SMCX	KDM5C	hSET1A	KMT2F
JARID1D/SMCY	KDM5D	hSET1B	KMT2G
UTX	KDM6A	ASH1	KMT2H
JMJD3	KDM6B	SET2	KMT3A
		NSD1	KMT3B
		SYMD2	KMT3C
		DOT1L	KMT4
		Pr-SET7/8	KMT5A
		SUV4-20H1	KMT5B
		SUV4-20H2	KMT5C
		EZH2	KMT6
		SET7/9	KMT7
		RIZ1	KMT8

Acétyltransférases	
Ancienne nomenclature	Nouvelle nomenclature
HAT1	KAT1
hGCN5	KAT2A
PAF	KAT2B
CBP	KAT3A
P300	KAT3B
TAF1	KAT4
TIP60/PLIP	KAT5
MOZ/MYST3	KAT6A
MORF/MYST4	KAT6B
HBO1/MYST2	KAT7
HMOF/MYST1	KAT8
ELP3	KAT9
TFIIIC90	KAT12
SRC1	KAT13A
ACTR	KAT13B
P160	KAT13C
CLOCK	KAT13D

Adapté d'après (Allis et al., 2007).

Références bibliographiques

- (1982) Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS) among patients with hemophilia A. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **31**, 644-646, 652.
- (1999a) The mode of delivery and the risk of vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1--a meta-analysis of 15 prospective cohort studies. The International Perinatal HIV Group. *N Engl J Med*, **340**, 977-987.
- (1999b) Phase II begins for T-20. *AIDS Patient Care STDS*, **13**, 567-568.

A

- Agbottah, E., Deng, L., Dannenberg, L.O., Pumfery, A. and Kashanchi, F. (2006) Effect of SWI/SNF chromatin remodeling complex on HIV-1 Tat activated transcription. *Retrovirology*, **3**, 48.
- Aggarwal, A.K., Rodgers, D.W., Drottar, M., Ptashne, M. and Harrison, S.C. (1988) Recognition of a DNA operator by the repressor of phage 434: a view at high resolution. *Science*, **242**, 899-907.
- Agostini, I., Navarro, J.M., Bouhamdan, M., Willetts, K., Rey, F., Spire, B., Vigne, R., Pomerantz, R. and Sire, J. (1999) The HIV-1 Vpr co-activator induces a conformational change in TFIIB. *FEBS Lett*, **450**, 235-239.
- 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.
- Ahmad, K. and Henikoff, S. (2001) Centromeres are specialized replication domains in heterochromatin. *J Cell Biol*, **153**, 101-110.
- Ahmad, K. and Henikoff, S. (2002a) Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99 Suppl 4**, 16477-16484.
- Ahmad, K. and Henikoff, S. (2002b) The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell*, **9**, 1191-1200.
- Ahn, S.H., Cheung, W.L., Hsu, J.Y., Diaz, R.L., Smith, M.M. and Allis, C.D. (2005) Sterile 20 kinase phosphorylates histone H2B at serine 10 during hydrogen peroxide-induced apoptosis in *S. cerevisiae*. *Cell*, **120**, 25-36.
- Al-Harhi, L. and Roebuck, K.A. (1998) Human immunodeficiency virus type-1 transcription: role of the 5'-untranslated leader region (review). *Int J Mol Med*, **1**, 875-881.
- Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C.C., Feng, Y., Kennedy, P.E., Murphy, P.M. and Berger, E.A. (1996) CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*, **272**, 1955-1958.
- Allis, C.D., Berger, S.L., Cote, J., Dent, S., Jenuwien, T., Kouzarides, T., Pillus, L., Reinberg, D., Shi, Y., Shiekhata, R., Shilatifard, A., Workman, J. and Zhang, Y. (2007) New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell*, **131**, 633-636.
- Amara, A., Gall, S.L., Schwartz, O., Salamero, J., Montes, M., Loetscher, P., Baggiolini, M., Virelizier, J.L. and Arenzana-Seisdedos, F. (1997) HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J Exp Med*, **186**, 139-146.
- Amini, S., Saunders, M., Kelley, K., Khalili, K. and Sawaya, B.E. (2004) Interplay between HIV-1 Vpr and Sp1 modulates p21(WAF1) gene expression in human astrocytes. *J Biol Chem*, **279**, 46046-46056.

- Amyere, M., Mettlen, M., Van Der Smissen, P., Platek, A., Payraastre, B., Veithen, A. and Courtoy, P.J. (2002) Origin, originality, functions, subversions and molecular signalling of macropinocytosis. *Int J Med Microbiol*, **291**, 487-494.
- Andersen, J.L., DeHart, J.L., Zimmerman, E.S., Ardon, O., Kim, B., Jacquot, G., Benichou, S. and Planelles, V. (2006) HIV-1 Vpr-induced apoptosis is cell cycle dependent and requires Bax but not ANT. *PLoS Pathog*, **2**, e127.
- Anderson, J. and Akkina, R. (2005) CXCR4 and CCR5 shRNA transgenic CD34+ cell derived macrophages are functionally normal and resist HIV-1 infection. *Retrovirology*, **2**, 53.
- Aramori, I., Ferguson, S.S., Bieniasz, P.D., Zhang, J., Cullen, B. and Cullen, M.G. (1997) Molecular mechanism of desensitization of the chemokine receptor CCR-5: receptor signaling and internalization are dissociable from its role as an HIV-1 co-receptor. *Embo J*, **16**, 4606-4616.
- Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E. and Moudrianakis, E.N. (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10148-10152.
- Arhel, N., Genovesio, A., Kim, K.A., Miko, S., Perret, E., Olivo-Marin, J.C., Shorte, S. and Charneau, P. (2006a) Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes. *Nat Methods*, **3**, 817-824.
- Arhel, N., Munier, S., Souque, P., Mollier, K. and Charneau, P. (2006b) Nuclear import defect of human immunodeficiency virus type 1 DNA flap mutants is not dependent on the viral strain or target cell type. *J Virol*, **80**, 10262-10269.
- Arhel, N.J., Souquere-Besse, S. and Charneau, P. (2006c) Wild-type and central DNA flap defective HIV-1 lentiviral vector genomes: intracellular visualization at ultrastructural resolution levels. *Retrovirology*, **3**, 38.
- Arhel, N.J., Souquere-Besse, S., Munier, S., Souque, P., Guadagnini, S., Rutherford, S., Prevost, M.C., Allen, T.D. and Charneau, P. (2007) HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *Embo J*, **26**, 3025-3037.
- Arlen, P.A., Brooks, D.G., Gao, L.Y., Vatakis, D., Brown, H.J. and Zack, J.A. (2006) Rapid expression of human immunodeficiency virus following activation of latently infected cells. *J Virol*, **80**, 1599-1603.
- 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.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D. and Lake, R.J. (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, **284**, 770-776.
- Auphan, N., Didonato, J.A., Helmborg, A., Rosette, C. and Karin, M. (1997) Immunoregulatory genes and immunosuppression by glucocorticoids. *Arch Toxicol Suppl*, **19**, 87-95.
- 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.
- 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**, 555-563.
- Avvakumov, N. and Cote, J. (2007) The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer. *Oncogene*, **26**, 5395-5407.

Aweeka, F., Jayewardene, A., Staprans, S., Bellibas, S.E., Kearney, B., Lizak, P., Novakovic-Agopian, T. and Price, R.W. (1999) Failure to detect nelfinavir in the cerebrospinal fluid of HIV-1--infected patients with and without AIDS dementia complex. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, **20**, 39-43.

B

Backhed, F., Alsen, B., Roche, N., Angstrom, J., von Euler, A., Breimer, M.E., Westerlund-Wikstrom, B., Teneberg, S. and Richter-Dahlfors, A. (2002) Identification of target tissue glycosphingolipid receptors for uropathogenic, F1C-fimbriated *Escherichia coli* and its role in mucosal inflammation. *J Biol Chem*, **277**, 18198-18205.

Baeuerle, P.A. and Baltimore, D. (1988) I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science*, **242**, 540-546.

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**, 573-585.

Baggiolini, M., Dewald, B. and Moser, B. (1997) Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol*, **15**, 675-705.

Bailes, E., Gao, F., Bibollet-Ruche, F., Courgnaud, V., Peeters, M., Marx, P.A., Hahn, B.H. and Sharp, P.M. (2003) Hybrid origin of SIV in chimpanzees. *Science*, **300**, 1713.

Bakri, Y., Schiffer, C., Zennou, V., Charneau, P., Kahn, E., Benjouad, A., Gluckman, J.C. and Canque, B. (2001) The maturation of dendritic cells results in postintegration inhibition of HIV-1 replication. *J Immunol*, **166**, 3780-3788.

Balliet, J.W., Kolson, D.L., Eiger, G., Kim, F.M., McGann, K.A., Srinivasan, A. and Collman, R. (1994) Distinct effects in primary macrophages and lymphocytes of the human immunodeficiency virus type 1 accessory genes vpr, vpu, and nef: mutational analysis of a primary HIV-1 isolate. *Virology*, **200**, 623-631.

Banks, W.A., Freed, E.O., Wolf, K.M., Robinson, S.M., Franko, M. and Kumar, V.B. (2001) Transport of human immunodeficiency virus type 1 pseudoviruses across the blood-brain barrier: role of envelope proteins and adsorptive endocytosis. *J Virol*, **75**, 4681-4691.

Banks, W.A., Kastin, A.J. and Akerstrom, V. (1997) HIV-1 protein gp120 crosses the blood-brain barrier: role of adsorptive endocytosis. *Life Sci*, **61**, PL119-125.

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.

Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., 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**, 868-871.

Bartz, S.R., Rogel, M.E. and Emerman, M. (1996) Human immunodeficiency virus type 1 cell cycle control: Vpr is cytostatic and mediates G2 accumulation by a mechanism which differs from DNA damage checkpoint control. *J Virol*, **70**, 2324-2331.

Baylin, S.B. and Herman, J.G. (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet*, **16**, 168-174.

- Becker, P.B. and Horz, W. (2002) ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem*, **71**, 247-273.
- Beg, A.A. and Baltimore, D. (1996) An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*, **274**, 782-784.
- Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T. and Baltimore, D. (1995) Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. *Genes Dev*, **9**, 2736-2746.
- 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**, 24898-24905.
- Bennasser, Y. and Jeang, K.T. (2006) HIV-1 Tat interaction with Dicer: requirement for RNA. *Retrovirology*, **3**, 95.
- Bennasser, Y., Le, S.Y., Benkirane, M. and Jeang, K.T. (2005) Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity*, **22**, 607-619.
- Bennasser, Y., Le, S.Y., Yeung, M.L. and Jeang, K.T. (2004) HIV-1 encoded candidate micro-RNAs and their cellular targets. *Retrovirology*, **1**, 43.
- Bennasser, Y., Yeung, M.L. and Jeang, K.T. (2006) HIV-1 TAR RNA subverts RNA interference in transfected cells through sequestration of TAR RNA-binding protein, TRBP. *J Biol Chem*, **281**, 27674-27678.
- Berg, J.M. (1986) Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. *Science*, **232**, 485-487.
- Berg, J.M. (1990) Zinc fingers and other metal-binding domains. Elements for interactions between macromolecules. *J Biol Chem*, **265**, 6513-6516.
- Berger, S.L. (2007) The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*, **447**, 407-412.
- Berkhout, B., Silverman, R.H. and Jeang, K.T. (1989) Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell*, **59**, 273-282.
- Berns, K., Hijmans, E.M., Mullenders, J., Brummelkamp, T.R., Velds, A., Heimerikx, M., Kerkhoven, R.M., Madiredjo, M., Nijkamp, W., Weigelt, B., Agami, R., Ge, W., Cavet, G., Linsley, P.S., Beijersbergen, R.L. and Bernards, R. (2004) A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature*, **428**, 431-437.
- Bertos, N.R., Wang, A.H. and Yang, X.J. (2001) Class II histone deacetylases: structure, function, and regulation. *Biochem Cell Biol*, **79**, 243-252.
- Bestor, T.H. (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*, **9**, 2395-2402.
- Binette, J., Dube, M., Mercier, J., Halawani, D., Latterich, M. and Cohen, E.A. (2007) Requirements for the selective degradation of CD4 receptor molecules by the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein in the endoplasmic reticulum. *Retrovirology*, **4**, 75.
- Blank, T.A. and Becker, P.B. (1995) Electrostatic mechanism of nucleosome spacing. *J Mol Biol*, **252**, 305-313.
- Bolton, D.L. and Lenardo, M.J. (2007) Vpr cytopathicity independent of G2/M cell cycle arrest in human immunodeficiency virus type 1-infected CD4+ T cells. *J Virol*, **81**, 8878-8890.
- Bouhamdan, M., Benichou, S., Rey, F., Navarro, J.M., Agostini, I., Spire, B., Camonis, J., Slupphaug, G., Vigne, R., Benarous, R. and Sire, J. (1996) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein binds to the uracil DNA glycosylase DNA repair enzyme. *J Virol*, **70**, 697-704.

- Bour, S. and Strebel, K. (2003) The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes Infect*, **5**, 1029-1039.
- Bouzier-Sore, A.K., Merle, M., Magistretti, P.J. and Pellerin, L. (2002) Feeding active neurons: (re)emergence of a nursing role for astrocytes. *J Physiol Paris*, **96**, 273-282.
- Bowerman, B., Brown, P.O., Bishop, J.M. and Varmus, H.E. (1989) A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes Dev*, **3**, 469-478.
- Boyer, L.A., Latek, R.R. and Peterson, C.L. (2004) The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 158-163.
- Brackertz, M., Gong, Z., Leers, J. and Renkawitz, R. (2006) p66alpha and p66beta of the Mi-2/NuRD complex mediate MBD2 and histone interaction. *Nucleic Acids Res*, **34**, 397-406.
- Bres, V., Kiernan, R.E., Linares, L.K., Chable-Bessia, C., Plechakova, O., Tread, C., Emiliani, S., Peloponese, J.M., Jeang, K.T., Coux, O., Scheffner, M. and Benkirane, M. (2003) A non-proteolytic role for ubiquitin in Tat-mediated transactivation of the HIV-1 promoter. *Nat Cell Biol*, **5**, 754-761.
- Bres, V., Tagami, H., Peloponese, J.M., Loret, E., Jeang, K.T., Nakatani, Y., Emiliani, S., Benkirane, M. and Kiernan, R.E. (2002) Differential acetylation of Tat coordinates its interaction with the co-activators cyclin T1 and PCAF. *Embo J*, **21**, 6811-6819.
- Brew, B.J., Rosenblum, M., Cronin, K. and Price, R.W. (1995) AIDS dementia complex and HIV-1 brain infection: clinical-virological correlations. *Ann Neurol*, **38**, 563-570.
- Brooks, D.G., Arlen, P.A., Gao, L., Kitchen, C.M. and Zack, J.A. (2003) Identification of T cell-signaling pathways that stimulate latent HIV in primary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12955-12960.
- Brother, M.B., Chang, H.K., Lisziewicz, J., Su, D., Murty, L.C. and Ensoli, B. (1996) Block of Tat-mediated transactivation of tumor necrosis factor beta gene expression by polymeric-TAR decoys. *Virology*, **222**, 252-256.
- Brugger, B., Krautkramer, E., Tibroni, N., Munte, C.E., Rauch, S., Leibrecht, I., Glass, B., Breuer, S., Geyer, M., Krausslich, H.G., Kalbitzer, H.R., Wieland, F.T. and Fackler, O.T. (2007) Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein modulates the lipid composition of virions and host cell membrane microdomains. *Retrovirology*, **4**, 70.
- Bukrinskaya, A., Brichacek, B., Mann, A. and Stevenson, M. (1998) Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J Exp Med*, **188**, 2113-2125.
- Bukrinskaya, A.G. (2004) HIV-1 assembly and maturation. *Arch Virol*, **149**, 1067-1082.
- Bukrinsky, M. and Adzubei, A. (1999) Viral protein R of HIV-1. *Rev Med Virol*, **9**, 39-49.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, **282**, 1497-1501.
- Burniston, M.T., Cimarelli, A., Colgan, J., Curtis, S.P. and Luban, J. (1999) Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein multimerization requires the nucleocapsid domain and RNA and is promoted by the capsid-dimer interface and the basic region of matrix protein. *J Virol*, **73**, 8527-8540.
- Buscemi, L., Ramonet, D. and Geiger, J.D. (2007) Human immunodeficiency virus type-1 protein Tat induces tumor necrosis factor-alpha-mediated neurotoxicity. *Neurobiol Dis*, **26**, 661-670.
- Bushati, N. and Cohen, S.M. (2007) microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **23**, 175-205.

C

- Calnan, B., Tidor, B., Biancalana, S., Hudson, D. and Frankel, A. (1991) Arginine-mediated RNA recognition: the arginine fork. *Science*, **252**, 1167-1171.
- Campbell, S.M., Crowe, S.M. and Mak, J. (2001) Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *J Clin Virol*, **22**, 217-227.
- Canonne-Hergaux, F., Aunis, D. and Schaeffer, E. (1995) Interactions of the transcription factor AP-1 with the long terminal repeat of different human immunodeficiency virus type 1 strains in Jurkat, glial, and neuronal cells. *J Virol*, **69**, 6634-6642.
- Canto-Nogues, C., Sanchez-Ramon, S., Alvarez, S., Lacruz, C. and Munoz-Fernandez, M.A. (2005) HIV-1 infection of neurons might account for progressive HIV-1-associated encephalopathy in children. *J Mol Neurosci*, **27**, 79-89.
- Catani, M.V., Corasaniti, M.T., Navarra, M., Nistico, G., Finazzi-Agro, A. and Melino, G. (2000) gp120 induces cell death in human neuroblastoma cells through the CXCR4 and CCR5 chemokine receptors. *J Neurochem*, **74**, 2373-2379.
- Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., Bonner, W.M. and Nussenzweig, A. (2003) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol*, **5**, 675-679.
- Chadwick, B.P. and Willard, H.F. (2001) A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J Cell Biol*, **152**, 375-384.
- Chan, H.M. and La Thangue, N.B. (2001) p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci*, **114**, 2363-2373.
- Chang, F., Re, F., Sebastian, S., Sazer, S. and Luban, J. (2004) HIV-1 Vpr induces defects in mitosis, cytokinesis, nuclear structure, and centrosomes. *Mol Biol Cell*, **15**, 1793-1801.
- Chang, L.J., Chen, C.H., Urlacher, V. and Lee, T.Z. (2000) Differential apoptosis effects of primate lentiviral Vpr and Vpx in mammalian cells. *J Biomed Sci*, **7**, 322-333.
- Chang, T.C. and Mendell, J.T. (2007) microRNAs in vertebrate physiology and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, **8**, 215-239.
- Chehimi, J., Luo, Q., Azzoni, L., Shawver, L., Ngoubilly, N., June, R., Jerandi, G., Farabaugh, M. and Montaner, L.J. (2003) HIV-1 transmission and cytokine-induced expression of DC-SIGN in human monocyte-derived macrophages. *J Leukoc Biol*, **74**, 757-763.
- Chen, B., Vogan, E.M., Gong, H., Skehel, J.J., Wiley, D.C. and Harrison, S.C. (2005) Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature*, **433**, 834-841.
- Chen, C., Edelstein, L.C. and Gelinas, C. (2000) The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol*, **20**, 2687-2695.
- Chen, C.J., Chen, J.H., Chen, S.Y., Liao, S.L. and Raung, S.L. (2004a) Upregulation of RANTES gene expression in neuroglia by Japanese encephalitis virus infection. *J Virol*, **78**, 12107-12119.
- Chen, R., Le Rouzic, E., Kearney, J.A., Mansky, L.M. and Benichou, S. (2004b) 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**, 28419-28425.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K. and Shiekhattar, R. (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, **436**, 740-744.

- Cherepanov, P., Maertens, G., Proost, P., Devreese, B., Van Beeumen, J., Engelborghs, Y., De Clercq, E. and Debyser, Z. (2003) HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *J Biol Chem*, **278**, 372-381.
- Cheung, W.L., Ajiro, K., Samejima, K., Kloc, M., Cheung, P., Mizzen, C.A., Beeser, A., Etkin, L.D., Chernoff, J., Earnshaw, W.C. and Allis, C.D. (2003) Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase. *Cell*, **113**, 507-517.
- Chiu, Y.L., Soros, V.B., Kreisberg, J.F., Stopak, K., Yonemoto, W. and Greene, W.C. (2005) Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature*, **435**, 108-114.
- Choo, K.H. (2000) Centromerization. *Trends Cell Biol*, **10**, 182-188.
- Chowdhury, I.H., Wang, X.F., Landau, N.R., Robb, M.L., Polonis, V.R., Birx, D.L. and Kim, J.H. (2003) HIV-1 Vpr activates cell cycle inhibitor p21/Waf1/Cip1: a potential mechanism of G2/M cell cycle arrest. *Virology*, **305**, 371-377.
- Christensen, J., Agger, K., Cloos, P.A., Pasini, D., Rose, S., Sennels, L., Rappsilber, J., Hansen, K.H., Salcini, A.E. and Helin, K. (2007) RBP2 belongs to a family of demethylases, specific for tri- and dimethylated lysine 4 on histone 3. *Cell*, **128**, 1063-1076.
- Chun, T.W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., DiGiuseppe, J.A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T.C., Kuo, Y.H., Brookmeyer, R., Zeiger, M.A., Barditch-Crovo, P. and Siliciano, R.F. (1997a) Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature*, **387**, 183-188.
- Chun, T.W., Engel, D., Berrey, M.M., Shea, T., Corey, L. and Fauci, A.S. (1998) Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 8869-8873.
- Chun, T.W., Finzi, D., Margolick, J., Chadwick, K., Schwartz, D. and Siliciano, R.F. (1995) In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat Med*, **1**, 1284-1290.
- Chun, T.W., Stuyver, L., Mizell, S.B., Ehler, L.A., Mican, J.A., Baseler, M., Lloyd, A.L., Nowak, M.A. and Fauci, A.S. (1997b) Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13193-13197.
- 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**, 6753-6764.
- Cismasiu, V.B., Ghanta, S., Duque, J., Albu, D.I., Chen, H.M., Kasturi, R. and Avram, D. (2006) BCL11B participates in the activation of IL2 gene expression in CD4+ T lymphocytes. *Blood*, **108**, 2695-2702.
- Claassen, G.F. and Hann, S.R. (2000) A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9498-9503.
- Clark, E., Santiago, F., Deng, L., Chong, S., de La Fuente, C., Wang, L., Fu, P., Stein, D., Denny, T., Lanka, V., Mozafari, F., Okamoto, T. and Kashanchi, F. (2000) Loss of G(1)/S checkpoint in human immunodeficiency virus type 1-infected cells is associated with a lack of cyclin-dependent kinase inhibitor p21/Waf1. *J Virol*, **74**, 5040-5052.
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C. and et al. (1986) Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, **233**, 343-346.
- Clavel, F. and Hance, A.J. (2004) HIV drug resistance. *N Engl J Med*, **350**, 1023-1035.

- Clements, A., Poux, A.N., Lo, W.S., Pillus, L., Berger, S.L. and Marmorstein, R. (2003) Structural basis for histone and phosphohistone binding by the GCN5 histone acetyltransferase. *Mol Cell*, **12**, 461-473.
- Cloos, P.A., Christensen, J., Agger, K., Maiolica, A., Rappsilber, J., Antal, T., Hansen, K.H. and Helin, K. (2006) The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. *Nature*, **442**, 307-311.
- Codazzi, F., Menegon, A., Zacchetti, D., Ciardo, A., Grohovaz, F. and Meldolesi, J. (1995) HIV-1 gp120 glycoprotein induces $[Ca^{2+}]_i$ responses not only in type-2 but also type-1 astrocytes and oligodendrocytes of the rat cerebellum. *Eur J Neurosci*, **7**, 1333-1341.
- Cohen, E.A., Terwilliger, E.F., Sodroski, J.G. and Haseltine, W.A. (1988) Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1. *Nature*, **334**, 532-534.
- Cohen, J. (1996) AIDS research. Receptor mutations help slow disease progression. *Science*, **273**, 1797-1798.
- Cohen, J. (2007) AIDS research. Promising AIDS vaccine's failure leaves field reeling. *Science*, **318**, 28-29.
- Cohen, O.J. and Fauci, A.S. (2001) Current strategies in the treatment of HIV infection. *Adv Intern Med*, **46**, 207-246.
- 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**, 28179-28184.
- Conner, S.D. and Schmid, S.L. (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, **422**, 37-44.
- Connors, M., Kovacs, J.A., Krevat, S., Gea-Banacloche, J.C., Sneller, M.C., Flanigan, M., Metcalf, J.A., Walker, R.E., Falloon, J., Baseler, M., Feuerstein, I., Masur, H. and Lane, H.C. (1997) HIV infection induces changes in CD4+ T-cell phenotype and depletions within the CD4+ T-cell repertoire that are not immediately restored by antiviral or immune-based therapies. *Nat Med*, **3**, 533-540.
- Conti, L., Matarrese, P., Varano, B., Gauzzi, M.C., Sato, A., Malorni, W., Belardelli, F. and Gessani, S. (2000) Dual role of the HIV-1 vpr protein in the modulation of the apoptotic response of T cells. *J Immunol*, **165**, 3293-3300.
- Conti, L., Rainaldi, G., Matarrese, P., Varano, B., Rivabene, R., Columba, S., Sato, A., Belardelli, F., Malorni, W. and Gessani, S. (1998) The HIV-1 vpr protein acts as a negative regulator of apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line: possible implications for the pathogenesis of AIDS. *J Exp Med*, **187**, 403-413.
- Copeland, K.F. (2005) Modulation of HIV-1 transcription by cytokines and chemokines. *Mini Rev Med Chem*, **5**, 1093-1101.
- Costin, J.M. (2007) Cytopathic mechanisms of HIV-1. *Virol J*, **4**, 100.
- 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.
- Couraud, P.O. (1994) Interactions between lymphocytes, macrophages, and central nervous system cells. *J Leukoc Biol*, **56**, 407-415.
- Crowe, S., Zhu, T. and Muller, W.A. (2003) The contribution of monocyte infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection. *J Leukoc Biol*, **74**, 635-641.
- Cucciolla, V., Borriello, A., Criscuolo, M., Sinisi, A.A., Bencivenga, D., Tramontano, A., Scudieri, A.C., Oliva, A., Zappia, V. and Della Ragione, F. (2008) Histone deacetylase

inhibitors up-regulate p57Kip2 level by enhancing its expression through Sp1 transcription factor. *Carcinogenesis*.

- Cui, J., Tungaturthi, P.K., Ayyavoo, V., Ghafouri, M., Ariga, H., Khalili, K., Srinivasan, A., Amini, S. and Sawaya, B.E. (2006) The role of Vpr in the regulation of HIV-1 gene expression. *Cell Cycle*, **5**, 2626-2638.
- Cujec, T.P., Okamoto, H., Fujinaga, K., Meyer, J., Chamberlin, H., Morgan, D.O. and Peterlin, B.M. (1997) The HIV transactivator TAT binds to the CDK-activating kinase and activates the phosphorylation of the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev*, **11**, 2645-2657.
- Cullen, B.R. (2003) Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends Biochem Sci*, **28**, 419-424.
- Curtis, B.M., Scharnowske, S. and Watson, A.J. (1992) Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 8356-8360.
- Cuthbert, G.L., Daujat, S., Snowden, A.W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P.D., Tempst, P., Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (2004) Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell*, **118**, 545-553.

D

- Danner, S.A., Carr, A., Leonard, J.M., Lehman, L.M., Gudiol, F., Gonzales, J., Raventos, A., Rubio, R., Bouza, E., Pintado, V. and et al. (1995) A short-term study of the safety, pharmacokinetics, and efficacy of zidovudine, an inhibitor of HIV-1 protease. European-Australian Collaborative Zidovudine Study Group. *N Engl J Med*, **333**, 1528-1533.
- Daujat, S., Bauer, U.M., Shah, V., Turner, B., Berger, S. and Kouzarides, T. (2002) Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3. *Curr Biol*, **12**, 2090-2097.
- 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**, 1736-1739.
- Dawson, L. and Yu, X.F. (1998) The role of nucleocapsid of HIV-1 in virus assembly. *Virology*, **251**, 141-157.
- de la Serna, I.L., Ohkawa, Y. and Imbalzano, A.N. (2006) Chromatin remodelling in mammalian differentiation: lessons from ATP-dependent remodellers. *Nat Rev Genet*, **7**, 461-473.
- De Luca, P., Majello, B. and Lania, L. (1996) Sp3 represses transcription when tethered to promoter DNA or targeted to promoter proximal RNA. *J Biol Chem*, **271**, 8533-8536.
- de Napoles, M., Mermoud, J.E., Wakao, R., Tang, Y.A., Endoh, M., Appanah, R., Nesterova, T.B., Silva, J., Otte, A.P., Vidal, M., Koseki, H. and Brockdorff, N. (2004) Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell*, **7**, 663-676.
- de Noronha, C.M., Sherman, M.P., Lin, H.W., Cavrois, M.V., Moir, R.D., Goldman, R.D. and Greene, W.C. (2001) Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr. *Science*, **294**, 1105-1108.
- de Rocquigny, H., Petitjean, P., Tanchou, V., Decimo, D., Drouot, L., Delaunay, T., Darlix, J.L. and Roques, B.P. (1997) The zinc fingers of HIV nucleocapsid protein NCp7 direct interactions with the viral regulatory protein Vpr. *J Biol Chem*, **272**, 30753-30759.

- 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**, 737-749.
- De Silva, F.S., Venturini, D.S., Wagner, E., Shank, P.R. and Sharma, S. (2001) CD4-independent infection of human B cells with HIV type 1: detection of unintegrated viral DNA. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **17**, 1585-1598.
- de Witte, L., Nabatov, A. and Geijtenbeek, T.B. (2008) Distinct roles for DC-SIGN(+)-dendritic cells and Langerhans cells in HIV-1 transmission. *Trends Mol Med*, **14**, 12-19.
- Dehart, J.L. and Planelles, V. (2007) HIV-1 Vpr links proteasomal degradation and checkpoint activation. *J Virol*.
- Dehart, J.L. and Planelles, V. (2008) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr links proteasomal degradation and checkpoint activation. *J Virol*, **82**, 1066-1072.
- Deiva, K., Khiati, A., Hery, C., Salim, H., Leclerc, P., Horellou, P. and Tardieu, M. (2006) CCR5-, DC-SIGN-dependent endocytosis and delayed reverse transcription after human immunodeficiency virus type 1 infection in human astrocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **22**, 1152-1161.
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., Davis, C.B., Peiper, S.C., Schall, T.J., Littman, D.R. and Landau, N.R. (1996) Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*, **381**, 661-666.
- Denslow, S.A. and Wade, P.A. (2007) The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. *Oncogene*, **26**, 5433-5438.
- Deplus, R., Brenner, C., Burgers, W.A., Putmans, P., Kouzarides, T., de Launoit, Y. and Fuks, F. (2002) Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase. *Nucleic Acids Res*, **30**, 3831-3838.
- Deuring, R., Fanti, L., Armstrong, J.A., Sarte, M., Papoulas, O., Prestel, M., Daubresse, G., Verardo, M., Moseley, S.L., Berloco, M., Tsukiyama, T., Wu, C., Pimpinelli, S. and Tamkun, J.W. (2000) The ISWI chromatin-remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure in vivo. *Mol Cell*, **5**, 355-365.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K. and Zhou, M.M. (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, **399**, 491-496.
- Dickson, D.W. (1986) Multinucleated giant cells in acquired immunodeficiency syndrome encephalopathy. Origin from endogenous microglia? *Arch Pathol Lab Med*, **110**, 967-968.
- 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**, 6925-6929.
- Doehle, B.P., Schafer, A. and Cullen, B.R. (2005) Human APOBEC3B is a potent inhibitor of HIV-1 infectivity and is resistant to HIV-1 Vif. *Virology*, **339**, 281-288.
- 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**, 5504-5511.
- Dong, Y. and Benveniste, E.N. (2001) Immune function of astrocytes. *Glia*, **36**, 180-190.

- Dou, S., Zeng, X., Cortes, P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Honjo, T. and Vales, L.D. (1994) The recombination signal sequence-binding protein RBP-2N functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol*, **14**, 3310-3319.
- du Chene, I., Basyuk, E., Lin, Y.L., Triboulet, R., Knezevich, A., Chable-Bessia, C., Mettling, C., Baillat, V., Reynes, J., Corbeau, P., Bertrand, E., Marcello, A., Emiliani, S., Kiernan, R. and Benkirane, M. (2007) Suv39H1 and HP1gamma are responsible for chromatin-mediated HIV-1 transcriptional silencing and post-integration latency. *Embo J*, **26**, 424-435.
- Du, H., Roy, A.L. and Roeder, R.G. (1993) Human transcription factor USF stimulates transcription through the initiator elements of the HIV-1 and the Ad-ML promoters. *Embo J*, **12**, 501-511.
- Du, T. and Zamore, P.D. (2007) Beginning to understand microRNA function. *Cell Res*, **17**, 661-663.

E

- Eckstein, D.A., Sherman, M.P., Penn, M.L., Chin, P.S., De Noronha, C.M., Greene, W.C. and Goldsmith, M.A. (2001) HIV-1 Vpr enhances viral burden by facilitating infection of tissue macrophages but not nondividing CD4+ T cells. *J Exp Med*, **194**, 1407-1419.
- el Kharroubi, A. and Verdin, E. (1994) Protein-DNA interactions within DNase I-hypersensitive sites located downstream of the HIV-1 promoter. *J Biol Chem*, **269**, 19916-19924.
- El Messaoudi, S., Fabbrizio, E., Rodriguez, C., Chuchana, P., Fauquier, L., Cheng, D., Theillet, C., Vandell, L., Bedford, M.T. and Sardet, C. (2006) Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (CARM1) is a positive regulator of the Cyclin E1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 13351-13356.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
- Ellenberger, T.E., Brandl, C.J., Struhl, K. and Harrison, S.C. (1992) The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell*, **71**, 1223-1237.
- Engler, A., Stangler, T. and Willbold, D. (2002) Structure of human immunodeficiency virus type 1 Vpr(34-51) peptide in micelle containing aqueous solution. *Eur J Biochem*, **269**, 3264-3269.

F

- 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**, 483-492.
- Farnet, C.M. and Haseltine, W.A. (1990) Integration of human immunodeficiency virus type 1 DNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 4164-4168.
- Fassati, A. and Goff, S.P. (2001) Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, **75**, 3626-3635.
- Fassati, A., Gorlich, D., Harrison, I., Zaytseva, L. and Mingot, J.M. (2003) Nuclear import of HIV-1 intracellular reverse transcription complexes is mediated by importin 7. *Embo J*, **22**, 3675-3685.
- Fauci, A.S. and Lane, H.C. (1985) The acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): an update. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, **77**, 81-88.

- Faustino, R.S., Nelson, T.J., Terzic, A. and Perez-Terzic, C. (2007) Nuclear transport: target for therapy. *Clin Pharmacol Ther*, **81**, 880-886.
- Fazio, T.G. and Tsukiyama, T. (2003) Chromatin remodeling in vivo: evidence for a nucleosome sliding mechanism. *Mol Cell*, **12**, 1333-1340.
- 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**, 2752-2761.
- Feng, Q. and Zhang, Y. (2001) The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev*, **15**, 827-832.
- Feng, S. and Holland, E.C. (1988) HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar. *Nature*, **334**, 165-167.
- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E. and Berger, E.A. (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, **272**, 872-877.
- Fillingham, J., Keogh, M.C. and Krogan, N.J. (2006) GammaH2AX and its role in DNA double-strand break repair. *Biochem Cell Biol*, **84**, 568-577.
- Fingerman, I.M., Li, H.C. and Briggs, S.D. (2007) A charge-based interaction between histone H4 and Dot1 is required for H3K79 methylation and telomere silencing: identification of a new trans-histone pathway. *Genes Dev*, **21**, 2018-2029.
- 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**, 1295-1300.
- Fischer, U., Meyer, S., Teufel, M., Heckel, C., Luhrmann, R. and Rautmann, G. (1994) Evidence that HIV-1 Rev directly promotes the nuclear export of unspliced RNA. *Embo J*, **13**, 4105-4112.
- Fischle, W., Dequiedt, F., Fillion, M., Hendzel, M.J., Voelter, W. and Verdin, E. (2001) Human HDAC7 histone deacetylase activity is associated with HDAC3 in vivo. *J Biol Chem*, **276**, 35826-35835.
- Fischle, W., Dequiedt, F., Hendzel, M.J., Guenther, M.G., Lazar, M.A., Voelter, W. and Verdin, E. (2002) Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. *Mol Cell*, **9**, 45-57.
- 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*, **438**, 1116-1122.
- Flaus, A. and Owen-Hughes, T. (2004) Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling: farewell to the tuna-can octamer? *Curr Opin Genet Dev*, **14**, 165-173.
- Fong, Y.W. and Zhou, Q. (2000) Relief of two built-in autoinhibitory mechanisms in P-TEFb is required for assembly of a multicomponent transcription elongation complex at the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *Mol Cell Biol*, **20**, 5897-5907.
- Forget, D., Langelier, M.F., Therien, C., Trinh, V. and Coulombe, B. (2004) Photo-cross-linking of a purified preinitiation complex reveals central roles for the RNA polymerase II mobile clamp and TFIIE in initiation mechanisms. *Mol Cell Biol*, **24**, 1122-1131.
- Fortin, J.F., Cantin, R., Lamontagne, G. and Tremblay, M. (1997) Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *J Virol*, **71**, 3588-3596.

- Fouchier, R.A., Meyer, B.E., Simon, J.H., Fischer, U., Albright, A.V., Gonzalez-Scarano, F. and Malim, M.H. (1998) Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein with the nuclear pore complex. *J Virol*, **72**, 6004-6013.
- Franchini, G., Gurgo, C., Guo, H.G., Gallo, R.C., Collalti, E., Fargnoli, K.A., Hall, L.F., Wong-Staal, F. and Reitz, M.S., Jr. (1987) Sequence of simian immunodeficiency virus and its relationship to the human immunodeficiency viruses. *Nature*, **328**, 539-543.
- Frank, I., Piatak, M., Jr., Stoessel, H., Romani, N., Bonnyay, D., Lifson, J.D. and Pope, M. (2002) Infectious and whole inactivated simian immunodeficiency viruses interact similarly with primate dendritic cells (DCs): differential intracellular fate of virions in mature and immature DCs. *J Virol*, **76**, 2936-2951.
- Frankel, A.D. and Young, J.A. (1998) HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem*, **67**, 1-25.
- Frankel, D.H. (1996) Structure of HIV p24 capsid protein revealed. *Lancet*, **348**, 184.
- Freed, E.O. (2003) The HIV-TSG101 interface: recent advances in a budding field. *Trends Microbiol*, **11**, 56-59.
- Freud, A.G., Yokohama, A., Becknell, B., Lee, M.T., Mao, H.C., Ferketich, A.K. and Caligiuri, M.A. (2006) Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med*, **203**, 1033-1043.
- Fujinaga, K., Irwin, D., Huang, Y., Taube, R., Kurosu, T. and Peterlin, B.M. (2004) Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors from the transactivation response element. *Mol Cell Biol*, **24**, 787-795.
- Fujinaga, K., Zhong, Q., Nakaya, T., Kameoka, M., Meguro, T., Yamada, K. and Ikuta, K. (1995) Extracellular Nef protein regulates productive HIV-1 infection from latency. *J Immunol*, **155**, 5289-5298.
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M. and Nishida, E. (1997) CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature*, **390**, 308-311.
- Fukumori, T., Akari, H., Iida, S., Hata, S., Kagawa, S., Aida, Y., Koyama, A.H. and Adachi, A. (1998) The HIV-1 Vpr displays strong anti-apoptotic activity. *FEBS Lett*, **432**, 17-20.
- Furtado, M.R., Callaway, D.S., Phair, J.P., Kunstman, K.J., Stanton, J.L., Macken, C.A., Perelson, A.S. and Wolinsky, S.M. (1999) Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *N Engl J Med*, **340**, 1614-1622.

G

- Gallay, P., Hope, T., Chin, D. and Trono, D. (1997) HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9825-9830.
- Gallay, P., Stitt, V., Mundy, C., Oettinger, M. and Trono, D. (1996) Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J Virol*, **70**, 1027-1032.
- 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**, 865-867.

- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D.L., Chen, Y., Rodenburg, C.M., Michael, S.F., Cummins, L.B., Arthur, L.O., Peeters, M., Shaw, G.M., Sharp, P.M. and Hahn, B.H. (1999) Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature*, **397**, 436-441.
- Gao, L., Cueto, M.A., Asselbergs, F. and Atadja, P. (2002) Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem*, **277**, 25748-25755.
- Garcia-Martinez, L.F., Mavankal, G., Neveu, J.M., Lane, W.S., Ivanov, D. and Gaynor, R.B. (1997) Purification of a Tat-associated kinase reveals a TFIIH complex that modulates HIV-1 transcription. *Embo J*, **16**, 2836-2850.
- Garcia, F., Plana, M., Mestre, G., Arnedo, M., Gil, C., Miro, J.M., Cruceta, A., Pumarola, T., Gallart, T. and Gatell, J.M. (2002) Immunological and virological factors at baseline may predict response to structured therapy interruption in early stage chronic HIV-1 infection. *Aids*, **16**, 1761-1765.
- Garcia, J.V. and Miller, A.D. (1991) Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature*, **350**, 508-511.
- Gartel, A.L. and Radhakrishnan, S.K. (2005) Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res*, **65**, 3980-3985.
- Gartel, A.L. and Tyner, A.L. (1999) Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res*, **246**, 280-289.
- Gartel, A.L. and Tyner, A.L. (2002) The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther*, **1**, 639-649.
- Gartel, A.L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F. and Tyner, A.L. (2001) Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4510-4515.
- Gaynor, E.M. and Chen, I.S. (2001) Analysis of apoptosis induced by HIV-1 Vpr and examination of the possible role of the hHR23A protein. *Exp Cell Res*, **267**, 243-257.
- Geiman, T.M., Sankpal, U.T., Robertson, A.K., Chen, Y., Mazumdar, M., Heale, J.T., Schmiesing, J.A., Kim, W., Yokomori, K., Zhao, Y. and Robertson, K.D. (2004) Isolation and characterization of a novel DNA methyltransferase complex linking DNMT3B with components of the mitotic chromosome condensation machinery. *Nucleic Acids Res*, **32**, 2716-2729.
- Genin, M.J., Poel, T.J., Yagi, Y., Biles, C., Althaus, I., Keiser, B.J., Kopta, L.A., Friis, J.M., Reusser, F., Adams, W.J., Olmsted, R.A., Voorman, R.L., Thomas, R.C. and Romero, D.L. (1996) Synthesis and bioactivity of novel bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) reverse transcriptase inhibitors: structure-activity relationships and increased metabolic stability of novel substituted pyridine analogs. *J Med Chem*, **39**, 5267-5275.
- Gerritsen, M.E., Williams, A.J., Neish, A.S., Moore, S., Shi, Y. and Collins, T. (1997) CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2927-2932.
- Ghafouri, M., Amini, S., Khalili, K. and Sawaya, B.E. (2006) HIV-1 associated dementia: symptoms and causes. *Retrovirology*, **3**, 28.
- Gilboa, E., Mitra, S.W., Goff, S. and Baltimore, D. (1979) A detailed model of reverse transcription and tests of crucial aspects. *Cell*, **18**, 93-100.
- Giulian, D., Yu, J., Li, X., Tom, D., Li, J., Wendt, E., Lin, S.N., Schwarcz, R. and Noonan, C. (1996) Study of receptor-mediated neurotoxins released by HIV-1-infected mononuclear phagocytes found in human brain. *J Neurosci*, **16**, 3139-3153.

- Goff, A., Ehrlich, L.S., Cohen, S.N. and Carter, C.A. (2003) Tsg101 control of human immunodeficiency virus type 1 Gag trafficking and release. *J Virol*, **77**, 9173-9182.
- Goff, S.P. (2001) Intracellular trafficking of retroviral genomes during the early phase of infection: viral exploitation of cellular pathways. *J Gene Med*, **3**, 517-528.
- Goh, W.C., Manel, N. and Emerman, M. (2004) The human immunodeficiency virus Vpr protein binds Cdc25C: implications for G2 arrest. *Virology*, **318**, 337-349.
- Goh, W.C., Rogel, M.E., Kinsey, C.M., Michael, S.F., Fultz, P.N., Nowak, M.A., Hahn, B.H. and Emerman, M. (1998) HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat Med*, **4**, 65-71.
- Gonzalez-Scarano, F. and Martin-Garcia, J. (2005) The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol*, **5**, 69-81.
- Gorry, P.R., Ong, C., Thorpe, J., Bannwarth, S., Thompson, K.A., Gatignol, A., Vesseligh, S.L. and Purcell, D.F. (2003) Astrocyte infection by HIV-1: mechanisms of restricted virus replication, and role in the pathogenesis of HIV-1-associated dementia. *Curr HIV Res*, **1**, 463-473.
- Gottfredsson, M. and Bohjanen, P.R. (1997) Human immunodeficiency virus type I as a target for gene therapy. *Front Biosci*, **2**, d619-634.
- Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A. and Saxon, A. (1981) Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*, **305**, 1425-1431.
- Gould, S.J., Booth, A.M. and Hildreth, J.E. (2003) The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 10592-10597.
- Gowher, H., Liebert, K., Hermann, A., Xu, G. and Jeltsch, A. (2005) Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *J Biol Chem*, **280**, 13341-13348.
- Grabarczyk, P., Przybylski, G.K., Depke, M., Volker, U., Bahr, J., Assmus, K., Broker, B.M., Walther, R. and Schmidt, C.A. (2007) Inhibition of BCL11B expression leads to apoptosis of malignant but not normal mature T cells. *Oncogene*, **26**, 3797-3810.
- Granelli-Piperno, A., Delgado, E., Finkel, V., Paxton, W. and Steinman, R.M. (1998) Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J Virol*, **72**, 2733-2737.
- 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.
- Gregor, P.D., Sawadogo, M. and Roeder, R.G. (1990) The adenovirus major late transcription factor USF is a member of the helix-loop-helix group of regulatory proteins and binds to DNA as a dimer. *Genes Dev*, **4**, 1730-1740.
- Greiner, D., Bonaldi, T., Eskeland, R., Roemer, E. and Imhof, A. (2005) Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9. *Nat Chem Biol*, **1**, 143-145.
- Grewal, S.I. and Moazed, D. (2003) Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science*, **301**, 798-802.
- Grozinger, C.M. and Schreiber, S.L. (2002) Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem Biol*, **9**, 3-16.
- Gruenbaum, Y., Stein, R., Cedar, H. and Razin, A. (1981) Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA. *FEBS Lett*, **124**, 67-71.

- Grunstein, M. (1992) Histones as regulators of genes. *Sci Am*, **267**, 68-74B.
- Grunstein, M. (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, **389**, 349-352.
- 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**, 6091-6101.
- Gutierrez, J.L., Chandy, M., Carrozza, M.J. and Workman, J.L. (2007) Activation domains drive nucleosome eviction by SWI/SNF. *Embo J*, **26**, 730-740.
- Gutierrez, R.M. and Hnilica, L.S. (1967) Tissue specificity of histone phosphorylation. *Science*, **157**, 1324-1325.

H

- 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**, 359-368.
- Hagen, G., Muller, S., Beato, M. and Suske, G. (1994) Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *Embo J*, **13**, 3843-3851.
- Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R. and Hannon, G.J. (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, **293**, 1146-1150.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H. and Kim, V.N. (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*, **18**, 3016-3027.
- Han, Y., Wind-Rotolo, M., Yang, H.C., Siliciano, J.D. and Siliciano, R.F. (2007) Experimental approaches to the study of HIV-1 latency. *Nat Rev Microbiol*, **5**, 95-106.
- Harouse, J.M., Bhat, S., Spitalnik, S.L., Laughlin, M., Stefano, K., Silberberg, D.H. and Gonzalez-Scarano, F. (1991) Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science*, **253**, 320-323.
- Hassan, A.H., Awad, S., Al-Natour, Z., Othman, S., Mustafa, F. and Rizvi, T.A. (2007) Selective recognition of acetylated histones by bromodomains in transcriptional co-activators. *Biochem J*, **402**, 125-133.
- Hassig, C.A., Fleischer, T.C., Billin, A.N., Schreiber, S.L. and Ayer, D.E. (1997) Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. *Cell*, **89**, 341-347.
- Haughey, N.J. and Mattson, M.P. (2002) Calcium dysregulation and neuronal apoptosis by the HIV-1 proteins Tat and gp120. *J Acquir Immune Defic Syndr*, **31 Suppl 2**, S55-61.
- He, G. and Margolis, D.M. (2002) Counterregulation of chromatin deacetylation and histone deacetylase occupancy at the integrated promoter of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the HIV-1 repressor YY1 and HIV-1 activator Tat. *Mol Cell Biol*, **22**, 2965-2973.
- He, J., Chen, Y., Farzan, M., Choe, H., Ohagen, A., Gartner, S., Busciglio, J., Yang, X., Hofmann, W., Newman, W., Mackay, C.R., Sodroski, J. and Gabuzda, D. (1997) CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature*, **385**, 645-649.
- 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**, 6705-6711.

- Hebbes, T.R., Clayton, A.L., Thorne, A.W. and Crane-Robinson, C. (1994) Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken beta-globin chromosomal domain. *Embo J*, **13**, 1823-1830.
- Heeney, J.L., Dalglish, A.G. and Weiss, R.A. (2006) Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS. *Science*, **313**, 462-466.
- Heinzinger, N.K., Bukinsky, M.I., Haggerty, S.A., Ragland, A.M., Kewalramani, V., Lee, M.A., Gendelman, H.E., Ratner, L., Stevenson, M. and Emerman, M. (1994) The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 7311-7315.
- 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**, 389-397.
- Henderson, L.E., Sowder, R.C., Copeland, T.D., Oroszlan, S. and Benveniste, R.E. (1990) Gag precursors of HIV and SIV are cleaved into six proteins found in the mature virions. *J Med Primatol*, **19**, 411-419.
- Hendrich, B. and Bird, A. (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol*, **18**, 6538-6547.
- Henikoff, S., Furuyama, T. and Ahmad, K. (2004) Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends Genet*, **20**, 320-326.
- Henriet, S., Sinck, L., Bec, G., Gorelick, R.J., Marquet, R. and Paillart, J.C. (2007) Vif is a RNA chaperone that could temporally regulate RNA dimerization and the early steps of HIV-1 reverse transcription. *Nucleic Acids Res*, **35**, 5141-5153.
- Hermann, A., Gowher, H. and Jeltsch, A. (2004a) Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 2571-2587.
- Hermann, A., Goyal, R. and Jeltsch, A. (2004b) The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J Biol Chem*, **279**, 48350-48359.
- Hoglund, S., Ohagen, A., Lawrence, K. and Gabuzda, D. (1994) Role of vif during packing of the core of HIV-1. *Virology*, **201**, 349-355.
- Hong, H., Kao, C., Jeng, M.H., Eble, J.N., Koch, M.O., Gardner, T.A., Zhang, S., Li, L., Pan, C.X., Hu, Z., MacLennan, G.T. and Cheng, L. (2004) Aberrant expression of CARM1, a transcriptional coactivator of androgen receptor, in the development of prostate carcinoma and androgen-independent status. *Cancer*, **101**, 83-89.
- Hong, P.W., Flummerfelt, K.B., de Parseval, A., Gurney, K., Elder, J.H. and Lee, B. (2002) Human immunodeficiency virus envelope (gp120) binding to DC-SIGN and primary dendritic cells is carbohydrate dependent but does not involve 2G12 or cyanovirin binding sites: implications for structural analyses of gp120-DC-SIGN binding. *J Virol*, **76**, 12855-12865.
- Hope, T.J. (1999) The ins and outs of HIV Rev. *Arch Biochem Biophys*, **365**, 186-191.
- Hrecka, K., Gierszewska, M., Srivastava, S., Kozackiewicz, L., Swanson, S.K., Florens, L., Washburn, M.P. and Skowronski, J. (2007) Lentiviral Vpr usurps Cul4-DDB1[VprBP] E3 ubiquitin ligase to modulate cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 11778-11783.
- Hrimech, M., Yao, X.J., Branton, P.E. and Cohen, E.A. (2000) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr-mediated G(2) cell cycle arrest: Vpr interferes with cell cycle signaling cascades by interacting with the B subunit of serine/threonine protein phosphatase 2A. *Embo J*, **19**, 3956-3967.

- 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**, 4043-4052.
- Hsia, S.C., Wang, H. and Shi, Y.B. (2001) Involvement of chromatin and histone acetylation in the regulation of HIV-LTR by thyroid hormone receptor. *Cell Res*, **11**, 8-16.
- Hu, E., Chen, Z., Fredrickson, T., Zhu, Y., Kirkpatrick, R., Zhang, G.F., Johanson, K., Sung, C.M., Liu, R. and Winkler, J. (2000) Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor. *J Biol Chem*, **275**, 15254-15264.
- Huang, J., Wang, F., Argyris, E., Chen, K., Liang, Z., Tian, H., Huang, W., Squires, K., Verlinghieri, G. and Zhang, H. (2007) Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat Med*, **13**, 1241-1247.
- Huang, N.E., Lin, C.H., Lin, Y.S. and Yu, W.C. (2003) Modulation of YY1 activity by SAP30. *Biochem Biophys Res Commun*, **306**, 267-275.
- Huard, S., Elder, R.T., Liang, D., Li, G. and Zhao, R.Y. (2007) HIV-1 Vpr induces cell cycle G2 arrest through Srk1/MK2-mediated phosphorylation of Cdc25. *J Virol*.
- 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**, 455-458.
- Humphrey, G.W., Wang, Y., Russanova, V.R., Hirai, T., Qin, J., Nakatani, Y. and Howard, B.H. (2001) Stable histone deacetylase complexes distinguished by the presence of SANT domain proteins CoREST/kiaa0071 and Mta-L1. *J Biol Chem*, **276**, 6817-6824.
- Hurlstone, A. and Clevers, H. (2002) T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *Embo J*, **21**, 2303-2311.
- Hussain, A., Wesley, C., Khalid, M., Chaudhry, A. and Jameel, S. (2008) Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein interacts with CD74 and modulates major histocompatibility complex class II presentation. *J Virol*, **82**, 893-902.

I

- Iizuka, M., Matsui, T., Takisawa, H. and Smith, M.M. (2006) Regulation of replication licensing by acetyltransferase Hbo1. *Mol Cell Biol*, **26**, 1098-1108.
- Isel, C. and Karn, J. (1999) Direct evidence that HIV-1 Tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation. *J Mol Biol*, **290**, 929-941.
- Isel, C., Marquet, R., Keith, G., Ehresmann, C. and Ehresmann, B. (1993) Modified nucleotides of tRNA(3Lys) modulate primer/template loop-loop interaction in the initiation complex of HIV-1 reverse transcription. *J Biol Chem*, **268**, 25269-25272.
- Isham, C.R., Tibodeau, J.D., Jin, W., Xu, R., Timm, M.M. and Bible, K.C. (2007) Chaetocin: a promising new antimyeloma agent with in vitro and in vivo activity mediated via imposition of oxidative stress. *Blood*, **109**, 2579-2588.
- Ishizuka, T., Satoh, T., Monden, T., Shibusawa, N., Hashida, T., Yamada, M. and Mori, M. (2001) Human immunodeficiency virus type 1 Tat binding protein-1 is a transcriptional coactivator specific for TR. *Mol Endocrinol*, **15**, 1329-1343.
- Iwase, S., Lan, F., Bayliss, P., de la Torre-Ubieta, L., Huarte, M., Qi, H.H., Whetstone, J.R., Bonni, A., Roberts, T.M. and Shi, Y. (2007) The X-linked mental retardation gene

SMCX/JARID1C defines a family of histone H3 lysine 4 demethylases. *Cell*, **128**, 1077-1088.

J

- Jackson, R.J. and Standart, N. (2007) How do microRNAs regulate gene expression? *Sci STKE*, **2007**, re1.
- Jacotot, E., Ravagnan, L., Loeffler, M., Ferri, K.F., Vieira, H.L., Zamzami, N., Costantini, P., Druillennec, S., Hoebeke, J., Briand, J.P., Irinopoulou, T., Daugas, E., Susin, S.A., Cointe, D., Xie, Z.H., Reed, J.C., Roques, B.P. and Kroemer, G. (2000) The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J Exp Med*, **191**, 33-46.
- Jamieson, D.J., Read, J.S., Kourtis, A.P., Durant, T.M., Lampe, M.A. and Dominguez, K.L. (2007) Cesarean delivery for HIV-infected women: recommendations and controversies. *Am J Obstet Gynecol*, **197**, S96-100.
- 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.
- Janssen, R.S., Nwanyanwu, O.C., Selik, R.M. and Stehr-Green, J.K. (1992) Epidemiology of human immunodeficiency virus encephalopathy in the United States. *Neurology*, **42**, 1472-1476.
- Javanbakht, H., Halwani, R., Cen, S., Saadatmand, J., Musier-Forsyth, K., Gottlinger, H. and Kleiman, L. (2003) The interaction between HIV-1 Gag and human lysyl-tRNA synthetase during viral assembly. *J Biol Chem*, **278**, 27644-27651.
- Jayadev, S., Yun, B., Nguyen, H., Yokoo, H., Morrison, R.S. and Garden, G.A. (2007) The glial response to CNS HIV infection includes p53 activation and increased expression of p53 target genes. *J Neuroimmune Pharmacol*, **2**, 359-370.
- Jazirehi, A.R., Huerta-Yepez, S., Cheng, G. and Bonavida, B. (2005) Rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) inhibits the constitutive nuclear factor- κ B signaling pathway in non-Hodgkin's lymphoma B-cell lines: role in sensitization to chemotherapeutic drug-induced apoptosis. *Cancer Res*, **65**, 264-276.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074-1080.
- Jiang, G., Espeseth, A., Hazuda, D.J. and Margolis, D.M. (2007) c-Myc and Sp1 contribute to proviral latency by recruiting histone deacetylase 1 to the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *J Virol*, **81**, 10914-10923.
- Jiang, M., Mak, J., Ladha, A., Cohen, E., Klein, M., Rovinski, B. and Kleiman, L. (1993) Identification of tRNAs incorporated into wild-type and mutant human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, **67**, 3246-3253.
- Jiang, Z.G., Piggee, C., Heyes, M.P., Murphy, C., Quearry, B., Bauer, M., Zheng, J., Gendelman, H.E. and Markey, S.P. (2001) Glutamate is a mediator of neurotoxicity in secretions of activated HIV-1-infected macrophages. *J Neuroimmunol*, **117**, 97-107.
- Johannessen, M., Delghandi, M.P. and Moens, U. (2004a) What turns CREB on? *Cell Signal*, **16**, 1211-1227.
- Johannessen, M., Delghandi, M.P., Seternes, O.M., Johansen, B. and Moens, U. (2004b) Synergistic activation of CREB-mediated transcription by forskolin and phorbol ester requires PKC and depends on the glutamine-rich Q2 transactivation domain. *Cell Signal*, **16**, 1187-1199.

- John-Stewart, G., Mbori-Ngacha, D., Ekpini, R., Janoff, E.N., Nkengasong, J., Read, J.S., Van de Perre, P. and Newell, M.L. (2004) Breast-feeding and Transmission of HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr*, **35**, 196-202.
- Jones, G.J., Barsby, N.L., Cohen, E.A., Holden, J., Harris, K., Dickie, P., Jhamandas, J. and Power, C. (2007) HIV-1 Vpr causes neuronal apoptosis and in vivo neurodegeneration. *J Neurosci*, **27**, 3703-3711.
- Jones, K.A. (1997) Taking a new TAK on tat transactivation. *Genes Dev*, **11**, 2593-2599.
- Jones, K.A. and Peterlin, B.M. (1994) Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu Rev Biochem*, **63**, 717-743.
- Jones, N. (1990) Transcriptional regulation by dimerization: two sides to an incestuous relationship. *Cell*, **61**, 9-11.
- Jones, P.A. and Takai, D. (2001) The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, **293**, 1068-1070.
- Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J. and Wolffe, A.P. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*, **19**, 187-191.
- Jonsson, Z.O., Jha, S., Wohlschlegel, J.A. and Dutta, A. (2004) Rvb1p/Rvb2p recruit Arp5p and assemble a functional Ino80 chromatin remodeling complex. *Mol Cell*, **16**, 465-477.
- 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.
- Jost, J.P., Fremont, M., Siegmann, M. and Hofsteenge, J. (1997) The RNA moiety of chick embryo 5-methylcytosine- DNA glycosylase targets DNA demethylation. *Nucleic Acids Res*, **25**, 4545-4550.
- Jost, J.P., Siegmann, M., Sun, L. and Leung, R. (1995) Mechanisms of DNA demethylation in chicken embryos. Purification and properties of a 5-methylcytosine-DNA glycosylase. *J Biol Chem*, **270**, 9734-9739.

K

- Kaehleke, K., Dorr, A., Hetzer-Egger, C., Kiermer, V., Henklein, P., Schnoelzer, M., Loret, E., Cole, P.A., Verdin, E. and Ott, M. (2003) Acetylation of Tat defines a cyclinT1-independent step in HIV transactivation. *Mol Cell*, **12**, 167-176.
- Kahn, J.O. and Walker, B.D. (1998) Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*, **339**, 33-39.
- Kamimura, K., Mishima, Y., Obata, M., Endo, T., Aoyagi, Y. and Kominami, R. (2007a) Lack of Bcl11b tumor suppressor results in vulnerability to DNA replication stress and damages. *Oncogene*, **26**, 5840-5850.
- Kamimura, K., Ohi, H., Kubota, T., Okazuka, K., Yoshikai, Y., Wakabayashi, Y., Aoyagi, Y., Mishima, Y. and Kominami, R. (2007b) Haploinsufficiency of Bcl11b for suppression of lymphomagenesis and thymocyte development. *Biochem Biophys Res Commun*, **355**, 538-542.
- Kaminska, M., Francin, M., Shalak, V. and Mirande, M. (2007) Role of HIV-1 Vpr-induced apoptosis on the release of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase. *FEBS Lett*, **581**, 3105-3110.

- Kao, H.Y., Downes, M., Ordentlich, P. and Evans, R.M. (2000) Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression. *Genes Dev*, **14**, 55-66.
- 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**, 11398-11407.
- Kao, S.Y., Calman, A.F., Luciw, P.A. and Peterlin, B.M. (1987) Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature*, **330**, 489-493.
- Kaplan, A.H., Manchester, M. and Swanstrom, R. (1994) The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. *J Virol*, **68**, 6782-6786.
- Karni, O., Friedler, A., Zakai, N., Gilon, C. and Loyter, A. (1998) A peptide derived from the N-terminal region of HIV-1 Vpr promotes nuclear import in permeabilized cells: elucidation of the NLS region of the Vpr. *FEBS Lett*, **429**, 421-425.
- Kaul, M., Garden, G.A. and Lipton, S.A. (2001) Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature*, **410**, 988-994.
- Kawamura, T., Gulden, F.O., Sugaya, M., McNamara, D.T., Borris, D.L., Lederman, M.M., Orenstein, J.M., Zimmerman, P.A. and Blauvelt, A. (2003) R5 HIV productively infects Langerhans cells, and infection levels are regulated by compound CCR5 polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8401-8406.
- Kedzierska, K., Azzam, R., Ellery, P., Mak, J., Jaworowski, A. and Crowe, S.M. (2003) Defective phagocytosis by human monocyte/macrophages following HIV-1 infection: underlying mechanisms and modulation by adjunctive cytokine therapy. *J Clin Virol*, **26**, 247-263.
- Keswani, S.C., Polley, M., Pardo, C.A., Griffin, J.W., McArthur, J.C. and Hoke, A. (2003) Schwann cell chemokine receptors mediate HIV-1 gp120 toxicity to sensory neurons. *Ann Neurol*, **54**, 287-296.
- Khan, A.U. and Hampsey, M. (2002) Connecting the DOTs: covalent histone modifications and the formation of silent chromatin. *Trends Genet*, **18**, 387-389.
- 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**, 6106-6118.
- Kim, C.H., Heath, C., Bertuch, A. and Hansen, U. (1987) Specific stimulation of simian virus 40 late transcription in vitro by a cellular factor binding the simian virus 40 21-base-pair repeat promoter element. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 6025-6029.
- Kim, R.B., Fromm, M.F., Wandel, C., Leake, B., Wood, A.J., Roden, D.M. and Wilkinson, G.R. (1998) The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. *J Clin Invest*, **101**, 289-294.
- Kim, Y.K., Bourgeois, C.F., Pearson, R., Tyagi, M., West, M.J., Wong, J., Wu, S.Y., Chiang, C.M. and Karn, J. (2006) Recruitment of TFIIH to the HIV LTR is a rate-limiting step in the emergence of HIV from latency. *Embo J*, **25**, 3596-3604.
- Kino, T., Gragerov, A., Slobodskaya, O., Tsopanomichalou, M., Chrousos, G.P. and Pavlakis, G.N. (2002) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) accessory protein Vpr induces transcription of the HIV-1 and glucocorticoid-responsive promoters by binding directly to p300/CBP coactivators. *J Virol*, **76**, 9724-9734.

- Kino, T., Gragerov, A., Valentin, A., Tsopanomialou, M., Ilyina-Gragerova, G., Erwin-Cohen, R., Chrousos, G.P. and Pavlakis, G.N. (2005) Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 binds to 14-3-3 proteins and facilitates complex formation with Cdc25C: implications for cell cycle arrest. *J Virol*, **79**, 2780-2787.
- Kino, T. and Pavlakis, G.N. (2004) Partner molecules of accessory protein Vpr of the human immunodeficiency virus type 1. *DNA Cell Biol*, **23**, 193-205.
- Kinoshita, S., Chen, B.K., Kaneshima, H. and Nolan, G.P. (1998) Host control of HIV-1 parasitism in T cells by the nuclear factor of activated T cells. *Cell*, **95**, 595-604.
- Kitayama, H., Miura, Y., Ando, Y., Hoshino, S., Ishizaka, Y. and Koyanagi, Y. (2008) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr inhibits axonal outgrowth through induction of mitochondrial dysfunction. *J Virol*, **82**, 2528-2542.
- Kloosterman, W.P. and Plasterk, R.H. (2006) The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell*, **11**, 441-450.
- Klug, A. and Rhodes, D. (1987) Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **52**, 473-482.
- Koenig, S., Gendelman, H.E., Orenstein, J.M., Dal Canto, M.C., Pezeshkpour, G.H., Yungbluth, M., Janotta, F., Aksamit, A., Martin, M.A. and Fauci, A.S. (1986) Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science*, **233**, 1089-1093.
- Konig, P. and Richmond, T.J. (1993) The X-ray structure of the GCN4-bZIP bound to ATF/CREB site DNA shows the complex depends on DNA flexibility. *J Mol Biol*, **233**, 139-154.
- Korber, P., Barbaric, S., Luckenbach, T., Schmid, A., Schermer, U.J., Blaschke, D. and Horz, W. (2006) The histone chaperone Asf1 increases the rate of histone eviction at the yeast PHO5 and PHO8 promoters. *J Biol Chem*, **281**, 5539-5545.
- Koup, R.A., Safrit, J.T., Cao, Y., Andrews, C.A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C. and Ho, D.D. (1994) Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol*, **68**, 4650-4655.
- Kouzarides, T. (2002) Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 198-209.
- Kramer, B., Pelchen-Matthews, A., Deneka, M., Garcia, E., Piguet, V. and Marsh, M. (2005) HIV interaction with endosomes in macrophages and dendritic cells. *Blood Cells Mol Dis*, **35**, 136-142.
- Krogan, N.J., Kim, M., Ahn, S.H., Zhong, G., Kobor, M.S., Cagney, G., Emili, A., Shilatifard, A., Buratowski, S. and Greenblatt, J.F. (2002) RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach. *Mol Cell Biol*, **22**, 6979-6992.
- Kuo, M.H. and Allis, C.D. (1998) Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays*, **20**, 615-626.
- Kuo, M.H., Brownell, J.E., Sobel, R.E., Ranalli, T.A., Cook, R.G., Edmondson, D.G., Roth, S.Y. and Allis, C.D. (1996) Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature*, **383**, 269-272.

L

- 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.

- Ladurner, A.G. (2003) Inactivating chromosomes: a macro domain that minimizes transcription. *Mol Cell*, **12**, 1-3.
- Lagger, G., Doetzlhofer, A., Schuettengruber, B., Haidweger, E., Simboeck, E., Tischler, J., Chiocca, S., Suske, G., Rotheneder, H., Wintersberger, E. and Seiser, C. (2003) The tumor suppressor p53 and histone deacetylase 1 are antagonistic regulators of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21/WAF1/CIP1 gene. *Mol Cell Biol*, **23**, 2669-2679.
- Lagger, G., O'Carroll, D., Rembold, M., Khier, H., Tischler, J., Weitzer, G., Schuettengruber, B., Hauser, C., Brunmeir, R., Jenuwein, T. and Seiser, C. (2002) Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *Embo J*, **21**, 2672-2681.
- Lai, M., Zimmerman, E.S., Planelles, V. and Chen, J. (2005) Activation of the ATR pathway by human immunodeficiency virus type 1 Vpr involves its direct binding to chromatin in vivo. *J Virol*, **79**, 15443-15451.
- Lambotte, O., Boufassa, F., Madec, Y., Nguyen, A., Goujard, C., Meyer, L., Rouzioux, C., Venet, A. and Delfraissy, J.F. (2005) HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin Infect Dis*, **41**, 1053-1056.
- Lambotte, O. and Delfraissy, J.F. (2006) [HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1 infected patients with a spontaneous control of viral replication]. *Pathol Biol (Paris)*, **54**, 566-571.
- Langelier, C., von Schwedler, U.K., Fisher, R.D., De Domenico, I., White, P.L., Hill, C.P., Kaplan, J., Ward, D. and Sundquist, W.I. (2006) Human ESCRT-II complex and its role in human immunodeficiency virus type 1 release. *J Virol*, **80**, 9465-9480.
- Langford, T.D., Letendre, S.L., Larrea, G.J. and Masliah, E. (2003) Changing patterns in the neuropathogenesis of HIV during the HAART era. *Brain Pathol*, **13**, 195-210.
- Larkin, M., Childs, R.A., Matthews, T.J., Thiel, S., Mizuochi, T., Lawson, A.M., Savill, J.S., Haslett, C., Diaz, R. and Feizi, T. (1989) Oligosaccharide-mediated interactions of the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 that are independent of CD4 recognition. *Aids*, **3**, 793-798.
- Lasky, L.A., Nakamura, G., Smith, D.H., Fennie, C., Shimasaki, C., Patzer, E., Berman, P., Gregory, T. and Capon, D.J. (1987) Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell*, **50**, 975-985.
- Lassen, K.G., Ramyar, K.X., Bailey, J.R., Zhou, Y. and Siliciano, R.F. (2006) Nuclear retention of multiply spliced HIV-1 RNA in resting CD4+ T cells. *PLoS Pathog*, **2**, e68.
- Lavi, E., Kolson, D.L., Ulrich, A.M., Fu, L. and Gonzalez-Scarano, F. (1998) Chemokine receptors in the human brain and their relationship to HIV infection. *J Neurovirol*, **4**, 301-311.
- Le Rouzic, E., Belaidouni, N., Estrabaud, E., Morel, M., Rain, J.C., Transy, C. and Margottin-Goguet, F. (2007) HIV1 Vpr arrests the cell cycle by recruiting DCAF1/VprBP, a receptor of the Cul4-DDB1 ubiquitin ligase. *Cell Cycle*, **6**, 182-188.
- Le Rouzic, E. and Benichou, S. (2005) The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology*, **2**, 11.
- Le Rouzic, E., Mousnier, A., Rustum, C., Stutz, F., Hallberg, E., Dargemont, C. and Benichou, S. (2002) Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1. *J Biol Chem*, **277**, 45091-45098.

- Lecellier, C.H., Dunoyer, P., Arar, K., Lehmann-Che, J., Eyquem, S., Himber, C., Saib, A. and Voinnet, O. (2005) A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science*, **308**, 557-560.
- Lee, H., Rezai-Zadeh, N. and Seto, E. (2004) Negative regulation of histone deacetylase 8 activity by cyclic AMP-dependent protein kinase A. *Mol Cell Biol*, **24**, 765-773.
- Lee, M.G., Wynder, C., Cooch, N. and Shiekhattar, R. (2005) An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature*, **437**, 432-435.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S. and Kim, V.N. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, **425**, 415-419.
- Lee, Y., Hur, I., Park, S.Y., Kim, Y.K., Suh, M.R. and Kim, V.N. (2006) The role of PACT in the RNA silencing pathway. *Embo J*, **25**, 522-532.
- Lee, Y.H., Koh, S.S., Zhang, X., Cheng, X. and Stallcup, M.R. (2002) Synergy among nuclear receptor coactivators: selective requirement for protein methyltransferase and acetyltransferase activities. *Mol Cell Biol*, **22**, 3621-3632.
- 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**, 549-555.
- Lei, J., Wu, C., Wang, X. and Wang, H. (2005) p38 MAPK-dependent and YY1-mediated chemokine receptors CCR5 and CXCR4 up-regulation in U937 cell line infected by Mycobacterium tuberculosis or Actinobacillus actinomycetemcomitans. *Biochem Biophys Res Commun*, **329**, 610-615.
- 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.
- Leone, C., Le Pavec, G., Meme, W., Porcheray, F., Samah, B., Dormont, D. and Gras, G. (2006) Characterization of human monocyte-derived microglia-like cells. *Glia*, **54**, 183-192.
- Levy, D.N., Refaeli, Y., MacGregor, R.R. and Weiner, D.B. (1994) Serum Vpr regulates productive infection and latency of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 10873-10877.
- Levy, D.N., Refaeli, Y. and Weiner, D.B. (1995) Extracellular Vpr protein increases cellular permissiveness to human immunodeficiency virus replication and reactivates virus from latency. *J Virol*, **69**, 1243-1252.
- Lewis, P., Hensel, M. and Emerman, M. (1992) Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *Embo J*, **11**, 3053-3058.
- Li, G., Elder, R.T., Qin, K., Park, H.U., Liang, D. and Zhao, R.Y. (2007a) Phosphatase type 2A-dependent and -independent pathways for ATR phosphorylation of Chk1. *J Biol Chem*, **282**, 7287-7298.
- Li, J., Lin, Q., Wang, W., Wade, P. and Wong, J. (2002a) Specific targeting and constitutive association of histone deacetylase complexes during transcriptional repression. *Genes Dev*, **16**, 687-692.
- Li, J., Liu, Y., Kim, B.O. and He, J.J. (2002b) Direct participation of Sam68, the 68-kilodalton Src-associated protein in mitosis, in the CRM1-mediated Rev nuclear export pathway. *J Virol*, **76**, 8374-8382.

- Li, J., Liu, Y., Park, I.W. and He, J.J. (2002c) Expression of exogenous Sam68, the 68-kilodalton SRC-associated protein in mitosis, is able to alleviate impaired Rev function in astrocytes. *J Virol*, **76**, 4526-4535.
- Li, J.M., Datto, M.B., Shen, X., Hu, P.P., Yu, Y. and Wang, X.F. (1998) Sp1, but not Sp3, functions to mediate promoter activation by TGF-beta through canonical Sp1 binding sites. *Nucleic Acids Res*, **26**, 2449-2456.
- Li, L., He, S., Sun, J.M. and Davie, J.R. (2004) Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem Cell Biol*, **82**, 460-471.
- Li, M.J., Kim, J., Li, S., Zaia, J., Yee, J.K., Anderson, J., Akkina, R. and Rossi, J.J. (2005a) Long-term inhibition of HIV-1 infection in primary hematopoietic cells by lentiviral vector delivery of a triple combination of anti-HIV shRNA, anti-CCR5 ribozyme, and a nucleolar-localizing TAR decoy. *Mol Ther*, **12**, 900-909.
- Li, Q., Price, J.P., Byers, S.A., Cheng, D., Peng, J. and Price, D.H. (2005b) Analysis of the large inactive P-TEFb complex indicates that it contains one 7SK molecule, a dimer of HEXIM1 or HEXIM2, and two P-TEFb molecules containing Cdk9 phosphorylated at threonine 186. *J Biol Chem*, **280**, 28819-28826.
- Li, Z.Y., Yang, J., Gao, X., Lu, J.Y., Zhang, Y., Wang, K., Cheng, M.B., Wu, N.H., Zhang, Y., Wu, Z. and Shen, Y.F. (2007b) Sequential recruitment of PCAF and BRG1 contributes to myogenin activation in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced early differentiation of rhabdomyosarcoma-derived cells. *J Biol Chem*, **282**, 18872-18878.
- Lieberman, J., Song, E., Lee, S.K. and Shankar, P. (2003) Interfering with disease: opportunities and roadblocks to harnessing RNA interference. *Trends Mol Med*, **9**, 397-403.
- Lin, C.W. and Engelman, A. (2003) The barrier-to-autointegration factor is a component of functional human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *J Virol*, **77**, 5030-5036.
- Lipton, S.A. (1994) AIDS-related dementia and calcium homeostasis. *Ann N Y Acad Sci*, **747**, 205-224.
- Liu, H., Mulholland, N., Fu, H. and Zhao, K. (2006) Cooperative activity of BRG1 and Z-DNA formation in chromatin remodeling. *Mol Cell Biol*, **26**, 2550-2559.
- Liu, M., Iavarone, A. and Freedman, L.P. (1996a) Transcriptional activation of the human p21(WAF1/CIP1) gene by retinoic acid receptor. Correlation with retinoid induction of U937 cell differentiation. *J Biol Chem*, **271**, 31723-31728.
- Liu, N.Q., Lossinsky, A.S., Popik, W., Li, X., Gujuluva, C., Kriederman, B., Roberts, J., Pushkarsky, T., Bukrinsky, M., Witte, M., Weinand, M. and Fiala, M. (2002) Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Virol*, **76**, 6689-6700.
- 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**, 525-532.
- Liu, R., Paxton, W.A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S.R., Horuk, R., MacDonald, M.E., Stuhlmann, H., Koup, R.A. and Landau, N.R. (1996b) Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*, **86**, 367-377.
- Liu, Y., Colosimo, A.L., Yang, X.J. and Liao, D. (2000) Adenovirus E1B 55-kilodalton oncoprotein inhibits p53 acetylation by PCAF. *Mol Cell Biol*, **20**, 5540-5553.

- Liu, Y., Liu, H., Kim, B.O., Gattone, V.H., Li, J., Nath, A., Blum, J. and He, J.J. (2004) CD4-independent infection of astrocytes by human immunodeficiency virus type 1: requirement for the human mannose receptor. *J Virol*, **78**, 4120-4133.
- Livingstone, W.J., Moore, M., Innes, D., Bell, J.E. and Simmonds, P. (1996) Frequent infection of peripheral blood CD8-positive T-lymphocytes with HIV-1. Edinburgh Heterosexual Transmission Study Group. *Lancet*, **348**, 649-654.
- Llano, M., Delgado, S., Vanegas, M. and Poeschla, E.M. (2004a) Lens epithelium-derived growth factor/p75 prevents proteasomal degradation of HIV-1 integrase. *J Biol Chem*, **279**, 55570-55577.
- Llano, M., Vanegas, M., Fregoso, O., Saenz, D., Chung, S., Peretz, M. and Poeschla, E.M. (2004b) LEDGF/p75 determines cellular trafficking of diverse lentiviral but not murine oncoretroviral integrase proteins and is a component of functional lentiviral preintegration complexes. *J Virol*, **78**, 9524-9537.
- Lloyd, A. (1996) HIV infection and AIDS. *P N G Med J*, **39**, 174-180.
- Loetscher, P., Ugucioni, M., Bordoli, L., Baggiolini, M., Moser, B., Chizzolini, C. and Dayer, J.M. (1998) CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature*, **391**, 344-345.
- Loyola, A., Huang, J.Y., LeRoy, G., Hu, S., Wang, Y.H., Donnelly, R.J., Lane, W.S., Lee, S.C. and Reinberg, D. (2003) Functional analysis of the subunits of the chromatin assembly factor RSF. *Mol Cell Biol*, **23**, 6759-6768.
- Loyola, A., LeRoy, G., Wang, Y.H. and Reinberg, D. (2001) Reconstitution of recombinant chromatin establishes a requirement for histone-tail modifications during chromatin assembly and transcription. *Genes Dev*, **15**, 2837-2851.
- Luger, K., Mader, 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**, 251-260.
- Luger, K. and Richmond, T.J. (1998) The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 140-146.
- 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**, 137-148.
- 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**, 6550-6561.
- Lyakh, L., Ghosh, P. and Rice, N.R. (1997) Expression of NFAT-family proteins in normal human T cells. *Mol Cell Biol*, **17**, 2475-2484.

M

- Macian, F. and Rao, A. (1999) Reciprocal modulatory interaction between human immunodeficiency virus type 1 Tat and transcription factor NFAT1. *Mol Cell Biol*, **19**, 3645-3653.
- Macreadie, I.G., Thorburn, D.R., Kirby, D.M., Castelli, L.A., de Rozario, N.L. and Azad, A.A. (1997) HIV-1 protein Vpr causes gross mitochondrial dysfunction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **410**, 145-149.
- Maddon, P.J., Dalgleish, A.G., McDougal, J.S., Clapham, P.R., Weiss, R.A. and Axel, R. (1986) The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell*, **47**, 333-348.

- Mahmoudi, T., Parra, M., Vries, R.G., Kauder, S.E., Verrijzer, C.P., Ott, M. and Verdin, E. (2006) The SWI/SNF chromatin-remodeling complex is a cofactor for Tat transactivation of the HIV promoter. *J Biol Chem*, **281**, 19960-19968.
- 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**, 4914-4921.
- Majello, B., Napolitano, G. and Lania, L. (1998) Recruitment of the TATA-binding protein to the HIV-1 promoter is a limiting step for Tat transactivation. *Aids*, **12**, 1957-1964.
- Manke, I.A., Nguyen, A., Lim, D., Stewart, M.Q., Elia, A.E. and Yaffe, M.B. (2005) MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. *Mol Cell*, **17**, 37-48.
- 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**, 16513-16517.
- Mansky, L.M. (1996) The mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 is influenced by the vpr gene. *Virology*, **222**, 391-400.
- 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**, 7039-7047.
- 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.
- Marban, C., Suzanne, S., Dequiedt, F., de Walque, S., Redel, L., Van Lint, C., Aunis, D. and Rohr, O. (2007) Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing. *Embo J*, **26**, 412-423.
- Marcello, A. (2006) Latency: the hidden HIV-1 challenge. *Retrovirology*, **3**, 7.
- Marechal, V., Prevost, M.C., Petit, C., Perret, E., Heard, J.M. and Schwartz, O. (2001) Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J Virol*, **75**, 11166-11177.
- Marin, M., Rose, K.M., Kozak, S.L. and Kabat, D. (2003) HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med*, **9**, 1398-1403.
- Markowitz, M., Saag, M., Powderly, W.G., Hurley, A.M., Hsu, A., Valdes, J.M., Henry, D., Sattler, F., La Marca, A., Leonard, J.M. and et al. (1995) A preliminary study of zidovudine, zalcitabine, and zalcitabine, an inhibitor of HIV-1 protease, to treat HIV-1 infection. *N Engl J Med*, **333**, 1534-1539.
- Marmorstein, R. and Berger, S.L. (2001) Structure and function of bromodomains in chromatin-regulating complexes. *Gene*, **272**, 1-9.
- 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**, 13519-13524.
- Matsuda, N., Tanaka, H., Yamazaki, S., Suzuki, J., Tanaka, K., Yamada, T. and Masuda, M. (2006) HIV-1 Vpr induces G2 cell cycle arrest in fission yeast associated with Rad24/14-3-3-dependent, Chk1/Cds1-independent Wee1 upregulation. *Microbes Infect*, **8**, 2736-2744.
- Matthews, T., Salgo, M., Greenberg, M., Chung, J., DeMasi, R. and Bolognesi, D. (2004) Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. *Nat Rev Drug Discov*, **3**, 215-225.
- McCune, J.M. (1991) HIV-1: the infective process in vivo. *Cell*, **64**, 351-363.

- McDonald, D., Vodicka, M.A., Lucero, G., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., Emerman, M. and Hope, T.J. (2002) Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol*, **159**, 441-452.
- McDonald, D., Wu, L., Bohks, S.M., KewalRamani, V.N., Unutmaz, D. and Hope, T.J. (2003) Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science*, **300**, 1295-1297.
- Mellors, J.W., Rinaldo, C.R., Jr., Gupta, P., White, R.M., Todd, J.A. and Kingsley, L.A. (1996) Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science*, **272**, 1167-1170.
- Meneghini, M.D., Wu, M. and Madhani, H.D. (2003) Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell*, **112**, 725-736.
- Meyer, B.E. and Malim, M.H. (1994) The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev*, **8**, 1538-1547.
- Michel, N., Allespach, I., Venzke, S., Fackler, O.T. and Keppler, O.T. (2005) The Nef protein of human immunodeficiency virus establishes superinfection immunity by a dual strategy to downregulate cell-surface CCR5 and CD4. *Curr Biol*, **15**, 714-723.
- Miedema, F., Tersmette, M. and van Lier, R.A. (1990) AIDS pathogenesis: a dynamic interaction between HIV and the immune system. *Immunol Today*, **11**, 293-297.
- 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**, 5382-5390.
- Moir, S., Malaspina, A., Li, Y., Chun, T.W., Lowe, T., Adelsberger, J., Baseler, M., Ehler, L.A., Liu, S., Davey, R.T., Jr., Mican, J.A. and Fauci, A.S. (2000) B cells of HIV-1-infected patients bind virions through CD21-complement interactions and transmit infectious virus to activated T cells. *J Exp Med*, **192**, 637-646.
- Molle, D., Maiuri, P., Boireau, S., Bertrand, E., Knezevich, A., Marcello, A. and Basyuk, E. (2007) A real-time view of the TAR:Tat:P-TEFb complex at HIV-1 transcription sites. *Retrovirology*, **4**, 36.
- Moon, H.S. and Yang, J.S. (2006) Role of HIV Vpr as a regulator of apoptosis and an effector on bystander cells. *Mol Cells*, **21**, 7-20.
- Moore, J.P., McKeating, J.A., Norton, W.A. and Sattentau, Q.J. (1991) Direct measurement of soluble CD4 binding to human immunodeficiency virus type 1 virions: gp120 dissociation and its implications for virus-cell binding and fusion reactions and their neutralization by soluble CD4. *J Virol*, **65**, 1133-1140.
- Moore, J.P. and Nara, P.L. (1991) The role of the V3 loop of gp120 in HIV infection. *Aids*, **5 Suppl 2**, S21-33.
- Morellet, N., Bouaziz, S., Petitjean, P. and Roques, B.P. (2003) NMR structure of the HIV-1 regulatory protein VPR. *J Mol Biol*, **327**, 215-227.
- Moullignier, A. (2006) [HIV and the central nervous system]. *Rev Neurol (Paris)*, **162**, 22-42.
- Muller, B., Tessmer, U., Schubert, U. and Krausslich, H.G. (2000) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein is incorporated into the virion in significantly smaller amounts than gag and is phosphorylated in infected cells. *J Virol*, **74**, 9727-9731.
- Murphy, M., Ahn, J., Walker, K.K., Hoffman, W.H., Evans, R.M., Levine, A.J. and George, D.L. (1999) Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev*, **13**, 2490-2501.
- Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B. and et al. (1989) Interactions between heterologous

helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, **58**, 537-544.

- Muthumani, K., Hwang, D.S., Desai, B.M., Zhang, D., Dayes, N., Green, D.R. and Weiner, D.B. (2002a) HIV-1 Vpr induces apoptosis through caspase 9 in T cells and peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem*, **277**, 37820-37831.
- Muthumani, K., Zhang, D., Hwang, D.S., Kudchodkar, S., Dayes, N.S., Desai, B.M., Malik, A.S., Yang, J.S., Chattergoon, M.A., Maguire, H.C., Jr. and Weiner, D.B. (2002b) Adenovirus encoding HIV-1 Vpr activates caspase 9 and induces apoptotic cell death in both p53 positive and negative human tumor cell lines. *Oncogene*, **21**, 4613-4625.

N

- Nakai-Murakami, C., Shimura, M., Kinomoto, M., Takizawa, Y., Tokunaga, K., Taguchi, T., Hoshino, S., Miyagawa, K., Sata, T., Kurumizaka, H., Yuo, A. and Ishizaka, Y. (2007) HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination. *Oncogene*, **26**, 477-486.
- Nakamura, T., Suzuki, H., Okamoto, T., Kotani, S., Atsuji, Y., Tanaka, T. and Ito, Y. (2002) Recombinant Vpr (rVpr) causes augmentation of HIV-1 p24 Ag level in U1 cells through its ability to induce the secretion of TNF. *Virus Res*, **90**, 263-268.
- 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**, 3178-3186.
- Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D. and Grewal, S.I. (2001) Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*, **292**, 110-113.
- Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N. and Bird, A. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, **393**, 386-389.
- Nath, A. (2002) Human immunodeficiency virus (HIV) proteins in neuropathogenesis of HIV dementia. *J Infect Dis*, **186 Suppl 2**, S193-198.
- Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Sterner, D.E., Bylebyl, G.R., Dokmanovic, M., Dorsey, J.A., Whelan, K.A., Krsmanovic, M., Lane, W.S., Meluh, P.B., Johnson, E.S. and Berger, S.L. (2006) Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev*, **20**, 966-976.
- Nduati, R.W., John, G.C., Richardson, B.A., Overbaugh, J., Welch, M., Ndinya-Achola, J., Moses, S., Holmes, K., Onyango, F. and Kreiss, J.K. (1995) Human immunodeficiency virus type 1-infected cells in breast milk: association with immunosuppression and vitamin A deficiency. *J Infect Dis*, **172**, 1461-1468.
- Nehete, P.N., Vela, E.M., Hossain, M.M., Sarkar, A.K., Yahi, N., Fantini, J. and Sastry, K.J. (2002) A post-CD4-binding step involving interaction of the V3 region of viral gp120 with host cell surface glycosphingolipids is common to entry and infection by diverse HIV-1 strains. *Antiviral Res*, **56**, 233-251.
- Nelson, C.J., Santos-Rosa, H. and Kouzarides, T. (2006) Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression. *Cell*, **126**, 905-916.

- Neri, E., Musante, V. and Pittaluga, A. (2007) Effects of the HIV-1 viral protein TAT on central neurotransmission: role of group I metabotropic glutamate receptors. *Int Rev Neurobiol*, **82**, 339-356.
- Ng, H.H. and Bird, A. (1999) DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 158-163.
- Nguyen, D.G. and Hildreth, J.E. (2003) Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages. *Eur J Immunol*, **33**, 483-493.
- Nguyen, D.H., Giri, B., Collins, G. and Taub, D.D. (2005) Dynamic reorganization of chemokine receptors, cholesterol, lipid rafts, and adhesion molecules to sites of CD4 engagement. *Exp Cell Res*, **304**, 559-569.
- Nguyen, D.H. and Hildreth, J.E. (2000) Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol*, **74**, 3264-3272.
- Nguyen, N., Zhang, X., Olashaw, N. and Seto, E. (2004) Molecular cloning and functional characterization of the transcription factor YY2. *J Biol Chem*, **279**, 25927-25934.
- Niculescu, A.B., 3rd, Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C. and Reed, S.I. (1998) Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol*, **18**, 629-643.
- Nitahara-Kasahara, Y., Kamata, M., Yamamoto, T., Zhang, X., Miyamoto, Y., Muneta, K., Iijima, S., Yoneda, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y. and Aida, Y. (2007) Novel nuclear import of Vpr promoted by importin alpha is crucial for human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages. *J Virol*, **81**, 5284-5293.
- Nowak, S.J. and Corces, V.G. (2004) Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet*, **20**, 214-220.
- Nydegger, S., Foti, M., Derdowski, A., Spearman, P. and Thali, M. (2003) HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes. *Traffic*, **4**, 902-910.

O

- Ocker, M. and Schneider-Stock, R. (2007) Histone deacetylase inhibitors: signalling towards p21cip1/waf1. *Int J Biochem Cell Biol*, **39**, 1367-1374.
- Ogryzko, V.V., Wong, P. and Howard, B.H. (1997) WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol*, **17**, 4877-4882.
- Okano, M., Xie, S. and Li, E. (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet*, **19**, 219-220.
- Orenstein, J.M., Meltzer, M.S., Phipps, T. and Gendelman, H.E. (1988) Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study. *J Virol*, **62**, 2578-2586.
- Oroszlan, S. and Luftig, R.B. (1990) Retroviral proteinases. *Curr Top Microbiol Immunol*, **157**, 153-185.

P

- Pagans, S., Pedal, A., North, B.J., Kaehlcke, K., Marshall, B.L., Dorr, A., Hetzer-Egger, C., Henklein, P., Frye, R., McBurney, M.W., Hrubby, H., Jung, M., Verdin, E. and Ott, M. (2005) SIRT1 regulates HIV transcription via Tat deacetylation. *PLoS Biol*, **3**, e41.

- Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L. and Maniatis, T. (1994) The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell*, **78**, 773-785.
- Pandey, K.K., Sinha, S. and Grandgenett, D.P. (2007) Transcriptional coactivator LEDGF/p75 modulates human immunodeficiency virus type 1 integrase-mediated concerted integration. *J Virol*, **81**, 3969-3979.
- Parada, C.A. and Roeder, R.G. (1996) Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain. *Nature*, **384**, 375-378.
- Parker, S.F., Perkins, N.D., Gitlin, S.D. and Nabel, G.J. (1996) A cooperative interaction of human T-cell leukemia virus type 1 Tax with the p21 cyclin-dependent kinase inhibitor activates the human immunodeficiency virus type 1 enhancer. *J Virol*, **70**, 5731-5734.
- Patel, C.A., Mukhtar, M., Harley, S., Kulkosky, J. and Pomerantz, R.J. (2002) Lentiviral expression of HIV-1 Vpr induces apoptosis in human neurons. *J Neurovirol*, **8**, 86-99.
- Patra, S.K., Patra, A., Rizzi, F., Ghosh, T.C. and Bettuzzi, S. (2008) Demethylation of (Cytosine-5-C-methyl) DNA and regulation of transcription in the epigenetic pathways of cancer development. *Cancer Metastasis Rev*.
- Patterson, S., Rae, A., Hockey, N., Gilmour, J. and Gotch, F. (2001) Plasmacytoid dendritic cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus type 1 infection and release infectious virus. *J Virol*, **75**, 6710-6713.
- Pavletich, N.P. and Pabo, C.O. (1991) Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science*, **252**, 809-817.
- Pazin, M.J., Sheridan, P.L., Cannon, K., Cao, Z., Keck, J.G., Kadonaga, J.T. and Jones, K.A. (1996) NF-kappa B-mediated chromatin reconfiguration and transcriptional activation of the HIV-1 enhancer in vitro. *Genes Dev*, **10**, 37-49.
- Pei, X.Y., Dai, Y. and Grant, S. (2004) Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors. *Clin Cancer Res*, **10**, 3839-3852.
- Peng, C.Y., Graves, P.R., Thoma, R.S., Wu, Z., Shaw, A.S. and Piwnicka-Worms, H. (1997) Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science*, **277**, 1501-1505.
- Perea, G. and Araque, A. (2002) Communication between astrocytes and neurons: a complex language. *J Physiol Paris*, **96**, 199-207.
- Peterlin, B.M. and Price, D.H. (2006) Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell*, **23**, 297-305.
- 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. (2002) Chromatin remodeling: nucleosomes bulging at the seams. *Curr Biol*, **12**, R245-247.
- Petit, C., Giron, M.L., Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Real, E., Jacob, Y., Tordo, N., De The, H. and Saib, A. (2003) Targeting of incoming retroviral Gag to the centrosome involves a direct interaction with the dynein light chain 8. *J Cell Sci*, **116**, 3433-3442.
- Philippon, V., Vellutini, C., Gambarelli, D., Harkiss, G., Arbuthnott, G., Metzger, D., Roubin, R. and Filippi, P. (1994) The basic domain of the lentiviral Tat protein is responsible for damages in mouse brain: involvement of cytokines. *Virology*, **205**, 519-529.
- Pierson, T.C., Zhou, Y., Kieffer, T.L., Ruff, C.T., Buck, C. and Siliciano, R.F. (2002) Molecular characterization of preintegration latency in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*, **76**, 8518-8531.

- Pilcher, C.D., Shugars, D.C., Fiscus, S.A., Miller, W.C., Menezes, P., Giner, J., Dean, B., Robertson, K., Hart, C.E., Lennox, J.L., Eron, J.J., Jr. and Hicks, C.B. (2001) HIV in body fluids during primary HIV infection: implications for pathogenesis, treatment and public health. *Aids*, **15**, 837-845.
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N. and Filipowicz, W. (2007) Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol*, **17**, 118-126.
- Ping, Y.H., Chu, C.Y., Cao, H., Jacque, J.M., Stevenson, M. and Rana, T.M. (2004) Modulating HIV-1 replication by RNA interference directed against human transcription elongation factor SPT5. *Retrovirology*, **1**, 46.
- Ping, Y.H. and Rana, T.M. (2001) DSIF and NELF interact with RNA polymerase II elongation complex and HIV-1 Tat stimulates P-TEFb-mediated phosphorylation of RNA polymerase II and DSIF during transcription elongation. *J Biol Chem*, **276**, 12951-12958.
- Planelles, V., Jowett, J.B., Li, Q.X., Xie, Y., Hahn, B. and Chen, I.S. (1996) Vpr-induced cell cycle arrest is conserved among primate lentiviruses. *J Virol*, **70**, 2516-2524.
- Poggi, A. and Zocchi, M.R. (2006) HIV-1 Tat triggers TGF-beta production and NK cell apoptosis that is prevented by pertussis toxin B. *Clin Dev Immunol*, **13**, 369-372.
- Pomerantz, R.J. (2002) Eliminating HIV-1 reservoirs. *Curr Opin Investig Drugs*, **3**, 1133-1137.
- Pomerantz, R.J. and Horn, D.L. (2003) Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat Med*, **9**, 867-873.
- Pomerantz, R.J., Trono, D., Feinberg, M.B. and Baltimore, D. (1990) Cells nonproductively infected with HIV-1 exhibit an aberrant pattern of viral RNA expression: a molecular model for latency. *Cell*, **61**, 1271-1276.
- Poon, D.T., Li, G. and Aldovini, A. (1998) Nucleocapsid and matrix protein contributions to selective human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA packaging. *J Virol*, **72**, 1983-1993.
- Popov, S., Rexach, M., Ratner, L., Blobel, G. and Bukrinsky, M. (1998a) Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex. *J Biol Chem*, **273**, 13347-13352.
- Popov, S., Rexach, M., Zybarth, G., Reiling, N., Lee, M.A., Ratner, L., Lane, C.M., Moore, M.S., Blobel, G. and Bukrinsky, M. (1998b) Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *Embo J*, **17**, 909-917.
- Powell, C.M., Rudge, T.L., Zhu, Q., Johnson, L.F. and Hansen, U. (2000) Inhibition of the mammalian transcription factor LSF induces S-phase-dependent apoptosis by downregulating thymidylate synthase expression. *Embo J*, **19**, 4665-4675.
- Pradhan, S. and Esteve, P.O. (2003) Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression. *Clin Immunol*, **109**, 6-16.
- Price, T.O., Ercal, N., Nakaoke, R. and Banks, W.A. (2005) HIV-1 viral proteins gp120 and Tat induce oxidative stress in brain endothelial cells. *Brain Res*, **1045**, 57-63.

Q

- Qiu, C., Sawada, K., Zhang, X. and Cheng, X. (2002) The PWWP domain of mammalian DNA methyltransferase Dnmt3b defines a new family of DNA-binding folds. *Nat Struct Biol*, **9**, 217-224.

R

- Radhakrishnan, S.K., Feliciano, C.S., Najmabadi, F., Haegebarth, A., Kandel, E.S., Tyner, A.L. and Gartel, A.L. (2004) Constitutive expression of E2F-1 leads to p21-dependent cell cycle arrest in S phase of the cell cycle. *Oncogene*, **23**, 4173-4176.
- Raghavendra, N.K. and Engelman, A. (2007) LEDGF/p75 interferes with the formation of synaptic nucleoprotein complexes that catalyze full-site HIV-1 DNA integration in vitro: implications for the mechanism of viral cDNA integration. *Virology*, **360**, 1-5.
- Raleigh, J.M. and O'Connell, M.J. (2000) The G(2) DNA damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25. *J Cell Sci*, **113** (Pt 10), 1727-1736.
- 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**, 6107-6112.
- Rasty, S., Thatikunta, P., Gordon, J., Khalili, K., Amini, S. and Glorioso, J.C. (1996) Human immunodeficiency virus tat gene transfer to the murine central nervous system using a replication-defective herpes simplex virus vector stimulates transforming growth factor beta 1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6073-6078.
- Ratner, L., Starcich, B., Josephs, S.F., Hahn, B.H., Reddy, E.P., Livak, K.J., Petteway, S.R., Jr., Pearson, M.L., Haseltine, W.A., Arya, S.K. and et al. (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**, 8219-8229.
- Re, F., Braaten, D., Franke, E.K. and Luban, J. (1995) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B. *J Virol*, **69**, 6859-6864.
- 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.
- Reed-Inderbitzin, E., Moreno-Miralles, I., Vanden-Eynden, S.K., Xie, J., Lutterbach, B., Durst-Goodwin, K.L., Luce, K.S., Irvin, B.J., Cleary, M.L., Brandt, S.J. and Hiebert, S.W. (2006) RUNX1 associates with histone deacetylases and SUV39H1 to repress transcription. *Oncogene*, **25**, 5777-5786.
- Richard, N., Iacampo, S. and Cochrane, A. (1994) HIV-1 Rev is capable of shuttling between the nucleus and cytoplasm. *Virology*, **204**, 123-131.
- Rizzuto, C.D. and Sodroski, J.G. (1997) Contribution of virion ICAM-1 to human immunodeficiency virus infectivity and sensitivity to neutralization. *J Virol*, **71**, 4847-4851.
- Roberts, S.G. and Green, M.R. (1994) Activator-induced conformational change in general transcription factor TFIIB. *Nature*, **371**, 717-720.
- Robertson, A.K., Geiman, T.M., Sankpal, U.T., Hager, G.L. and Robertson, K.D. (2004) Effects of chromatin structure on the enzymatic and DNA binding functions of DNA methyltransferases DNMT1 and Dnmt3a in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, **322**, 110-118.
- Robertson, K.D. and Jones, P.A. (2000) DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*, **21**, 461-467.
- Robertson, K.D., Uzvolgyi, E., Liang, G., Talmadge, C., Sumegi, J., Gonzales, F.A. and Jones, P.A. (1999) The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res*, **27**, 2291-2298.
- Rodes, B., Toro, C., Paxinos, E., Poveda, E., Martinez-Padial, M., Benito, J.M., Jimenez, V., Wrin, T., Bassani, S. and Soriano, V. (2004) Differences in disease progression in a

- cohort of long-term non-progressors after more than 16 years of HIV-1 infection. *Aids*, **18**, 1109-1116.
- Roe, T., Reynolds, T.C., Yu, G. and Brown, P.O. (1993) Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *Embo J*, **12**, 2099-2108.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. and Bonner, W.M. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, **273**, 5858-5868.
- 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. (2003a) 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.
- Rohr, O., Marban, C., Aunis, D. and Schaeffer, E. (2003b) Regulation of HIV-1 gene transcription: from lymphocytes to microglial cells. *J Leukoc Biol*, **74**, 736-749.
- 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**, 404-413.
- Rohr, O., Schwartz, C., Hery, C., Aunis, D., Tardieu, M. and Schaeffer, E. (2000) The nuclear receptor chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor interacts with HIV-1 Tat and stimulates viral replication in human microglial cells. *J Biol Chem*, **275**, 2654-2660.
- 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**, 9375-9382.
- Rosenberg, E.S., Billingsley, J.M., Caliendo, A.M., Boswell, S.L., Sax, P.E., Kalams, S.A. and Walker, B.D. (1997) Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science*, **278**, 1447-1450.
- Roshal, M., Kim, B., Zhu, Y., Nghiem, P. and Planelles, V. (2003) Activation of the ATR-mediated DNA damage response by the HIV-1 viral protein R. *J Biol Chem*, **278**, 25879-25886.
- Roumier, T., Vieira, H.L., Castedo, M., Ferri, K.F., Boya, P., Andreau, K., Druillennec, S., Joza, N., Penninger, J.M., Roques, B. and Kroemer, G. (2002) The C-terminal moiety of HIV-1 Vpr induces cell death via a caspase-independent mitochondrial pathway. *Cell Death Differ*, **9**, 1212-1219.
- Roux, K.H. and Taylor, K.A. (2007) AIDS virus envelope spike structure. *Curr Opin Struct Biol*, **17**, 244-252.
- 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**, 4658-4665.
- Royce, R.A., Sena, A., Cates, W., Jr. and Cohen, M.S. (1997) Sexual transmission of HIV. *N Engl J Med*, **336**, 1072-1078.
- Ruben, S., Perkins, A., Purcell, R., Joung, K., Sia, R., Burghoff, R., Haseltine, W.A. and Rosen, C.A. (1989) Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol*, **63**, 1-8.

- Ruff, A.J., Coberly, J., Halsey, N.A., Boulos, R., Desormeaux, J., Burnley, A., Joseph, D.J., McBrien, M., Quinn, T., Losikoff, P. and et al. (1994) Prevalence of HIV-1 DNA and p24 antigen in breast milk and correlation with maternal factors. *J Acquir Immune Defic Syndr*, **7**, 68-73.
- 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.

S

- Sabbah, E.N. and Roques, B.P. (2005) Critical implication of the (70-96) domain of human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein in apoptosis of primary rat cortical and striatal neurons. *J Neurovirol*, **11**, 489-502.
- Sabri, F., Tresoldi, E., Di Stefano, M., Polo, S., Monaco, M.C., Verani, A., Fiore, J.R., Lusso, P., Major, E., Chiodi, F. and Scarlatti, G. (1999) Nonproductive human immunodeficiency virus type 1 infection of human fetal astrocytes: independence from CD4 and major chemokine receptors. *Virology*, **264**, 370-384.
- Saha, A., Wittmeyer, J. and Cairns, B.R. (2006) Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 437-447.
- Saib, A., Puvion-Dutilleul, F., Schmid, M., Peries, J. and de The, H. (1997) Nuclear targeting of incoming human foamy virus Gag proteins involves a centriolar step. *J Virol*, **71**, 1155-1161.
- Salim, A. and Ratner, L. (2008) Modulation of {beta}-Catenin and E-Cadherin Interaction by Vpu Increases HIV-1 Particle Release. *J Virol*.
- Sambucetti, L.C., Fischer, D.D., Zabludoff, S., Kwon, P.O., Chamberlin, H., Trogani, N., Xu, H. and Cohen, D. (1999) Histone deacetylase inhibition selectively alters the activity and expression of cell cycle proteins leading to specific chromatin acetylation and antiproliferative effects. *J Biol Chem*, **274**, 34940-34947.
- Sanchez-Velaz, N., Udofia, E.B., Yu, Z. and Zapp, M.L. (2004) hRIP, a cellular cofactor for Rev function, promotes release of HIV RNAs from the perinuclear region. *Genes Dev*, **18**, 23-34.
- Sandefur, S., Smith, R.M., Varthakavi, V. and Spearman, P. (2000) Mapping and characterization of the N-terminal I domain of human immunodeficiency virus type 1 Pr55(Gag). *J Virol*, **74**, 7238-7249.
- 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**, 407-411.
- Saphire, A.C., Bobardt, M.D. and Gallay, P.A. (2000) Human immunodeficiency virus type 1 hijacks host cyclophilin A for its attachment to target cells. *Immunol Res*, **21**, 211-217.
- Sarkar, I., Hauber, I., Hauber, J. and Buchholz, F. (2007) HIV-1 proviral DNA excision using an evolved recombinase. *Science*, **316**, 1912-1915.
- 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**, 3413-3420.
- Sawaya, B.E., Khalili, K., Mercer, W.E., Denisova, L. and Amini, S. (1998) Cooperative actions of HIV-1 Vpr and p53 modulate viral gene transcription. *J Biol Chem*, **273**, 20052-20057.

- Saxena, S., Jonsson, Z.O. and Dutta, A. (2003) Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J Biol Chem*, **278**, 44312-44319.
- Schacker, T., Collier, A.C., Hughes, J., Shea, T. and Corey, L. (1996) Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection. *Ann Intern Med*, **125**, 257-264.
- Scherdin, U., Rhodes, K. and Breindl, M. (1990) Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration. *J Virol*, **64**, 907-912.
- Schindler, M., Wurfl, S., Benaroch, P., Greenough, T.C., Daniels, R., Easterbrook, P., Brenner, M., Munch, J. and Kirchhoff, F. (2003) Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell surface expression are well-conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles. *J Virol*, **77**, 10548-10556.
- 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**, 305-308.
- 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.
- Schroder, A.R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R. and Bushman, F. (2002) HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*, **110**, 521-529.
- Schrofelbauer, B., Hakata, Y. and Landau, N.R. (2007) HIV-1 Vpr function is mediated by interaction with the damage-specific DNA-binding protein DDB1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 4130-4135.
- Schuitmaker, H., Kootstra, N.A., Fouchier, R.A., Hooibrink, B. and Miedema, F. (1994) Productive HIV-1 infection of macrophages restricted to the cell fraction with proliferative capacity. *Embo J*, **13**, 5929-5936.
- Schuler, M. and Green, D.R. (2001) Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans*, **29**, 684-688.
- Schuler, W., Wecker, K., de Rocquigny, H., Baudat, Y., Sire, J. and Roques, B.P. (1999) NMR structure of the (52-96) C-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr: molecular insights into its biological functions. *J Mol Biol*, **285**, 2105-2117.
- 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., Marechal, 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**, 338-342.
- Schwartz, S.A. and Nair, M.P. (1999) Current concepts in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Clin Diagn Lab Immunol*, **6**, 295-305.
- Seddiki, N., Ramdani, A., Saffar, L., Portoukalian, J., Gluckman, J.C. and Gattegno, L. (1994) A monoclonal antibody directed to sulfatide inhibits the binding of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope glycoprotein to macrophages but not their infection by the virus. *Biochim Biophys Acta*, **1225**, 289-296.
- Segura-Totten, M. and Wilson, K.L. (2001) Virology. HIV--breaking the rules for nuclear entry. *Science*, **294**, 1016-1017.

- Sekaly, R.P. (2008) The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching point for future vaccine development? *J Exp Med*, **205**, 7-12.
- Selig, L., Benichou, S., Rogel, M.E., Wu, L.I., Vodicka, M.A., Sire, J., Benarous, R. and Emerman, M. (1997) Uracil DNA glycosylase specifically interacts with Vpr of both human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus of sooty mangabeys, but binding does not correlate with cell cycle arrest. *J Virol*, **71**, 4842-4846.
- 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.
- Shankarappa, R., Margolick, J.B., Gange, S.J., Rodrigo, A.G., Upchurch, D., Farzadegan, H., Gupta, P., Rinaldo, C.R., Learn, G.H., He, X., Huang, X.L. and Mullins, J.I. (1999) Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*, **73**, 10489-10502.
- Sharer, L.R., Cho, E.S. and Epstein, L.G. (1985) Multinucleated giant cells and HTLV-III in AIDS encephalopathy. *Hum Pathol*, **16**, 760.
- Shaulian, E. and Karin, M. (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*, **4**, E131-136.
- Shaw, J.P., Utz, P.J., Durand, D.B., Toole, J.J., Emmel, E.A. and Crabtree, G.R. (1988) Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science*, **241**, 202-205.
- Sheline, C.T., Milocco, L.H. and Jones, K.A. (1991) Two distinct nuclear transcription factors recognize loop and bulge residues of the HIV-1 TAR RNA hairpin. *Genes Dev*, **5**, 2508-2520.
- Shen, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A. and Wu, C. (2000) A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature*, **406**, 541-544.
- 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**, 2090-2104.
- Sherman, M.P., de Noronha, C.M., Eckstein, L.A., Hataye, J., Mundt, P., Williams, S.A., Neidleman, J.A., Goldsmith, M.A. and Greene, W.C. (2003) Nuclear export of Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 in tissue macrophages. *J Virol*, **77**, 7582-7589.
- Sherman, M.P., de Noronha, C.M., Heusch, M.I., Greene, S. and Greene, W.C. (2001) Nucleocytoplasmic shuttling by human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol*, **75**, 1522-1532.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A. and Shi, Y. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, **119**, 941-953.
- Shiio, Y. and Eisenman, R.N. (2003) Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13225-13230.
- Shilatifard, A. (2006) Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem*, **75**, 243-269.
- Shun, M.C., Raghavendra, N.K., Vandegraaff, N., Daigle, J.E., Hughes, S., Kellam, P., Cherepanov, P. and Engelman, A. (2007) LEDGF/p75 functions downstream from preintegration complex formation to effect gene-specific HIV-1 integration. *Genes Dev*, **21**, 1767-1778.

- Siliciano, J.D., Lai, J., Callender, M., Pitt, E., Zhang, H., Margolick, J.B., Gallant, J.E., Cofrancesco, J., Jr., Moore, R.D., Gange, S.J. and Siliciano, R.F. (2007) Stability of the latent reservoir for HIV-1 in patients receiving valproic acid. *J Infect Dis*, **195**, 833-836.
- 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**, 763-777.
- Simon, J.H., Carpenter, E.A., Fouchier, R.A. and Malim, M.H. (1999) Vif and the p55(Gag) polyprotein of human immunodeficiency virus type 1 are present in colocalizing membrane-free cytoplasmic complexes. *J Virol*, **73**, 2667-2674.
- Singer, M.S., Kahana, A., Wolf, A.J., Meisinger, L.L., Peterson, S.E., Goggin, C., Mahowald, M. and Gottschling, D.E. (1998) Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **150**, 613-632.
- Sirito, M., Walker, S., Lin, Q., Kozlowski, M.T., Klein, W.H. and Sawadogo, M. (1992) Members of the USF family of helix-loop-helix proteins bind DNA as homo- as well as heterodimers. *Gene Expr*, **2**, 231-240.
- Slotkin, R.K. and Martienssen, R. (2007) Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet*, **8**, 272-285.
- Sowa, Y., Orita, T., Hiranabe-Minamikawa, S., Nakano, K., Mizuno, T., Nomura, H. and Sakai, T. (1999) Histone deacetylase inhibitor activates the p21/WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites. *Ann N Y Acad Sci*, **886**, 195-199.
- Staprans, S., Marlowe, N., Glidden, D., Novakovic-Agopian, T., Grant, R.M., Heyes, M., Aweeka, F., Deeks, S. and Price, R.W. (1999) Time course of cerebrospinal fluid responses to antiretroviral therapy: evidence for variable compartmentalization of infection. *Aids*, **13**, 1051-1061.
- Stark, L.A. and Hay, R.T. (1998) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral protein R (Vpr) interacts with Lys-tRNA synthetase: implications for priming of HIV-1 reverse transcription. *J Virol*, **72**, 3037-3044.
- Steinman, R.M. (2003) Some interfaces of dendritic cell biology. *Apmis*, **111**, 675-697.
- Stevenson, M. (2003) HIV-1 pathogenesis. *Nat Med*, **9**, 853-860.
- Stevenson, M., Stanwick, T.L., Dempsey, M.P. and Lamonica, C.A. (1990) HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *Embo J*, **9**, 1551-1560.
- Steward, M.M., Lee, J.S., O'Donovan, A., Wyatt, M., Bernstein, B.E. and Shilatifard, A. (2006) Molecular regulation of H3K4 trimethylation by ASH2L, a shared subunit of MLL complexes. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 852-854.
- 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.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41-45.
- Strathdee, G. and Brown, R. (2002) Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. *Expert Rev Mol Med*, **4**, 1-17.
- Stremlau, M., Perron, M., Lee, M., Li, Y., Song, B., Javanbakht, H., Diaz-Griffero, F., Anderson, D.J., Sundquist, W.I. and Sodroski, J. (2006) Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5 α restriction factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 5514-5519.

- Suetake, I., Shinozaki, F., Miyagawa, J., Takeshima, H. and Tajima, S. (2004) DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem*, **279**, 27816-27823.
- Suzuki, T., Yokozaki, H., Kuniyasu, H., Hayashi, K., Naka, K., Ono, S., Ishikawa, T., Tahara, E. and Yasui, W. (2000) Effect of trichostatin A on cell growth and expression of cell cycle- and apoptosis-related molecules in human gastric and oral carcinoma cell lines. *Int J Cancer*, **88**, 992-997.
- Suzuki, Y. and Craigie, R. (2007) The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nat Rev Microbiol*, **5**, 187-196.
- Suzuki, Y., Yang, H. and Craigie, R. (2004) LAP2alpha and BAF collaborate to organize the Moloney murine leukemia virus preintegration complex. *Embo J*, **23**, 4670-4678.

T

- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G. and Nakatani, Y. (2004) Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell*, **116**, 51-61.
- Tardif, M.R. and Tremblay, M.J. (2003) Presence of host ICAM-1 in human immunodeficiency virus type 1 virions increases productive infection of CD4+ T lymphocytes by favoring cytosolic delivery of viral material. *J Virol*, **77**, 12299-12309.
- Taylor, S. and Pereira, A. (2000) Penetration of HIV-1 protease inhibitors into CSF and semen. *HIV Med*, **1 Suppl 2**, 18-22.
- Taylor, W.R., DePrimo, S.E., Agarwal, A., Agarwal, M.L., Schonthal, A.H., Katula, K.S. and Stark, G.R. (1999) Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53. *Mol Biol Cell*, **10**, 3607-3622.
- Temin, H.M. (1993) Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6900-6903.
- Thierry, S., Marechal, V., Rosenzweig, M., Sabbah, M., Redeuilh, G., Nicolas, J.C. and Gozlan, J. (2004) Cell cycle arrest in G2 induces human immunodeficiency virus type 1 transcriptional activation through histone acetylation and recruitment of CBP, NF-kappaB, and c-Jun to the long terminal repeat promoter. *J Virol*, **78**, 12198-12206.
- Thompson, K.A., Churchill, M.J., Gorry, P.R., Sterjovski, J., Oelrichs, R.B., Wesselingh, S.L. and McLean, C.A. (2004) Astrocyte specific viral strains in HIV dementia. *Ann Neurol*, **56**, 873-877.
- Tobiume, M., Fujinaga, K., Suzuki, S., Komoto, S., Mukai, T. and Ikuta, K. (2002) Extracellular Nef protein activates signal transduction pathway from Ras to mitogen-activated protein kinase cascades that leads to activation of human immunodeficiency virus from latency. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **18**, 461-467.
- Tong, J.K., Hassig, C.A., Schnitzler, G.R., Kingston, R.E. and Schreiber, S.L. (1998) Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodeling complex. *Nature*, **395**, 917-921.
- Topark-Ngarm, A., Golonzhka, O., Peterson, V.J., Barrett, B., Jr., Martinez, B., Crofoot, K., Filtz, T.M. and Leid, M. (2006) CTIP2 associates with the NuRD complex on the promoter of p57KIP2, a newly identified CTIP2 target gene. *J Biol Chem*, **281**, 32272-32283.
- Travers, A. (1999) An engine for nucleosome remodeling. *Cell*, **96**, 311-314.

- Travis, A., Amsterdam, A., Belanger, C. and Grosschedl, R. (1991) LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function [corrected]. *Genes Dev*, **5**, 880-894.
- Treand, C., du Chene, I., Bres, V., Kiernan, R., Benarous, R., Benkirane, M. and Emiliani, S. (2006) Requirement for SWI/SNF chromatin-remodeling complex in Tat-mediated activation of the HIV-1 promoter. *Embo J*, **25**, 1690-1699.
- Triboulet, R., Mari, B., Lin, Y.L., Chable-Bessia, C., Bennasser, Y., Lebrigand, K., Cardinaud, B., Maurin, T., Barbry, P., Baillat, V., Reynes, J., Corbeau, P., Jeang, K.T. and Benkirane, M. (2007) Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science*, **315**, 1579-1582.
- 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**, 144-154.
- Tristem, M., Marshall, C., Karpas, A., Petrik, J. and Hill, F. (1990) Origin of vpx in lentiviruses. *Nature*, **347**, 341-342.
- Tungaturthi, P.K., Sawaya, B.E., Singh, S.P., Tomkowicz, B., Ayyavoo, V., Khalili, K., Collman, R.G., Amini, S. and Srinivasan, A. (2003) Role of HIV-1 Vpr in AIDS pathogenesis: relevance and implications of intravirion, intracellular and free Vpr. *Biomed Pharmacother*, **57**, 20-24.
- Turville, S.G., Cameron, P.U., Handley, A., Lin, G., Pohlmann, S., Doms, R.W. and Cunningham, A.L. (2002) Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol*, **3**, 975-983.
- Turville, S.G., Santos, J.J., Frank, I., Cameron, P.U., Wilkinson, J., Miranda-Saksena, M., Dable, J., Stossel, H., Romani, N., Piatak, M., Jr., Lifson, J.D., Pope, M. and Cunningham, A.L. (2004) Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood*, **103**, 2170-2179.
- Tyagi, M. and Karn, J. (2007) CBF-1 promotes transcriptional silencing during the establishment of HIV-1 latency. *Embo J*, **26**, 4985-4995.

U

- Uittenbogaart, C.H., Anisman, D.J., Jamieson, B.D., Kitchen, S., Schmid, I., Zack, J.A. and Hays, E.F. (1996) Differential tropism of HIV-1 isolates for distinct thymocyte subsets in vitro. *Aids*, **10**, F9-16.

V

- Vakoc, C.R., Mandat, S.A., Olenchok, B.A. and Blobel, G.A. (2005) Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell*, **19**, 381-391.
- Valentin, A., Trivedi, H., Lu, W., Kostrikis, L.G. and Pavlakis, G.N. (2000) CXCR4 mediates entry and productive infection of syncytia-inducing (X4) HIV-1 strains in primary macrophages. *Virology*, **269**, 294-304.
- Valsamakis, A., Schek, N. and Alwine, J.C. (1992) Elements upstream of the AAUAAA within the human immunodeficiency virus polyadenylation signal are required for efficient polyadenylation in vitro. *Mol Cell Biol*, **12**, 3699-3705.

- van Attikum, H., Fritsch, O., Hohn, B. and Gasser, S.M. (2004) Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell*, **119**, 777-788.
- Van de Perre, P., Simonon, A., Hitimana, D.G., Dabis, F., Msellati, P., Mukamabano, B., Butera, J.B., Van Goethem, C., Karita, E. and Lepage, P. (1993) Infective and anti-infective properties of breastmilk from HIV-1-infected women. *Lancet*, **341**, 914-918.
- van der Meer, P., Ulrich, A.M., Gonzalez-Scarano, F. and Lavi, E. (2000) Immunohistochemical analysis of CCR2, CCR3, CCR5, and CXCR4 in the human brain: potential mechanisms for HIV dementia. *Exp Mol Pathol*, **69**, 192-201.
- Van Heuverswyn, F., Li, Y., Neel, C., Bailes, E., Keele, B.F., Liu, W., Loul, S., Butel, C., Liegeois, F., Bienvenue, Y., Ngolle, E.M., Sharp, P.M., Shaw, G.M., Delaporte, E., Hahn, B.H. and Peeters, M. (2006) Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature*, **444**, 164.
- 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**, 6113-6127.
- Van Maele, B., Busschots, K., Vandekerckhove, L., Christ, F. and Debyser, Z. (2006) Cellular co-factors of HIV-1 integration. *Trends Biochem Sci*, **31**, 98-105.
- Vandegraaff, N., Devroe, E., Turlure, F., Silver, P.A. and Engelman, A. (2006) Biochemical and genetic analyses of integrase-interacting proteins lens epithelium-derived growth factor (LEDGF)/p75 and hepatoma-derived growth factor related protein 2 (HRP2) in preintegration complex function and HIV-1 replication. *Virology*, **346**, 415-426.
- Varin, A., Decrion, A.Z., Sabbah, E., Quivy, V., Sire, J., Van Lint, C., Roques, B.P., Aggarwal, B.B. and Herbein, G. (2005) Synthetic Vpr protein activates activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase, and NF-kappaB and stimulates HIV-1 transcription in promonocytic cells and primary macrophages. *J Biol Chem*, **280**, 42557-42567.
- Varin, A., Manna, S.K., Quivy, V., Decrion, A.Z., Van Lint, C., Herbein, G. and Aggarwal, B.B. (2003) Exogenous Nef protein activates NF-kappa B, AP-1, and c-Jun N-terminal kinase and stimulates HIV transcription in promonocytic cells. Role in AIDS pathogenesis. *J Biol Chem*, **278**, 2219-2227.
- 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.
- 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**, 149-159.
- Vazquez, N., Greenwell-Wild, T., Marinos, N.J., Swaim, W.D., Nares, S., Ott, D.E., Schubert, U., Henklein, P., Orenstein, J.M., Sporn, M.B. and Wahl, S.M. (2005) Human immunodeficiency virus type 1-induced macrophage gene expression includes the p21 gene, a target for viral regulation. *J Virol*, **79**, 4479-4491.
- 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**, 6790-6799.
- Verdin, E., Dequiedt, F. and Kasler, H.G. (2003) Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet*, **19**, 286-293.

- 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.
- Vidricaire, G., Gauthier, S. and Tremblay, M.J. (2007) HIV-1 infection of trophoblasts is independent of gp120/CD4 Interactions but relies on heparan sulfate proteoglycans. *J Infect Dis*, **195**, 1461-1471.
- Vidricaire, G. and Tremblay, M.J. (2004) [For a better understanding of the mechanisms involved in vertical transmission of HIV]. *Med Sci (Paris)*, **20**, 784-787.
- Villagra, A., Cruzat, F., Carvalho, L., Paredes, R., Olate, J., van Wijnen, A.J., Stein, G.S., Lian, J.B., Stein, J.L., Imbalzano, A.N. and Montecino, M. (2006) Chromatin remodeling and transcriptional activity of the bone-specific osteocalcin gene require CCAAT/enhancer-binding protein beta-dependent recruitment of SWI/SNF activity. *J Biol Chem*, **281**, 22695-22706.
- Vives, R.R., Imberty, A., Sattentau, Q.J. and Lortat-Jacob, H. (2005) Heparan sulfate targets the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 coreceptor binding site. *J Biol Chem*, **280**, 21353-21357.
- Vodicka, M.A., Koepp, D.M., Silver, P.A. and Emerman, M. (1998) HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes Dev*, **12**, 175-185.
- von Schwedler, U.K., Stemmler, T.L., Klishko, V.Y., Li, S., Albertine, K.H., Davis, D.R. and Sundquist, W.I. (1998) Proteolytic refolding of the HIV-1 capsid protein amino-terminus facilitates viral core assembly. *Embo J*, **17**, 1555-1568.

W

- Wahl, L.M., Corcoran, M.L., Pyle, S.W., Arthur, L.O., Harel-Bellan, A. and Farrar, W.L. (1989) Human immunodeficiency virus glycoprotein (gp120) induction of monocyte arachidonic acid metabolites and interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 621-625.
- 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., Inoue, J., Takahashi, Y., Matsuki, A., Kosugi-Okano, H., Shinbo, T., Mishima, Y., Niwa, O. and Kominami, R. (2003a) Homozygous deletions and point mutations of the Rit1/Bcl11b gene in gamma-ray induced mouse thymic lymphomas. *Biochem Biophys Res Commun*, **301**, 598-603.
- 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. (2003b) Bcl11b is required for differentiation and survival of alphabeta T lymphocytes. *Nat Immunol*, **4**, 533-539.
- Waltzer, L., Bourillot, P.Y., Sergeant, A. and Manet, E. (1995) RBP-J kappa repression activity is mediated by a co-repressor and antagonized by the Epstein-Barr virus transcription factor EBNA2. *Nucleic Acids Res*, **23**, 4939-4945.
- Wang, B., Ge, Y.C., Palasanthiran, P., Xiang, S.H., Ziegler, J., Dwyer, D.E., Randle, C., Downton, D., Cunningham, A. and Saksena, N.K. (1996) Gene defects clustered at the C-terminus of the vpr gene of HIV-1 in long-term nonprogressing mother and child pair: in vivo evolution of vpr quasispecies in blood and plasma. *Virology*, **223**, 224-232.
- Wang, H., Huang, Z.Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B.D., Briggs, S.D., Allis, C.D., Wong, J., Tempst, P. and Zhang, Y. (2001) Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science*, **293**, 853-857.

- Wang, H., Zhai, L., Xu, J., Joo, H.Y., Jackson, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Xiong, Y. and Zhang, Y. (2006) Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol Cell*, **22**, 383-394.
- 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**, 25564-25569.
- Wang, W. (2003) The SWI/SNF family of ATP-dependent chromatin remodelers: similar mechanisms for diverse functions. *Curr Top Microbiol Immunol*, **274**, 143-169.
- Warrilow, D., Stenzel, D. and Harrich, D. (2007) Isolated HIV-1 core is active for reverse transcription. *Retrovirology*, **4**, 77.
- Watanabe, N., Yamaguchi, T., Akimoto, Y., Rattner, J.B., Hirano, H. and Nakauchi, H. (2000) Induction of M-phase arrest and apoptosis after HIV-1 Vpr expression through uncoupling of nuclear and centrosomal cycle in HeLa cells. *Exp Cell Res*, **258**, 261-269.
- Wecker, K., Morellet, N., Bouaziz, S. and Roques, B.P. (2002) NMR structure of the HIV-1 regulatory protein Vpr in H₂O/trifluoroethanol. Comparison with the Vpr N-terminal (1-51) and C-terminal (52-96) domains. *Eur J Biochem*, **269**, 3779-3788.
- 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**, 451-462.
- Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M.A. and Allis, C.D. (1999) Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*, **97**, 99-109.
- Weis, K. (2002) Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 328-335.
- Wen, X., Duus, K.M., Friedrich, T.D. and de Noronha, C.M. (2007) The HIV1 protein Vpr acts to promote G2 cell cycle arrest by engaging a DDB1 and Cullin4A-containing ubiquitin ligase complex using VprBP/DCAF1 as an adaptor. *J Biol Chem*, **282**, 27046-27057.
- West, C.M. (2003) Evolutionary and functional implications of the complex glycosylation of Skp1, a cytoplasmic/nuclear glycoprotein associated with polyubiquitination. *Cell Mol Life Sci*, **60**, 229-240.
- West, M.J., Lowe, A.D. and Karn, J. (2001) Activation of human immunodeficiency virus transcription in T cells revisited: NF-kappaB p65 stimulates transcriptional elongation. *J Virol*, **75**, 8524-8537.
- White, C.L., Suto, R.K. and Luger, K. (2001) Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions. *Embo J*, **20**, 5207-5218.
- Wichukchinda, N., Kitamura, Y., Rojanawiwat, A., Nakayama, E.E., Song, H., Pathipvanich, P., Auwanit, W., Sawanpanyalert, P., Iwamoto, A., Shioda, T. and Ariyoshi, K. (2007) The polymorphisms in DC-SIGNR affect susceptibility to HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **23**, 686-692.
- 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**, 2451-2458.
- Wild, C., Dubay, J.W., Greenwell, T., Baird, T., Jr., Oas, T.G., McDanal, C., Hunter, E. and Matthews, T. (1994) Propensity for a leucine zipper-like domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 to form oligomers correlates with a role in virus-induced fusion rather than assembly of the glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12676-12680.

- Wiley, R.D. and Gummuluru, S. (2006) Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 738-743.
- 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.
- Williams, S.A. and Greene, W.C. (2007) Regulation of HIV-1 latency by T-cell activation. *Cytokine*, **39**, 63-74.
- Wodrich, H. and Krausslich, H.G. (2001) Nucleocytoplasmic RNA transport in retroviral replication. *Results Probl Cell Differ*, **34**, 197-217.
- Wolffe, A.P., Jones, P.L. and Wade, P.A. (1999) DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5894-5896.
- Wong, J.K., Hezareh, M., Gunthard, H.F., Havlir, D.V., Ignacio, C.C., Spina, C.A. and Richman, D.D. (1997) Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science*, **278**, 1291-1295.
- Wu, C.H., Yamaguchi, Y., Benjamin, L.R., Horvat-Gordon, M., Washinsky, J., Enerly, E., Larsson, J., Lambertsson, A., Handa, H. and Gilmour, D. (2003) NELF and DSIF cause promoter proximal pausing on the hsp70 promoter in *Drosophila*. *Genes Dev*, **17**, 1402-1414.
- Wu, F., Garcia, J., Sigman, D. and Gaynor, R. (1991) tat regulates binding of the human immunodeficiency virus trans-activating region RNA loop-binding protein TRP-185. *Genes Dev*, **5**, 2128-2140.
- Wu, K., Chen, A. and Pan, Z.Q. (2000) Conjugation of Nedd8 to CUL1 enhances the ability of the ROC1-CUL1 complex to promote ubiquitin polymerization. *J Biol Chem*, **275**, 32317-32324.
- Wu, L., Gerard, N.P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A.A., Desjardin, E., Newman, W., Gerard, C. and Sodroski, J. (1996) CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature*, **384**, 179-183.
- Wu, L. and KewalRamani, V.N. (2006) Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol*, **6**, 859-868.
- Wu, Y. (2004) HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA. *Retrovirology*, **1**, 13.
- Wu, Y. and Marsh, J.W. (2001) Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. *Science*, **293**, 1503-1506.

X

- Xiao, T., Kao, C.F., Krogan, N.J., Sun, Z.W., Greenblatt, J.F., Osley, M.A. and Strahl, B.D. (2005) Histone H2B ubiquitylation is associated with elongating RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, **25**, 637-651.
- Xie, S., Wang, Z., Okano, M., Nogami, M., Li, Y., He, W.W., Okumura, K. and Li, E. (1999) Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene*, **236**, 87-95.
- Xu, W., Chen, H., Du, K., Asahara, H., Tini, M., Emerson, B.M., Montminy, M. and Evans, R.M. (2001) A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. *Science*, **294**, 2507-2511.

Xue, Y., Wong, J., Moreno, G.T., Young, M.K., Cote, J. and Wang, W. (1998) NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell*, **2**, 851-861.

Y

Yamashita, M. and Emerman, M. (2006) Retroviral infection of non-dividing cells: old and new perspectives. *Virology*, **344**, 88-93.

Yang, O.O., Kalams, S.A., Trocha, A., Cao, H., Luster, A., Johnson, R.P. and Walker, B.D. (1997) Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8+ cells: evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic and noncytolytic mechanisms. *J Virol*, **71**, 3120-3128.

Yang, W.M., Inouye, C.J. and Seto, E. (1995) Cyclophilin A and FKBP12 interact with YY1 and alter its transcriptional activity. *J Biol Chem*, **270**, 15187-15193.

Yao, X.J., Subbramanian, R.A., Rougeau, N., Boisvert, F., Bergeron, D. and Cohen, E.A. (1995) Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 Vpr: role of a predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation. *J Virol*, **69**, 7032-7044.

Yedavalli, V.R. and Jeang, K.T. (2007) Methylation: a regulator of HIV-1 replication? *Retrovirology*, **4**, 9.

Yeh, M.W., Kaul, M., Zheng, J., Nottet, H.S., Thylin, M., Gendelman, H.E. and Lipton, S.A. (2000) Cytokine-stimulated, but not HIV-infected, human monocyte-derived macrophages produce neurotoxic levels of l -cysteine. *J Immunol*, **164**, 4265-4270.

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**, 2369-2380.

Yeung, M.L., Bennasser, Y., Le, S.Y. and Jeang, K.T. (2005) siRNA, miRNA and HIV: promises and challenges. *Cell Res*, **15**, 935-946.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G. and Cullen, B.R. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, **17**, 3011-3016.

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. (2004) Polyamides reveal a role for repression in latency within resting T cells of HIV-infected donors. *J Infect Dis*, **190**, 1429-1437.

Yoshizuka, N., Yoshizuka-Chadani, Y., Krishnan, V. and Zeichner, S.L. (2005) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr-dependent cell cycle arrest through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Virol*, **79**, 11366-11381.

Yu, J., Li, Y., Ishizuka, T., Guenther, M.G. and Lazar, M.A. (2003a) A SANT motif in the SMRT corepressor interprets the histone code and promotes histone deacetylation. *Embo J*, **22**, 3403-3410.

Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P. and Yu, X.F. (2003b) Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science*, **302**, 1056-1060.

Yu, X., Yuan, X., Matsuda, Z., Lee, T.H. and Essex, M. (1992) The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J Virol*, **66**, 4966-4971.

- Yu, Z., Sanchez-Velaz, N., Catrina, I.E., Kittler, E.L., Udofia, E.B. and Zapp, M.L. (2005) The cellular HIV-1 Rev cofactor hRIP is required for viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 4027-4032.
- Yuan, X., Matsuda, Z., Matsuda, M., Essex, M. and Lee, T.H. (1990) Human immunodeficiency virus vpr gene encodes a virion-associated protein. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **6**, 1265-1271.
- Yung, E., Sorin, M., Wang, E.J., Perumal, S., Ott, D. and Kalpana, G.V. (2004) Specificity of interaction of INI1/hSNF5 with retroviral integrases and its functional significance. *J Virol*, **78**, 2222-2231.

Z

- 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**, 213-222.
- Zander, K., Sherman, M.P., Tessmer, U., Bruns, K., Wray, V., Prectel, A.T., Schubert, E., Henklein, P., Luban, J., Neidleman, J., Greene, W.C. and Schubert, U. (2003) Cyclophilin A interacts with HIV-1 Vpr and is required for its functional expression. *J Biol Chem*, **278**, 43202-43213.
- Zawel, L., Kumar, K.P. and Reinberg, D. (1995) Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Genes Dev*, **9**, 1479-1490.
- Zeng, L. and Zhou, M.M. (2002) Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett*, **513**, 124-128.
- Zennou, V., Perez-Caballero, D., Gottlinger, H. and Bieniasz, P.D. (2004) APOBEC3G incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol*, **78**, 12058-12061.
- Zerhouni, B., Nelson, J.A. and Saha, K. (2004) CXCR4-dependent infection of CD8+, but not CD4+, lymphocytes by a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate. *J Virol*, **78**, 12288-12296.
- Zhang, J., Dai, J., Zhao, E., Lin, Y., Zeng, L., Chen, J., Zheng, H., Wang, Y., Li, X., Ying, K., Xie, Y. and Mao, Y. (2004) cDNA cloning, gene organization and expression analysis of human peptidylarginine deiminase type VI. *Acta Biochim Pol*, **51**, 1051-1058.
- Zhang, K., Rana, F., Silva, C., Ethier, J., Wehrly, K., Chesebro, B. and Power, C. (2003) Human immunodeficiency virus type 1 envelope-mediated neuronal death: uncoupling of viral replication and neurotoxicity. *J Virol*, **77**, 6899-6912.
- Zhang, Y. and Barklis, E. (1997) Effects of nucleocapsid mutations on human immunodeficiency virus assembly and RNA encapsidation. *J Virol*, **71**, 6765-6776.
- Zhang, Y. and Reinberg, D. (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev*, **15**, 2343-2360.
- 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**, 6073-6076.
- Zhou, Y., Lu, Y. and Ratner, L. (1998) Arginine residues in the C-terminus of HIV-1 Vpr are important for nuclear localization and cell cycle arrest. *Virology*, **242**, 414-424.

- Zhou, Y., Zhang, H., Siliciano, J.D. and Siliciano, R.F. (2005) Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 decay following entry into resting CD4+ T cells. *J Virol*, **79**, 2199-2210.
- Zhu, W.G., Srinivasan, K., Dai, Z., Duan, W., Druhan, L.J., Ding, H., Yee, L., Villalona-Calero, M.A., Plass, C. and Otterson, G.A. (2003a) Methylation of adjacent CpG sites affects Sp1/Sp3 binding and activity in the p21(Cip1) promoter. *Mol Cell Biol*, **23**, 4056-4065.
- Zhu, Y., Pe'ery, T., Peng, J., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., Amendt, B., Mathews, M.B. and Price, D.H. (1997) Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes Dev*, **11**, 2622-2632.
- Zhu, Y., Roshal, M., Li, F., Blackett, J. and Planelles, V. (2003b) Upregulation of survivin by HIV-1 Vpr. *Apoptosis*, **8**, 71-79.
- Zlatanova, J., Caiafa, P. and Van Holde, K. (2000) Linker histone binding and displacement: versatile mechanism for transcriptional regulation. *Faseb J*, **14**, 1697-1704.
- Zofall, M., Persinger, J., Kassabov, S.R. and Bartholomew, B. (2006) Chromatin remodeling by ISW2 and SWI/SNF requires DNA translocation inside the nucleosome. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 339-346.

Sites Internet

- www.snv.jussieu.fr
- [www.http://Institut.cochin.inserm.fr](http://Institut.cochin.inserm.fr)
- http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/GlobalReport/2006-GR_fr.asp
- <http://www.who.int/fr/>

CTIP2 : un facteur clé dans l'établissement de la latence transcriptionnelle post-intégrative du VIH-1

L'expression du VIH-1 est contrôlée par de multiples facteurs cellulaires et viraux. Dans un premier temps, j'ai mis en évidence l'effet répresseur sur la transcription virale du cofacteur cellulaire CTIP2 lors de la phase précoce de l'infection. J'ai également démontré l'association de CTIP2 avec un complexe enzymatique contenant HDAC1, HDAC2 et SUV39H1 afin d'induire un environnement hétérochromatinien autour du promoteur viral et un "silencing" des gènes viraux. CTIP2 induit donc une latence transcriptionnelle post-intégrative dans les cellules microgliales.

Dans la seconde partie de ma thèse, j'ai étudié l'influence de ce facteur répresseur de la transcription virale sur les fonctions de la protéine virale Vpr et plus particulièrement sur l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules infectées. L'expression du gène de p21 est augmentée lors de l'infection par le VIH-1 et permet le blocage en phase G2/M; CTIP2 contre-carre cet effet médié par Vpr et l'arrêt du cycle cellulaire qui en résulte. J'ai pu mettre en évidence le recrutement du même complexe enzymatique par CTIP2 sur le promoteur de p21 pour réprimer son expression que celui mis en évidence précédemment sur le promoteur viral.

L'ensemble de mes résultats tend à démontrer que CTIP2 est un répresseur constitutif de p21 et un inhibiteur potentiel des fonctions de Vpr. Les effets anti-VIH de CTIP2 ne se résument sans doute pas seulement à une répression de la transcription virale, mais il se peut que CTIP2 agisse à différents niveaux au cours de l'infection par le VIH-1 en ciblant à la fois les gènes viraux et cellulaires pour contribuer à la mise en place et au maintien de la latence.

Mots clés : VIH-1, Transcription, CTIP2, Chromatine, Vpr, Cycle cellulaire

CTIP2 : A key factor to induce and maintain the transcriptional post-integrative latency of HIV-1

HIV-1 expression is controlled by multiple cellular and viral factors. I first described that the cellular cofactor CTIP2 represses the HIV-1 replication in microglial cells at the first time of the infection. Then I demonstrated that CTIP2 associates with HDAC1, HDAC2 and SUV39H1 to favour heterochromatic environment close to the HIV-1 promoter and silence viral gene transcription. So, CTIP2 induces transcriptional post-Integrative latency in microglial cells.

In the second part of my thesis, I investigated the influence of this transcriptional repressor on HIV-1 Vpr function and specifically on induced cell cycle arrest in infected cells by this viral protein.

Indeed, p21 gene expression is enhanced upon HIV infection and contributes to G2/M phase blocking; CTIP2 impairs this Vpr-mediated effect and the subsequent cell cycle arrest. I further demonstrated that the first enzymatic complex we first identified on the HIV-1 promoter was recruited by CTIP2 on p21 promoter to repress its expression.

All together, my results suggest that CTIP2 is a constitutive repressor of the p21 gene promoter and thus, a potent inhibitor of HIV-1 Vpr function. I revealed that CTIP2-mediated anti-HIV activity is not restricted to HIV-1 gene transcriptional silencing but results from conjunctions of multiple repressive activities targeting the viral and the cellular genomes to induce and maintain the post-integrative latency.

Key words: HIV-1, Transcription, CTIP2, Chromatin, Vpr, Cell cycle