





NNT: 2016SACLE046

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY PREPAREE A "L'UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE, GENETHON/ UNITE INSERM UMR_S951 (INTEGRARE)"

ECOLE DOCTORALE N° 577 Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)

Spécialité de Science de la vie et de la Santé

Par

MAJDOUL Saliha

Etude et développement de nouveaux additifs peptidiques capables de promouvoir l'entrée des vecteurs lentiviraux de thérapie génique dans les cellules cibles

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 30 novembre 2016 à 14h30

Composition du Jury :

Pr. PEREA, JavierProfesseur des Universités, Université d'EvryDr, ESPERT, LucileChargée de Recherche, CNRS, CPBS, MontpellierDr, VERHOEYEN, ElsDirectrice de recherche, INSERM, ENS LyonDr, MERTEN, OttoResponsable d'équipe, GENETHON, EvryDr, KICHLER, AntoineDirecteur de recherche, CNRS, Université de StrasbourgDr, FENARD, DavidResponsable d'équipe, GENETHON, Evry

Président Rapporteur Rapporteur Examinateur Directeur de thèse

Je remercie les membres du jury pour le temps qu'ils ont consacré à ce travail. Je remercie le professeur Javier PEREA pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je remercie le Docteur Els VERHOEYEN et le Docteur Lucile ESPERT pour avoir accepté et pris le temps d'évaluer ce manuscrit, et de me faire part des commentaires. Je remercie également le Docteur Antoine KICHLER et le Docteur Otto MERTEN pour avoir accepté de faire partie des membres du jury de ma thèse.

Je tiens à remercier bien sincèrement le Docteur Anne GALY pour m'avoir accueillie au sein de son unité INSERM_UMR_S951 à Généthon et pour avoir fait tout son possible pour prolonger mon contrat afin que je puisse rester au sein de l'unité jusqu'à la fin de l'année. Je la remercie également pour son soutien et son écoute. J'ai particulièrement apprécié ton enthousiasme pour mon projet de thèse et que tu m'encourages à participer aux congrès internationaux. Sincèrement je te remercie énormément d'avoir fait en sorte que je participe au congrès ESGCT2016 et de m'avoir donné la chance de pouvoir rajouter trois mois après mon contrat doctoral.

Je remercie très chaleureusement le Docteur David FENARD pour m'avoir encadré durant ces trois années et demie. Je te remercie tout d'abord de ta confiance, tu as su voir en moi le potentiel nécessaire pour accomplir ce projet de thèse. Tu as été, durant ces années, un mentor idéal, tu as toujours su m'écouter, discuter et me pousser à m'améliorer. Je ne te remercierais jamais assez de la chance que tu m'as offerte de pouvoir publier et plus particulièrement d'obtenir un brevet d'invention. Un grand merci pour tes conseils, ta sagesse et ton enthousiasme face à nos résultats. Je te remercie également de m'avoir fait partager ton expérience afin de me rassurer sur mes projets de carrières après-thèse. Je suis consciente que sans toi ma thèse n'aurait pas pris cette hauteur. Nous avons formé un très bon duo et pour cela je ne cesserais de t'en remercier. Maintenant grâce à toi je suis prête à propre mon envol. Tout simplement MERCI David.

Je tiens à remercier la « Team Lenti ». Nathalie, Sophie et Khalil cela a été pour moi un réel plaisir d'être dans la même équipe que vous. Nathalie je te remercie pour tes conseils toujours très pédagogues et avisés, cela a réellement été un bonus d'avoir un regard universitaire sur mes travaux et plus particulièrement au niveau des présentations, ton aide a été crucial. Khalil, mon papa du labo. C'est toi qui m'as formé c'est toi qui m'a tout appris des productions lenti, les titrations... J'ai toujours eu confiance en ta grande expérience. Sans toi mon stage et ma thèse n'auraient pas eu le même gout. Ta présence paternelle et chaleureuse a

été pour moi d'un réel soutien. Je suis heureuse d'avoir pu te rencontrer avant ton départ en retraite et que tu aies attendu que je finisse avant de te décider à partir. Sophie, ma très chère collègue de bureau, ma copine de la « team Rose power ». Tu m'as initié au western Blot et à tout ce qui touche à la BM j'ai toujours admiré ton organisation et tes connaissances. Cela va énormément me manquer nos discussions quotidiennes, nos fous rires et nos confidences. Pour moi tu as été la meilleure compagne de bureau que je n'aurais pu imaginer avoir. Tu vas me manquer.

L'équipe IMBI, je tiens à tous vous remercier pour votre joie de vivre, votre enthousiasme et votre accueil. Mirella, Maxime, Sylvie, Roseline, Armelle et Edouard merci pour tous ces moments passés ensemble, les goûters IMBI pour le téléthon où l'on se déguisait et les temps après le repas à passer à faire les mots fléchés. Catherine, ma collègue de bureau, Madame Sapin de Noel, je te remercie pour toutes les discussions et confidences que l'on a eues, ton soutien et les moments où l'on a bien rigolé. Sans toi notre bureau semble bien vide. J'espère que tu seras présente à ma soutenance.

Jérôme et Jeremy, le batman et robin des western blot ! Je vous remercie pour le temps et la patience que vous m'avez accordés quand je bloquais totalement sur mon western blot. J'étais totalement impressionnée par votre expertise et apprendre à vos côtés a été une grande chance et une bonne partie de rigolade (mais je continuerais à tracer des traits à la règle pour couper ma membrane !). Merci à Peggy pour ta patience et ta super pédagogie pour me former à la cytométrie. Tu es réellement une experte et tes conseils ont toujours été très utiles. Merci pour ta sympathie.

Céline, Jeremy, Guillaume, Alice et Julie, le groupe autrement dit de la cantine. Merci pour tous ces moments ensemble. Avec vous le temps du repas était le moment que j'attendais avec impatience je savais que c'était un pur moment de détente, de discussion et surtout de bonne rigolade. Merci à Céline pour l'organisation des petits afterworks que l'on se faisait tous ensemble et pour ton aide pour les mots fléchés de niveau 4 hahaha.

Jérémie, Julie et Alice. Olala que dire... Vous êtes mes plus proches collègues que j'ai ici au labo au point de devenir de réels amis pour moi. Je suis heureuse que l'on ait pu créer une vraie amitié. Jérémie, tu es comme mon grand frère du labo, je savais que je pouvais compter sur toi, juste te voir je savais que tu allais me sortir une vanne et qu'on allait rigoler. Merci pour ton aide pour l'imagerie, tu es un pur expert toujours plein de connaissances à m'apprendre des choses dont je ne connaissais même pas l'existence. Merci à toi de m'avoir

si souvent déposé en voiture tu m'as sauvé la vie, même si tu m'engueulais toujours pour avoir mis du parfum (sorry). Alice, ma petite sœur du labo, la petite princesse de la « team Rose power ». Je t'ai vu arrivé au labo en tant que bébé chercheur et je t'ai vu grandir. Je suis fière de toi et je suis fière que l'on soit devenue amie. J'ai aimé savoir que tu étais juste au bureau à côté que l'on pouvait tout se dire et tout se confier. Julie, ma sœur (et oui toi aussi vous êtes deux hihihi) du labo. Je n'oublierais jamais le jour où je t'ai accompagné acheter Torpille j'ai été heureuse de pouvoir partager ce moment avec toi cela a été un privilège que tu m'aies choisi pour être à tes côtés. J'aimais nos petites pauses à discuter, se confier et se soutenir. Merci pour ton aide pour les manips souris, tu m'as sauvé la vie. Tu es toujours très serviable et adorable et ce sont des qualités que j'ai toujours admiré et aimé chez toi. Je suis fière que l'on soit devenu amies. Il faut que tu viennes aux US pour le concert de Game of Thrones j'espère que tu n'as pas oublié hein. A nous trois les filles, on a été le groupe de copines thésardes et sans vous les 3 années thèse n'auraient sincèrement pas été pareilles. Le congrès à Washington c'était le meilleur congrès de ma vie j'étais avec vous mes copines, on a fait les magasins on a rigolé et surtout on a toujours été là les unes pour les autres. Je vous promets que je ferais tout mon possible pour assister à votre soutenance de thèse et vous avez intérêt à venir me voir aux US. Vous allez énoooormément me manquer... Au moins, on a notre conversation de groupe sur Whatsapp. Vous allez me manquer.

Mes parents. Papa, Maman, vous représentez tout pour moi. Sans vous, votre soutien et votre amour je ne serais jamais parvenu à accomplir tout ceci aujourd'hui. Vous êtes mes piliers, mon énergie et ma vie. Mon but dans la vie a toujours été de vous rendre fiers. Je vous dédie à vous mes chers parents ce diplôme de Docteur vous le méritez mille fois et je ne cesserais jamais de vous remercier pour tous les sacrifices que vous avez dû faire pour que je puisse en arriver là aujourd'hui. Je vous aime.

Ma famille. Nissrine, Nadia et Issam. Mes sœurs et mon petit frère, merci d'être ma famille, merci d'être présents pour moi merci d'avoir toujours cru en moi. J'espère vous rendre fiers de votre grande sœur et être un exemple pour vous. Je vous aime. Marion, ma chère colloc, ma sœur de cœur. Merci de m'avoir soutenue et surtout supportée quand j'étais dans mes états de stress et fatigue à la fin de ma thèse. Tu as toujours su avec ta joie de vivre et ton brin de folie m'apaiser. Tu es une vraie amie.

LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES ABBREVIATIONS	7
INTRODUCTION	9

CHAPITRE 1 : La th¶rapie g¶nique et les vecteurs lentiviraux

I- Th¶rapie g¶nique et maladies du sang	13
I-A/ Principe de la th¶rapie g¶nique	13
I-B/ Les vecteurs de th¶rapie g¶nique	14
I-C/ Les cellules souches h¶matopo¾¶tiques humaines (CSHs)	16
I-C-1) Définition des CSHs	16
I-C-2) Différenciation des CSHs en différentes lignées hématopoïétiques	17
I-C-3) Tests d'étude de la différenciation des CSHs	18
I-D/ Approches de th¶rapie g¶nique vivo et approchesex vivo	21
I-E/ Essais cliniques de th¶rapie g¶nique vivo pour des maladies	
h¶matopo¾¶tiques	23
II- Les Vecteurs lentiviraux d¶riv¶s du VIH-1	27
II-A/ Le virus de l'immunod¶ficience humaine de type 1	27
II-A-1) Génome et protéines virales du VIH-1	28
II-A-2) Structure de la particule virale VIH-1 mature	31
II-A-3) Cycle réplicatif	32
II-B/ Historique des vecteurs lentiviraux d¶riv¶s du VIH-1	33
II-B-1) Des Lentivirus aux vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1	33
II-B-2) Vecteurs lentiviraux de 1 ^{ère} génération	33
II-B-3) Vecteurs lentiviraux de 2^{nd} génération	35
II-B-4) Vecteurs lentiviraux SIN (Self-Inactivating) : mesure de biosécurité	35
II-B-5) Vecteurs lentiviraux de 3 ^{ème} génération	37
II-C/ Strat¶gie de pseudotypage des particules lentivirales	38
II-C-1) Principe du pseudotypage	38
II-C-2) VSV-G : Glycoprotéine d'enveloppe à tropisme large	39
II-C-3) Les glycoprotéines d'enveloppe virale à tropisme spécifique	39
II-D/ Syst-me de production et titration des vecteurs lentiviraux	41
II-D-1) Production de vecteurs lentiviraux de 3 ^{ème} génération	41
II-D-2) Titration des vecteurs lentiviraux	42

1

CHAPITRE 2 : L'utilisation d'additifs de culture pour promouvoir la transduction lentivirale

I/ Les polym·res	47
II/ Les lipides cationiques	48
III/ Divers peptides et prot¶ines cationiques	48
III-A/ La Protamine Sulfate	48
III-B/ SEVI et S¶m¶nog¶lines	49
III-C/ Les peptides d¶riv¶s de la gp120 du VIH-1	49
III-D/ Les peptides d¶riv¶s de la gp41 du VIH-1	49
III-E/ D¶riv¶s de la fibronectine humaine : La R¶tronectin÷	50
IV/ Decouverte des Vectofusin÷, des peptides d¶riv¶s du prototype	LAH4
	50
IV -A/ Historique des peptides de la famille LAH4	50
IV -B/ Le peptide LAH4-L1	51

IV-C/ Identification du peptide LAH4-A4 (Vectofusin-1)

CHAPITRE 3 : Influence de l'autophagie sur la transduction lentivirale

52

I/Autophagie	
I-A/ Diff¶rents types dĭautophagie	57
I-B/ M¶canismes mol¶culaire de l`autophagie	59
I-B-1)/Initiation de l'autophagie	59
I-B-2) Régulation de l'autophagie	60
I-C/ Autophagie et cellules souches h¶matopo¾¶tiques	62
I-D/ Autophagie et virus	63
I-D-1) Rôle antiviral de l'autophagie	63
I-D-2) Rôles proviral de l'autophagie	66
I-D-3) Cas particulier du VIH-1 : stratégie d'adaptation à l'autophagie	67

2

II- Découverte de Tat-Beclin1, un peptide antiviral inducteur d'autop	hagie
	69
II-A/ Beclin-1, un acteur crucial dans la biologie des membranes	69
II-B/ Tat-Beclin 1, peptide inducteur d'autophagie	70
RESULTATS	74
ARTICLE 1: Etude des effets des additifs de culture sur la fusion et la transduction	
lentivirale de cellules hématopoïétiques à l'aide de l'essai "BLAM-LV"	78
ARTICLE 2: Etude structure/fonction des Vectofusins, une nouvelle famille d'addit transduction lentivirale	ifs de 82
Définition de Tat-Beclin1 comme un nouvel additif capable de promouvoir la transdu lentivirale	iction 84
DISCUSSION PERSPECTIVES	104
ANNEXES	116
ARTICLE 3: The transduction enhancing peptide Vectofusin-1 forms pH-depender	nt a-
helical coiled-coil nanofibrils trapping viral particles	118
ARTICLE 4 : Influence of mildly acidic pH conditions on the production of lentivira retroviral vectors	l and 120
BIBLIOGRAPHIE	122

(4 **)**

LISTE DES FIGURES

Figure1 : Indication des essais clinique de thérapie génique

Figure2 : Indication des vecteurs utilisés dans les essais clinique de thérapie génique.

Figure 3 : Hématopoïèse des CSHs

Figure 4 : Test in vitro de clonogénicité et colonies obtenues

Figure 5: Représentation schématique du protocole de greffe de CSHs humaines dans les souris immunodéficientes NSG

Figure 6 : Concept de la thérapie génique in vivo et ex vivo

Figure 7 : Chronologie de la thérapie génique sur CSHs

Figure 8 : Représentation de l'organisation génomique du VIH-1

Figure 9 : Représentation schématique de la structure du virion VIH-1

Figure 10: Représentation schématique du cycle réplicatif du VIH-1

Figure 11: Evolution des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1

Figure 12: Représentation schématique du génome des vecteurs lentiviraux SIN

Figure 13: Représentation en hélice de Schiffer-Edmunson du peptide LAH4-L1 (de la position 6 à 23).

Figure 14 : La Vectofusin-1, un additif améliorant la transduction lentivirale de CSPHs humaines CD34+.

Figure 15: Représentation schématique de la macroautophagie

Figure 16: Rôles antiviraux de l'autophagie

Figure 17: Résumé des interactions entre l'autophagie et le VIH-1 en fonction des cellules cibles

Figure 18: Complexe Pi3K de classe III

Figure 19: Représentation schématique de la protéine Beclin-1 et ses domaines

Figure 20: Représentation schématique du peptide Tat-Beclin1 et de sa séquence primaire.

Figure 21: Tat-Beclin1 augmente la transduction de lignées cellulaire avec divers pseudotypes lentiviraux

Figure 22: Tat-Beclin1 augmente la transduction lentivirale des CSPHs hCD34+

Figure 23 : Analyse en cytométrie en flux des niveaux de greffe dans la rate

5

Figure 24 : Evaluation de l'efficacité de greffe de cellules hCD34+, transduites en présence de Tat-Beclin1, dans le modèle murin immunodéficient NSG

Figure 25: Tat-Beclin1 favorise l'adhésion et la fusion des particules lentivirales avec les cellules cibles

Figure 26: Tat-Beclin1 n'induit pas de modification d'expression des récepteurs rétroviraux

Figure 27: Suivie des différents stades de l'autophagie avec une construction LC3 chimérique fusionnée à deux protéines fluorescentes

Figure 28 : Tat-Beclin1 n'induit pas d'autophagie sur lignée cellulaire à la dose optimale favorisant la transduction lentivirale

Figure 29: Interaction des partenaires Atg14L et UVRAG avec Beclin-1 au sein du complexe Pi3k de classe III

LISTE DES ABBREVIATIONS

AAV	: Adeno-associated virus		
ADA	: Adénosine désaminase		
ADN	: Acide désoxyribonucléique		
ALD	: Adrénoleucodystrophie		
AMBRA	: Activating molecule in Beclin1 regulating autophagy		
ARN	: Acide ribonucléique		
ATG	: Protéines autophagiques		
atg	: Gènes autophagiques		
BARKOR	: Beclin1 -associated autophagy related key regulator		
Bcl-2	: Anti-apoptotic B-cell lymphoma protein		
Beclin	: Bcl-2 interacting myosin-like coiled-coil protein		
BH-3	: Bcl-1 homology domain		
BIF-1	: Bax-interacting factor 1		
BLAM	: Beta-lactamase		
CA	: Capside		
CAP	: Cystein-rich secretory, Antigen 5, Pathogenesis protein 1		
CCD	: Coiled-coil domain		
CFC	: Colony forming cell		
CGD	: Granulomatose septique chronique		
CHIKV	: Virus Chikungunya		
CLP	: Progeniteur commun myéloïde		
СМН	: Complexe majeur d'histocompatibilité		
CMV	: Cytomégalovirus		
CSH	: Cellule souche hématopoïétique		
CSPH	: Cellule souche/progéniteur hématopoïétique		
DC	: Cellule dendritique		
DIS	: Dimer initiation signal		
ECD	: Evolutionary conserved domain		
EF-C	: Enhancing factor C		
env	: Enveloppe		
gag	: Groupe antigène		
GAPR-1	: Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1		
GASP1	: G-protein coupled receptor associated sorting protein 1		
GLIPR-2	: Glioma pathogenesis-related protein 2		
GMP	: Progéniteur bivalent granulocyte/érythroïde		
γ–Ρς	: Gamma-rétrovirus		
HCT	: Human colorectal carcinoma		
HEK	: Human embryonic kidney		
HSV	: Virus de l'herpes simplex		
IDP	: Immunodéficience primaire		
IN	: Intégrase		
LC3	: Microtubule-associated protein light chain 3		
LTR	: Long terminal repeat		

- 7

LV :	Vecteur lentiviral	
MA :	Matrice	
MEP :	: Progéniteur mégacaryocyte/érythroïde	
MLV :	: Virus leucémogène murin	
MPP :	: Progéniteur multipotent	
mTor :	: Mammalian target of rapamycin	
NAPDH :	: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	
NC :	Nucléocapside	
NGFR :	Nerve growth factor receptor	
NK :	Natural killer cells	
NOD :	Non obèse diabétique	
NSG :	NOD-SCID-gcnull	
PBS :	Primer binding site	
Pi3P :	Phosphatidylinositol-3-phosphate	
pol :	Polymérase	
PR :	: Protéase	
RBD :	: Receptor binding domain	
ROS :	: Reactive oxygen species	
RRE :	: Rev responsive element	
RT :	Reverse transcriptase	
:	RUN-domain cystein rich domain containing Beclin1	
RUBICON	nteracting protein	
SCID :	Déficit immunitaire combiné sévère	
SEVI :	Semen-derived enhancer of viral infection	
SIDA :	Syndrome d'immunodéficience acquise	
SIN :	Self-inactivating	
SINV :	Virus Sindbis	
SIV :	Virus de l'immunodéficience simienne	
SU :	Surface glycoprotein	
TAR :	: Région de trans-activation	
TLR :	: Toll-like receptor	
TM :	: Transmembranaire protéine	
ULK :	: UNC-21-like kinase	
UVRAG :	: UV-irradiation resistance-associated gene	
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine	
VSV :	Virus de la stomatite vésiculeuse	
WAS		
WAS .	Syndrome de Wiskott-Aldrich	

INTRODUCTION

_____ 10]_____

CHAPITRE 1

La thérapie génique et les vecteurs lentiviraux

_____ **[** 12 **]**_____

I- Th¶rapie g¶nique et maladies du sang

I-A / Principe de la th¶rapie g¶nique

Le concept de la thérapie génique est apparu dans les années 1960 suite au développement des lignées cellulaires et des techniques de modifications d'ADN. Ces techniques ont permis de tester et montrer que l'introduction d'un ADN étranger dans une cellule peut se faire de façon stable et fonctionnelle. Dans les années 1970, des virus ont été modifiés génétiquement pour la première fois, afin de transporter une séquence d'ADN thérapeutique au sein de la cellule cible de façon à obtenir un transfert de gène efficace et stable (Friedmann, 1992; Rogers and Pfuderer, 1968; Wirth et al., 2013).

La législation française et européenne catégorise les médicaments de thérapie génique en tant que médicaments de thérapie innovante (MTI). L'Agence Européenne de Médecine (EMA) définit le produit clinique de thérapie génique dans la directive 2001/83/CE du parlement européen dans l'annexe I.

« Par médicament de thérapie génique, on entend un médicament biologique qui a les caractéristiques suivantes : (a) il contient une substance active qui contient ou constitue un acide nucléique recombinant administré à des personnes en vue de réguler, de remplacer, d'ajouter ou de supprimer une séquence génétique ; (b) son effet thérapeutique, prophylactique ou diagnostique dépend directement de la séquence d'acide nucléique recombinant qu'il contient ou au produit de l'expression génétique de cette séquence.

Les vaccins contre les maladies infectieuses ne sont pas compris dans les « médicaments de thérapie génique. »

La thérapie génique apparaît être un ensemble d'approches thérapeutiques efficace et stable au cours du temps pour bon nombre de pathologies héréditaires.



Initialement, la thérapie génique fut développée afin d'apporter ou remplacer un gène manquant dans les cas de maladies rares monogéniques. Depuis, le domaine s'est rapidement élargi aux maladies telles que le cancer (64.4% d'essais cliniques), aux maladies infectieuses ou encore cardiovasculaires (Figure 1).

I-B/ Les vecteurs de th¶rapie g¶nique

Il existe diverses méthodes de transfert de médicament de thérapie génique dans les cellules de mammifères : (a) les approches non-virales utilisant des complexes d'ADN ou de l'ADN nu couplés à des particules physiques, naturelles ou organiques ; (b) et les approches virales utilisant des virus modifiés génétiquement. On parle plus généralement de vecteurs non-viraux ou vecteurs viraux lorsque l'on aborde l'une de ces stratégies de transfert de gène (Roemer and Friedmann, 1992).

La fonction d'un vecteur est de délivrer le gène thérapeutique aux cellules de patient. Le vecteur est par définition un moyen de transport pour le gène souhaité.

Plusieurs systèmes de transfert de gène non viraux ont été développés et offrent ainsi un large panel d'outils pour les applications de thérapie génique **(Tableau 1).**

Méthodes	Mécanisme	Avantages	Inconvénients
ADN nu	endocytose	Simple Sécurité	Basse efficacité de transfection
Gene Gun	Haute pression de flux d'hélium	Flexibilité, Basse cytotoxicité Bonne efficacité	Faible pénétration
Electroporation	Augmentation de la perméabilité membranaire	Bonne efficacité Bonne répétabilité	Lésions tissulaire
Magnetofection	Pinocytose et endocytose	Flexibilité, Basse cytotoxicité	Transfection transitoire
Molecules inorganiques	Endocytose	Production simple, Stabilité au stockage	Basse efficacité
Lipoplexes	Endocytose Condensation de l'ADN	Sécurité, Basse cytotoxicité	Basse à moyenne efficacité Immunogénicité
Polyoplexes et Dendrimers	Endocytose Condensation de l'ADN	Basse immunogénicité, Efficicatié	Activation du complément, Basse efficacité, Cytotoxique





On remarque que les vecteurs non-viraux sont peu représentés dans les essais cliniques. Leur efficacité est toujours moins performante en comparaison des vecteurs viraux. En effet, la plupart des approches non virales fournissent seulement une expression temporaire de gène épisomal. Comme le montre la **figure 2** les vecteurs viraux sont très largement utilisés dans les essais cliniques de thérapie génique. Les virus représentent des systèmes naturels efficaces de transfert d'acides nucléiques au sein de cellules hôtes. De ce fait, il a été développé des virus recombinants adeno-associés (rAAV) ou encore des lentivirus recombinants, entre autres, pour les stratégies de thérapie génique. Ces deux types de vecteurs viraux se distinguent par leurs propriétés, particulièrement bien adaptées aux besoins thérapeutiques

(e.g., expression génique transitoire/stable, ciblage tissulaire/cellulaire...). Les rAAV sont des vecteurs très petits (20nm) et non-inflammatoires qui n'intègrent pas leur génome dans le génome de la cellule cible . De ce fait, leur utilisation peut s'appliquer aux tissus postmitotiques. Concernant les cellules qui prolifèrent comme dans le système hématopoïétique, les vecteurs viraux intégratifs tels que les rétrovirus ou les lentivirus sont plus adaptés et plus utilisés pour ce type d'application de thérapie génique.

I-C/ Les cellules souches h¶matopo¾¶tiques humaines (CSHs)

Deux types de stratégies ont été développé pour la thérapie génique à l'aide de vecteur viraux : Soit in vivo, en délivrant le vecteur directement dans l'organisme ; soit ex vivo, en délivrant le vecteur à des cellules en culture comme les CSHs pour les modifier génétiquement avant de les injecter dans l'organisme, une fois celles-ci corrigées.

I-C-1) Définition des CSHs

Les CSHs sont des cellules souches définies par leur capacité à s'auto-renouveler et à se différencier en différents types de cellules du sang avec une fonction biologique attitrée (e.g., contrôle de l'homéostasie, fonction immunitaire, réponse inflammatoire). Ces cellules hématopoïétiques différenciées appartiennent soit à la lignée myéloïde, soit à la lignée lymphoïde, et ceci de façon à répondre aux besoins physiologiques de l'organisme. La plupart des CSHs sont quiescentes, au sein de leur niche (la moelle osseuse (Xie et al., 2009)), ce qui permet à l'organisme de maintenir un ensemble de CSHs capables de répondre à divers stimuli en cas de nécessité. L'hématopoïèse est régulée par un microenvironnement hématopoïétique complexe de cellules endothéliales, de fibroblastes, de macrophages et de protéines de la matrice extracellulaire (Pouzolles et al., 2016; Yoder and Williams, 1995).

Historiquement, les CSHs sont les cellules souches adultes les plus caractérisées et le système hématopoïétique a particulièrement servi de modèle pour la biologie des cellules souches pendant plusieurs décennies (Eckfeldt et al., 2005). Les CSHs sont l'outil idéal pour les stratégies de greffes autologues et allogéniques, les thérapies de régénération de tissus et le transfert de gène. Depuis les années 1950 et 1960, les transplantations de moelle osseuse, sous forme intraveineuse, ont été utilisées pour traiter les patients atteints de leucémie, d'aplasie médullaire et d'immunodéficience congénitale (Gatti et al., 1968; Thomas et al., 1957). La moelle osseuse, le sang mobilisé périphérique, le foie fœtal et le sang de cordon offrent diverses sources de CSHs.

I-C-2) Différenciation des CSHs en différentes lignées hématopoïétiques

Toutes les cellules sanguines dans le système hématopoïétique proviennent des CSHs (Figure 3). Comme dit précédemment, il y a une partie des cellules qui reste en auto-renouvellement, et une autre partie qui se différencie en progéniteurs multipotents (MPP). Ces derniers réduisent leur capacité d'auto-renouvellement avant que la détermination et la différenciation en lignée ne soit initiée. A partir des MPPs, la lignée commune pour la myélopoïèse (progéniteur commun myéloïde CMP) et la lignée commune pour la lymphopoïèse (progéniteur commun lymphoïde CLP) sont séparées (Akashi et al., 2000). Dans la différenciation myéloïde (définie par les granulocytes/monocytes), les progéniteurs communs CMPs deviennent les progéniteurs bivalent granulocyte-érythroïde (GMPs), les progéniteurs mégacaryocytes-érythroïdes(MEP) et les progéniteurs de cellules dendritiques (DC). Quant à la différenciation lymphoïde, les progéniteurs CLPs se différencient en progéniteurs de cellules T, de cellules B, de cellules NK et de cellules dendritiques (Chotinantakul and Leeanansaksiri, 2012) **(voir figure 3)**.



I-C-3) Tests d'étude de la différenciation des CSHs

Les CSHs sont très rares et très difficiles à caractériser, ce qui limite considérablement leur étude d'un point de vue fondamental et leur utilisation d'un point de vue clinique. A l'heure actuelle, il est impossible d'isoler une population de CSHs pure vu qu'aucun marqueur spécifique n'a encore été identifié. A l'aide de combinaisons de divers marqueurs de surface (marqueurs pan-hématopoïétiques hCD45+, hCD38-, hCD45RA- (Notta et al., 2011)), certaines populations de cellules enrichies en CSHs peuvent être isolées et ainsi leurs capacités hématopoïétiques peuvent être évaluées grâce à des tests in vitro et in vivo. Ce sont les cellules souches/progénitrices hématopoïétiques (CSPHs).

Test In vitro: test clonogénique ou Colony Forming cell (CFC) assay

Le test clonogénique est un test utilisé in vitro chez la souris comme chez l'homme pour évaluer la qualité de CSPHs au sein d'une population CD34+ donnée. Les différentes colonies hématopoïétiques observables (ensemble de cellules issues d'une même cellule souche) par ce test sont caractéristiques, pour chacune d'entre elles, d'un progéniteur/précurseur hématopoïétique donné. Il consiste à cultiver la population d'étude dans un milieu semi-solide de méthylcellulose complémenté avec des cytokines recombinantes pour induire une différenciation cellulaire. Après 2 semaines de culture, il est possible de visualiser des colonies hématopoïétiques distinctes (figure 4) :

- La BFU-E ou Burst Forming Unit-Erythroid (la plus grosse en taille et la plus immature que la CFU-E ou colony forming unit-erythroid visible qu'entre le deuxième et troisième jour de culture),
- la CFU-Mk pour mégacaryocyte,
- la CFU-G pour granulocyte,
- la CFU-M pour monocyte/macrophage.

Des colonies issues de cellules clonogéniques myéloïdes bipotentes peuvent être observées telles que CFU-GM et BFU-E/Mk. La plus immature des CFC, observable au bout de 10 jours de culture, est la CFU-GEMM qui contient à la fois les composantes granulocytaire, érythrocytaire, macrophagique et mégacaryocytaire. D'autre part, l'addition de cytokine IL-7 à une méthylcellulose permet d'observer les colonies pré-CFU-B pour les lymphocytes B. En revanche, les CFC représentatives des lymphocytes T ne sont pas observables avec ce test (Pereira et al., 2007; Sarma et al., 2010).



Test In vivo : Détermination de la capacité de reconstitution hématopoïétique à long terme de CSPHs transduites

Malgré les avantages liés au test clonogénique in vitro, permettant d'évaluer la différenciation et la prolifération des cellules souches testées indépendamment de leur capacité d'autorenouvèlement, la méthode in vivo reste une norme afin de tester les propriétés des cellules souches. Le seul test permettant de prouver la présence des CSHs dans une population donnée est le test de reconstitution hématopoïétique à long terme consistant à injecter la population d'étude dans un organisme receveur conditionné par irradiation ou chimiothérapie (Busulfan) de manière sublétale. Le conditionnement va détruire le système immunitaire non fonctionnel de l'organisme hôte, libérant ainsi de la place dans la moelle osseuse, de manière à greffer efficacement la population de CSPHs humaines étudiées.

Au fil des années, de nombreux modèles ont été mis au point pour étudier les propriétés des CSPHs humaines, comme les souris NOD « non obèse diabétique » (Kataoka et al., 1983), les souris SCID « déficit immunitaire combiné sévère » (McCune et al., 1988), les fœtus de moutons (Srour et al., 1992; Zanjani et al., 1996), les souris NOD-SCID (Shultz et al., 1995) et enfin les souris NOD-SCID- γc^{null} , appelées aussi NSG, qui sont des souris NOD-SCID avec une délétion sur la chaîne gamma du récepteur à l'IL-2 (Ito et al., 2002).

L'utilisation de souris immunodéficientes est plus adaptée pour l'étude des CSHs humaines. Les CSPHs humaines CD34+ sont capables de greffer plus ou moins efficacement selon le modèle murin et son degré d'immunodéficience. Pour les souris NOD, leur immunodéficience se caractérise majoritairement par un défaut d'activité des cellules NK (Natural Killer). Concernant les souris SCID, celles-ci sont homozygotes pour la mutation scid, et ainsi présentent une absence totale de lymphocytes B et T. Dorénavant des modèles de souris encore plus immunodéficients ont été développés tels que le modèle NOD-SCID qui présente une forte capacité de greffe des CSPHs humaines grâce à la déficience accrue des fonctions des cellules NK, des fonctions des macrophages et des lymphocytes B et T (Prochazka et al., 1992). En revanche, ce modèle murin ne permet pas une bonne reconstitution du système immunitaire humain au niveau des lignées lymphocytaires T et les cellules NK murines continuent d'avoir une activité qui conduit à des rejets de greffe (Meyerrose et al., 2003). Par conséquent, au cours de ces dernières années, ont été développé les souris NSG, des souris NOD-SCID avec la délétion de la chaîne gamma du récepteur à l'IL-2, un modèle murin permettant d'améliorer fortement les taux de reconstitution hématopoïétique par rapport aux précédents modèles. Il s'agit de souris ayant une absence totale de lignées murines lymphocytaires B, T et NK. Il a été montré que les souris femelle NSG ont un avantage notable pour la reconstitution hématopoïétique dans le cas d'injection d'un nombre faible de CSPHs humaines (Frecha et al., 2011).

Pour résumer, les nouveaux modèles de souris immunodéficientes sont des outils prometteurs pour le développement de modèles humanisés. Les souris NSG offrent de larges possibilités pour l'étude des propriétés des cellules souches au sein d'une population de progéniteurs hématopoïétiques.

Le protocole de greffe des souris NSG est présenté sur la figure 5. Des souris NSG de 3 à 4 semaines sont conditionnées au Busulfan par voie intra-péritonéale, à raison de 50mg/kg,

répartis en 2 doses de 25mg/kg, espacées de 12h à 15h. Les CSPHs humaines CD34+ issues de sang de cordon sont injectées par voie intraveineuse dans la souris, 24h après la dernière dose de Busulfan. 12 semaines post-injection, le niveau de greffe et la caractérisation de la reconstitution hématopoïétique sont évalués sur différents organes (la moelle osseuse, la rate, le thymus et le sang périphérique) par marquage des cellules avec des anticorps spécifiques de différents marqueurs de surface humains (hCD45 (marqueur pan-tropique), hCD3, hCD4, hCD8 (pour les cellules T), hCD19 (pour les cellules B), hCD14 (Monocytes), etc...) et analyse par cytométrie en flux.



I-D/ Approches de th¶rapie g¶nique vivo et approchesex vivo

Deux types d'approches de thérapie génique existent afin d'apporter l'information génétique dans l'organisme (figure 6) (Kaufmann et al., 2013) :

<u>L'administration in vivo</u> consiste à injecter le vecteur directement dans le patient (i.e. voie intraveineuse, sous-cutanée, intra-cérébrale ou intramusculaire). Ceci peut être réalisé par une injection systémique du vecteur porteur de l'information génétique, ou par administration plus directe dans un organe comme le foie, les reins, les poumons (aérosols), l'œil, le cœur, le muscle ou le système nerveux central. Chaque pathologie ciblée nécessite l'utilisation d'une technique appropriée d'injection du vecteur, mais quasiment toutes exposent à un risque de dissémination de celui-ci en dehors de l'organe cible, et donc à la survenue d'effets secondaires (i.e. toxicité due à l'expression ectopique du transgène, réponse immunitaire). Les études sur les vecteurs tentent donc d'améliorer le ciblage et l'efficacité de ces approches in vivo.

<u>L'administration ex vivo</u> consiste à modifier génétiquement les cellules cibles en dehors de l'organisme où elles seront ensuite réimplantées. Celle-ci se déroule en trois étapes majeures :

- Prélèvement des cellules du patient,
- Transduction in vitro des cellules prélevées,
- Réinjection chez le sujet des cellules génétiquement modifiées

Cette approche permet de favoriser le ciblage de la thérapie génique uniquement vers les cellules d'intérêt ou le tissu à corriger en évitant des foyers ectopiques d'expression du transgène. Elle diminue le risque de réaction du système immunitaire contre le vecteur car celui-ci n'est pas en contact direct avec l'organisme (Naldini et al., 1996; Nayerossadat et al., 2012). Des études ont montrées que les LVs pseudotypés avec la glycoprotéine VSV-G sont inactivés par le complément présent dans le sérum humain et peut être cytotoxique à forte concentration (DePolo et al., 2000). Tout ceci limitant son utilisation in vivo.



I-E / Essais cliniques de th¶rapie g¶niques vivo pour des maladies h¶matopo¾¶tiques

Le transfert de gène ex vivo de CSPHs autologues, chez des patients atteints de déficiences immunitaires, apparait comme une nouvelle approche thérapeutique pour les patients n'ayant pas de donneur compatible pour la greffe de moelle. Les immunodéficiences primaires (IDP) sont une cible particulière. Elles représentent l'ensemble des maladies rares héréditaires du système immunitaire. Celle-ci altère le développement et/ou les fonctions de différentes cellules du système immunitaire prédisposant ainsi les patients aux infections, allergies, auto-immunités et cancers (Fischer, 2004; Picard et al., 2015).

Un défaut génétique peut toucher le système hématopoïétique à différentes étapes de l'hématopoïèse et ainsi entrainer une IDP (Ghosh et al., 2015).

Lorsque cette altération a lieu au niveau des étapes très précoces de l'hématopoïèse cela peut entraîner des immunodéficiences combinées sévères (SCID). Après des années de recherche, l'amélioration des vecteurs de thérapie génique a conduit à la mise en place d'essais cliniques de deux formes courantes de SCID : « ADA-SCID », un déficit en adénosine désaminase et « SCID-X1 » une forme SCID liée au chromosome X, avec déficience en chaîne gamma C commune à plusieurs récepteurs aux interleukines (Aiuti et al., 2009; Cavazzana-Calvo et al., 2000; Touzot et al., 2014).

Concernant d'autres IDP qui altèrent l'hématopoïèse à des stades plus tardifs, on trouve le syndrome de Wiskott-Aldrich (déficience en protéine WASP) et la granulomatose septique chronique (déficience en NADPH oxydase) (Charrier et al., 2007; Charrier et al., 2005; Galy et al., 2008; Galy and Thrasher, 2011; Hacein-Bey Abina et al., 2015). Le laboratoire Généthon est promoteur d'essais cliniques multicentriques de phase I/II pour ces deux syndromes. Le syndrome de Wiskott-Aldrich est une maladie d'immunodéficience primaire rare lié à l'X dû à la mutation du gène WAS. Celle-ci est caractérisée par une microthrombocytopénie, des infections récurrentes, de l'eczéma et de l'auto-immunité (Thrasher and Burns, 2010). La fonctionnalité des cellules immunitaires est altérée dû au défaut de la protéine hématopoïétique WASP qui est un régulateur d'actine. Le premier essai clinique a été réalisé avec un vecteur gamma-retroviral pseudotypé avec la glycoprotéine GALV (Boztug et al., 2010). Cette thérapie a apporté des améliorations notables aux niveaux des symptômes WAS mais celle-ci a été associée à un haut risque de mutagenèse insertionnelle et donc à l'activation de proto-oncogènes, qui ont conduit à des leucémies chez

7 patients sur 9 traités (Braun et al., 2014). Il a été développé par la suite des vecteurs lentiviraux de 3^{ème} génération dits « Self Inactivating » (SIN) pour la correction du gène WAS. Les études précliniques ont montré l'efficacité et la sécurité du transfert de gène ex vivo dans les CSHs autologues avec ce vecteur lentiviral (Charrier et al., 2007; Marangoni et al., 2009). Ceci a permis d'initier des études cliniques dont les premiers résultats sont maintenant publiés (Aiuti et al., 2013; Hacein-Bey Abina et al., 2015). Trois enfants, avec une forme modérée de la pathologie, ont été traités ; ils présentent une bonne greffe des cellules corrigées et une amélioration des fonctions immunes, nombre de plaquettes et score clinique (Aiuti et al., 2013). Les essais cliniques à l'heure d'aujourd'hui sont encore en cours afin de tenter de traiter également les patients atteints de la forme sévère du syndrome (Hacein-Bey Abina et al., 2015).

La granulomatose septique chronique « CGD » est une maladie non héréditaire myéloïde causée par des mutations dans le gène du cytochrome b (558) «CYBB» localisé sur le chromosome X, qui code pour la protéine gp91^{phox} qui fait partie du complexe nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxidase (NAPDH-oxidase). Cette mutation se traduit par l'incapacité des phagocytes matures à dégrader les micro-organismes tels que les bactéries et les champignons. Ceci conduit au niveau phénotypique à des granulomes sévères et létaux ainsi que la formation d'abcès accompagnés d'hyper-inflammation (Roos, 1994). Les trois premiers essais cliniques pour CGD ont été initiés dans les années 1990, sur dix patients sans chimiothérapie. Mais l'absence de greffe des cellules corrigées n'ont pas permis d'obtenir des résultats concluants (Malech, 1999; Malech et al., 1997). Les essais cliniques suivants ont mis en jeu des vecteurs gamma-retroviraux et une chimiothérapie modérée des patients. Sur un total de 13 patients, 10 ont montré une correction de l'activité NAPDH dans les neutrophiles et des effets cliniques notables (Bianchi et al., 2009; Kang et al., 2011; Ott et al., 2006). Dans la majorité des cas, une diminution du nombre de cellules corrigées est observée au cours du temps dû à un faible taux de greffe des CSHs. En revanche, chez trois patients il a été observé la présence de neutrophiles fonctionnels à long terme suite à une expansion clonale, la conséquence d'une insertion mutagène du vecteur MLV près du proto-oncogène PRDM16, ce dernier se trouvant transactivé par le promoteur viral LTR fort. Ces patients ont développé des myelodysplasie « MDS » et sont décédés (Ott et al., 2006). Suite à ces complications graves de génotoxicité, de nouvelles études cliniques sont en cours avec l'utilisation cette fois-ci de vecteurs lentiviraux SIN, avec des patients ayant subi une chimiothérapie forte myeloablative. Plusieurs centres en Europe et aux USA conduisent ces essais.



La thérapie génique sur CSHs peut également apporter des solutions aux maladies qui ne sont pas des déficits immunitaires. L'équipe de Cartier et al. (Cartier et al., 2012; Cartier et al., 2009) a obtenu des résultats prometteurs pour l'adrénoleucodystrophie (ALD). Il s'agit d'une maladie génétique liée à l'X qui associe une démyélinisation du système nerveux central et périphérique, une insuffisance surrénale et une accumulation des acides gras à très longue chaîne. L'ALD est la conséquence de mutations du gène ABCD1 codant pour la protéine ALD qui appartient à la sous-famille D des transporteurs ABC (ATP-binding cassette). Les CSHs sont corrigées ex vivo avec un vecteur lentiviral codant pour la protéine non mutée, et ensuite réinjectées dans les patients ayant reçu au préalable un traitement myéloablatif. Dans l'essai clinique, quatorze à seize mois après injection des cellules autologues corrigées, la démyélinisation cérébrale des patients a fortement ralenti, avec en conséquence un bénéfice clinique notable (Cartier et al., 2010).

Les hémoglobinopathies correspondent à des anomalies qui touchent la partie protéique de l'hémoglobine. La drépanocytose et la β -thalassémie sont des maladies génétiques, dues à des mutations du gène codant pour une des chaînes de l'hémoglobine et qui ont pour conséquence d'empêcher les globules rouges d'assurer leur fonction (Malik, 2016). En 2012, la compagnie BluebirdBio a lancé la phase I et II des essais cliniques de thérapie génique ex-vivo d'hémoglobinopathies par cellules souches CD34+ autologues

(<u>http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/989b21e50ad45daa4445c2c52</u> <u>cff849b.pdf</u>). Cet essai clinique est encore en cours et montre des résultats prometteurs concernant la β -thalassémie et la drépanocytose (Payen and Leboulch, 2012).

Maladies	Transg∙ne	Type de	R¶f¶rences
		vecteur	
ADA -SCID	ADA	γ-retroviral et	(Aiuti et al.,
		SIN-Lentiviral	2009)
SCID -X1	IL2Ryc	γ-retroviral et	(Cavazzana-
		SIN-Lentiviral	Calvo et al.,
			2000; Hacein-
			Bey-Abina et
			al., 2010)
WAS	WASp	SIN-lentiviral	(Aiuti et al.,
			2013; Hacein-
			Bey Abina et al.,
			2015)
X-CG D	gp91 ^{phox}	γ-retroviral et	(Bianchi et al.,
		SIN-lentiviral	2009; Kang et
			al., 2011; Ott et
			al., 2006)
β-T halassemia	β-globin	SIN-lentiviral	(Cavazzana-
			Calvo et al.,
			2010)
X-ALD	ABCD1	SIN-lentiviral	(Cartier et al.,
			2012; Cartier et
			al., 2009; Cartier
			et al., 2010)
			-Drépanocytose
			-Metachromatic
			(MLD) (Sessa
			M, Lancet 2016,
			Biffi A, science
			2013)



II- Les Vecteurs lentiviraux d¶riv¶s du VIH-1

II-A / Le virus de l`immunod¶ficience humaine de type 1

GENRE	EXEMPLES
Alpharetrovirus	Avian leukosis virus (ALV)
	Rous sarcoma virus
Betaretrovirus	Mouse mammary tumor virus (MMTV)
	Mason-Pfizer monkey virus (M-PMV)
	Jaagsiektle sheep retrovirus
Gammaretrovirus	Murine leukemia virus (MLV)
	Feline leukemia virus (FLV)
	Gibbon ape leukemia virus (GALV)
	Retriculoendotheliosis virus (RevT)
Deltaretrovirus	HTLV-1, -2
	Bovine leukemia virus (bLV)
	STLV-1, -2, -3
Epsilonretrovirus	Walleye dermal sarcoma virus
	Walleye epidermal hyperplasia virus 1
Lentivirus	Human immunodeficiency virus type 1
	(HIV-1)
	Human immunodeficiency virus type 2
	(HIV-2)
	Simian immunodeficiency virus (SIV)
	Equine infectious anemia virus (EIAV)
	Feline immunodeficiency virus (FIV)
	Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV)
	Visna maedi virus
Spumavirus	Human foamy virus

Tableau 3: les genres de la famille retroviridae (d`apr·s l`ouvrage `Fields of virology, fifth editionŏ)

Les lentivirus sont des retroviridae complexes, étudiés depuis les années 1960 (Retroviruses, 1997). Leur étude s'est intensifié dans les années 80 lors de la découverte du virus de l'Immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1), l'agent étiologique du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Le terme lentivirus a pour étymologie latine lentus (lent), dû à la progression lente dans les maladies animales et humaines. Ce genre se caractérise par des virus enveloppés avec un génome ARN monocaténaire de polarité positive. Cinq sérogroupes ont été identifiés : bovin (BIV), équin (EIAV), félin (FIV), ovin/caprin lentivirus (CAEV, Visna) et primate (HIV et SIV) **(tableau 3)** Ces 20 dernières années, les vecteurs rétroviraux ont été utilisés dans de nombreux essais de thérapie génique pour traiter des maladies génétiques et aussi des cancers (Ghosh et al., 2015; Naldini et al., 1996). Les premiers vecteurs étaient des γ -rétrovirus (γ -RV) dérivés du MLV. Puis d'autres vecteurs rétroviraux ont été développés à partir des lentivirus comme le VIH-1. Dans l'objectif de l'utilisation de ces LVs en thérapie génique, il est nécessaire d'avoir une bonne compréhension du rôle et des caractéristiques de chacun des composants viraux.

II-A-1) Génome et protéines virales du VIH-1

Comme tous les rétrovirus, le VIH-1 est composé de deux copies d'ARN simple brin de de polarité positive d'environ 9kb (Figure 8). Après transcription inverse, l'ADN proviral du VIH-1 est composé des gènes gag, pol et env, encadrés par deux séquences régulatrices identiques appelées LTR (« Long Term Repeat »). L'ADN proviral codent également pour des gènes spécifiques au VIH-1 tels que les gènes de régulation tat et rev, ainsi que les gènes nef, vpu, vpr et vif, appelés gènes « accessoires » car leur suppression n'altère pas la réplication virale du vecteur dans certaines lignées cellulaires mais ces gènes jouent un rôle majeure dans la pathogénicité associée au VIH-1. De nombreux composants du génome présentent des fonctions régulatrices importantes sans pour autant être traduits en protéines : Les LTRs (qui jouent le rôle de promoteur), le signal de polyadénylation, la région d'interaction avec rev, le « Rev responsive element » (RRE), les sites accepteurs d'épissage, le signal d'encapsidation « psi » de l'ARN génomique dans la capside virale avant assemblage des virions, le site de fixation du tRNALys qui joue le rôle d'amorce lors de la transcription inverse (« Primer binding site » PBS) (Lu et al., 2011), la séquence palindromique « dimer initiation signal » DIS, essentielle à la dimérisation des 2 génomes ARN (Skripkin et al., 1994) et la région de trans-activation (TAR), reconnue par la protéine Tat, qui permet une élongation efficace lors de la transcription du génome viral (Brady and Kashanchi, 2005).



Figure 8 : Repr¶sentation de l°organisation g¶nomique du VIH-1

LTR « Long terminal repeat » : sous divisé en régions U3, R et U5 ; gag : code pour les protéines de structure (MA : matrice, CA : capside p24 ; NC : nucléocapside p7 ; p6 : séquence régulatrice) ; pol pour les enzymes virales (PR : protéase ; RT : Transcriptase inverse avec activité RNase H; IN : intégrase) ; env pour la glycoprotéine d'enveloppe de surface gp120 et transmembranaire gp41 ; PBS : site de fixation pour l'ARNt_{Lys} nécessaire à l'initiation de la transcription inverse ; protéines accessoires (Vif, Vpr, Vpu, Nef) (d'après (Watts et al., 2009)).

Gag, pol et Env, protéines de structure du VIH-1

Les gènes gag, pol et env sont nécessaires à la réplication et sont partagés par toute la phylogénie des rétrovirus. L'enveloppe gp160 est clivée de façon post-traductionnelle par la furine pour donner la sous-unité SU (surface ou gp120) et TM (transmembranaire ou gp41) et les polypeptides Gag et Pol sont clivés par la protéase virale au cours de la maturation. Gag ou p55 est clivé pour générer les protéines : MA (matrice), CA (capside), NC (nucléocapside). Quant à la polyprotéine Pol, son clivage libère trois enzymes virales essentielles : la protéase (PR), qui est responsable du clivage protéolytique de la plupart des polyprotéines précurseurs; la transcriptase inverse (RT) qui transcrit de façon inverse l'ARN en ADN proviral ; et l'intégrase (IN) qui permet l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte (Freed, 2015).

Tat et Rev, protéines régulatrices du VIH-1

Tat et Rev codent pour des protéines régulatrices. Tat joue un rôle majeur dans la production efficace des ARN viraux en agissant comme trans-activateur du promoteur 5'-LTR. La protéine Rev, quant à elle, interagit avec la région RRE « Rev Response Element » pour permettre un export nucléaire efficace des ARN viraux (Lu et al., 2013; Pollard and Malim, 1998).

Les protéines accessoires Vpr, Vpu, Nef et Vif

Ces protéines jouent plusieurs rôles cruciaux dans la progression du SIDA.

La protéine vif est exprimée à la phase tardive du cycle viral et est indispensable à la multiplication virale in vivo. Son rôle est resté longtemps inconnu jusqu'à la découverte de la protéine cellulaire APOBEC3G en 2002 (Sheehy et al., 2003). Il a été montré qu'APOBEC3G, une cytidine déaminase, est un facteur de restriction du VIH-1. Après interaction avec Vif (Letko et al., 2015), APOBEC3G est dégradé par le protéasome, contrant ainsi l'activité anti-rétrovirale de cette enzyme (Sheehy et al., 2003).

La protéine Nef est un facteur jouant un rôle essentiel au cours de l'infection et l'évolution du SIDA. Son gène est hautement conservé dans tous les lentivirus de primates, VIH-1, VIH-2 et SIV. Nef est une protéine multifonctionnelle, agissant sur différentes voies cellulaires pour optimiser certaines étapes du cycle viral et perturber le fonctionnement cellulaire au profit du virus (Foster and Garcia, 2008). Par exemple, (i) Nef induit la modulation de l'expression de surface de nombreux récepteurs membranaires, notamment le CD4 ainsi que les molécules du CMH-I, aboutissant à la perturbation du trafic intracellulaire de ces récepteurs, (ii) un effet positif sur le pouvoir infectieux des particules virales en inhibant les facteurs de restriction SERINC3 et SERINC5 (Usami et al., 2015) et (iii) la perturbation de certaines voies cellulaire (e.g autophagie, voir Chapitre 3). (Foster et al., 2011; Foster and Garcia, 2008).

La protéine Vpu est un acteur viral capable de contrer la protéine cellulaire BST2/Tetherine qui est un médiateur de l'immunité innée et agit comme un agent antiviral. Ce facteur de restriction retient les virions néoformés à la surface cellulaire de la cellule infectée empêchant ainsi le relargage des particules de VIH-1 (Kmiec et al., 2016). Vpu agit également en tant que protéine adaptatrice pour aider l'endocytose et la dégradation du récepteur CD4 de surface (sur lymphocytes T) afin de permettre un relargage optimal pour les virions naissants (Gonzalez, 2015; Strebel, 2014).

Enfin concernant Vpr, cette protéine est exprimée tardivement au cours du cycle viral et est incorporé dans les virions bourgeonnant des cellules infectées en interagissant avec le domaine C-terminal p6 de la polyprotéine Gag. Vpr permet de réduire le taux de mutation nucléotidique lors de la rétro-transcription en interagissant directement avec la forme nucléaire de l'Uracile DNA Glycosylase UNG2, une enzyme de réparation de l'ADN qui assure l'élimination de bases uraciles présentes dans l'ADN (Mansky et al., 2000; Planelles and Benichou, 2009). Vpr est également connue pour arrêter le cycle cellulaire en phase G2/M et permettre l'infection de cellules qui ne se divisent pas (Malim and Emerman, 2008).
II-A-2) Structure de la particule virale VIH-1 mature

Le VIH-1 est un virus enveloppé d'environ 120 nanomètres de diamètre, produit par bourgeonnement à la surface des cellules infectées (**Figure 9**). L'enveloppe virale est formée d'une bicouche lipidique d'origine cellulaire et exprime à sa surface deux glycoprotéines d'enveloppe: la glycoprotéine transmembranaire (gp41) et la glycoprotéine d'enveloppe externe (gp120). Les spicules (protéines enchâssées dans la bicouche lipidique de l'enveloppe virale) correspondent à des trimères de ces deux glycoprotéines. Dans le virion mature, l'enveloppe lipidique est en contact avec la matrice (MA) et protège la capside interne ou « nucléoïde », en forme de cône, constitué de protéines de capside (CA). Le génome du VIH-1, contenu dans le nucléoïde et associé à la nucléocapside (NCp7), est constitué de deux molécules identiques d'ARN simple brin de polarité positive, liées de façon non covalente en 5'. Les trois enzymes virales indispensables à la réplication : la transcriptase inverse (RT), l'intégrase (IN) et la protéase (PR) sont associées au nucléoïde.



Figure 9 : Repr¶sentation sch¶matique de la structure du virion VIH-1 (adapt¶ de (Le Rouzic and Benichou, 2005)

II-A-3) Cycle réplicatif



Figure 10 : Repr¶sentation sch¶matique du cycle r¶plicatif du VIH-1

Après entrée dans la cellule, les protéines de capsides sont libérées (décapsidation), résultant au relargage du génome ARN et les enzymes virales (RT, IN et PR). Le brin positif ARN (en vert) est converti par la RT en double brin d'ADN (violet) dans le cytoplasme et importé ensuite dans le noyau pour être intégré dans le génome de la cellule cible (noir). Durant le cycle réplicatif précoce, seul les ARNm totalement épissés (Tat, Nef, Rev) peuvent être exportés du noyau vers le cytoplasme. Ensuite, les protéines Rev synthétisées sont importées dans le noyau et elles interagissent avec la région RRE des ARNm non-épissés, ce qui permet leur export du noyau. Une fois que tous les ARNm ont été synthétisées, le génome viral et les protéines virales sont assemblés au niveau de la membrane plasmique. Les nouvelles particules VIH-1 bourgeonnent et sont relarguées de la cellule hôte. La particule virale immature devient mature après clivage des précurseurs Gag et GagPol par la protéase PR. (*D'après* (Sakuma et al., 2012))

Le cycle d'infection du VIH-1 commence par l'attachement d'un trimère de protéines gp120 au récepteur CD4 sur les lymphocytes T ou les macrophages. Ensuite la liaison au co-récepteur est l'étape qui va initier la fusion de la membrane virale avec la membrane de la cellule cible. Le VIH-1 peut être classé selon le co-récepteur aux chimiokines utilisé ; pour le co-récepteur CCR5, on parle de souche virale R5, pour CXCR4 on parle de souche X4, et pour les doubles tropiques, on parle de souche R5X4 (Philpott, 2003).

Après cette reconnaissance, la protéine transmembranaire gp120 change de conformation, conduisant au démasquage de la protéine gp41 et son insertion dans la membrane de la cellule cible. Le repliement de la protéine gp41 va alors rapprocher les membranes virales et cellulaires induisant leur fusion. Après entrée, les protéines de la capside sont libérées, libérant ainsi le génome viral ARN et les protéines associées (RT, IN et PR) dans le cytoplasme. Des études récentes semblent montrer que cette décapsidation pourrait avoir lieu au niveau du pore nucléaire (Campbell and Hope, 2015). Ensuite, le brin positif d'ARN est transcrit de façon inverse par la transcriptase inverse (RT) et importé dans le noyau pour être intégré par l'intégrase virale (IN) (**Figure 10**).

Durant les phases précoces d'infection, seuls les ARNm épissés codent pour Tat, Rev et Nef qui seront produits et exportés vers le cytoplasme. Ensuite, l'étape tardive de l'infection est initiée par l'action de Tat, Rev et les protéines accessoires. Le génome viral est complètement exporté du noyau par Rev grâce à sa liaison au domaine RRE. Ainsi le génome et les protéines virales peuvent être assemblés à la membrane plasmique. Après le bourgeonnement des particules virales de la cellule hôte, la multimérisation de Gag et Gagpol active la protéase PR qui va convertir les virus immatures en virus matures infectieux (Freed, 2015).

II-B/ Historique des vecteurs lentiviraux d¶riv¶s du VIH-1

Dans cette partie, nous allons évoquer la transition historique du VIH-1, virus pathogène sauvage, au vecteur viral transportant un transgène. Ensuite, nous verrons les caractéristiques des vecteurs lentiviraux de seconde et troisième génération qui ont fait l'objet d'optimisations pour améliorer leur biosécurité et leur efficacité de transfert.

II-B-1) Des Lentivirus aux vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1

Les premiers vecteurs lentiviraux (LVs) ont été développés dans l'objectif de mieux comprendre la réplication virale du VIH-1. Pour rendre ces vecteurs plus sûrs, les vecteurs VIH ont évolué à travers une série de modifications moléculaires. De ce fait, selon leur technologie de production, les vecteurs sont dits de 1^{ère}, de 2^{nde} ou de 3^{ème} génération en fonction des séquences dérivées du génome VIH-1 et utilisées dans les plasmides (**Figure 11**).

II-B-2) Vecteurs lentiviraux de 1^{ère} génération

En 1996, Naldini et al. ont mis au point la première construction de vecteur lentiviral (1^{ère} génération) (Naldini et al., 1996). Cette génération de vecteurs lentiviraux, très proche du

VIH-1, a subi des modifications génétiques, afin d'améliorer leur biosécurité et efficacité. Cette première génération de vecteurs est produite à partir de trois plasmides: le plasmide codant pour Gagpol et les protéines accessoires ; le plasmide codant pour la glycoprotéine d'enveloppe VSV-G; et le plasmide codant pour le transgène. Les deux premiers plasmides ne sont pas sous contrôle du promoteur LTR et ne contiennent pas de signal d'encapsidation Psi, afin d'éviter toute encapsidation de séquences virales codantes dans les virions. Dans la plupart des cas, l'expression des gènes de structure de ces vecteurs lentiviraux est sous le contrôle d'un promoteur hétérologue viral fort comme celui du cytomégalovirus (CMV). Le plasmide de transfert quant à lui contient le transgène sous dépendance du promoteur LTR, et contient toutes les séquences régulatrices comme la séquence Psi, DIS, PBS, RRE, pour permettre une incorporation virale efficace des deux ARN viraux et des signaux indispensables à la transcription inverse.



C/ Vecteurs lentiviraux de 3^{ème} génération :



Figure 11 : Evolution des vecteurs lentiviraux d¶riv¶s du VIH-1

(A) La 1^{ère} génération des vecteurs VIH-1 inclue un plasmide codant pour toutes les protéines VIH-1, sauf la glycoprotéine d'enveloppe gp160. La séquence d'Env est codée sur un autre plasmide et provient d'un virus hétérologue, (B) La 2^{nde} génération de vecteur a supprimé les séquences des protéines accessoires et régulatrice Tat (C) Vecteurs de 3^{ème} génération : système à 4 plasmides. Le plasmide codant pour les séquences des protéines de structure Gag, Pol et la séquence RRE. Le plasmide de transfert contenant le promoteur SIN LTR « Self inactivating » (CMV = promoteur du cytomégalovirus). Le plasmide codant pour la séquence VIH-1 rev. Et enfin le plasmide codant pour la séquence Env hétérologue.

II-B-3) Vecteurs lentiviraux de 2nd génération

Dans un but d'améliorer encore la biosécurité des vecteurs lentiviraux, il a été développé des vecteurs de 2^{nde} génération, ne codant plus pour les protéines accessoires Vif, Vpu, Vpr et Nef, du fait du rôle majeur de ces protéines dans la pathogénicité associée au VIH-1. De ce fait, ces vecteurs lentiviraux n'incluent que quatre des neuf gènes du VIH-1 : Gagpol, Tat et Rev (Env étant issu d'un autre type de virus).

II-B-4) Vecteurs lentiviraux SIN (Self-Inactivating) : mesure de biosécurité

De façon générale, après intégration du vecteur lentiviral dans le génome de la cellule hôte, la cassette exprimant le transgène se retrouve encadrée par deux séquences LTRs identiques.

Hors, de nombreuses séquences endogènes dans le génome sont dérivés de séquences LTR rétrovirales ancestrales (Berkhout and Jeang, 1992; Jern and Coffin, 2008). La présence de LTRs dans les vecteurs lentiviraux augmente donc les chances de recombinaison entre la

séquence du vecteur lentivirale et des séquences génomiques, ce qui pourrait conduite à l'apparition de particules lentivirales compétentes pour la réplication (RCLs) (Segall et al., 2003).

Un autre risque indésirable des promoteurs LTR est l'activation non désirée de gènes cellulaires à proximité du site d'intégration du génome proviral, du fait de la présence dans le LTR de régions promotrices fortes. Si l'intégration du transgène a lieu près d'un protooncogène, cette région enhancer/promoteur risque d'activer sa transcription, comme cela a été observé dans des essais cliniques utilisant des vecteurs gamma-rétroviraux (Hacein-Bey-Abina et al., 2008; Iwakuma et al., 1999; Miyoshi et al., 1998; Wu et al., 2003; Zufferey et al., 1998).

Un autre point négatif est l'obligation de conserver la séquence codant pour la protéine Tat. En effet, le promoteur LTR n'est efficace qu'après transactivation par la protéine Tat, suite à la fixation à la région TAR (Das et al., 2011; Harrich et al., 1995). Hors Tat présente des fonctions indésirables (pro-apoptotique, entrée dans les cellules voisines avec conservation de sa propriété de transactivateur, fonctions immunosuppressives (Benjouad et al., 1993; Frankel and Pabo, 1988). L'élimination du gène Tat est rendue possible par le remplacement du promoteur viral (contenu dans la région U3 du 5' LTR) par un promoteur indépendant de Tat. Eliminer la séquence codant pour Tat permet ainsi d'augmenter la biosécurité des vecteurs lentiviraux et de diminuer les chances de recombinaison (Dull et al., 1998). Toutes ces raisons ont conduit au développement des vecteurs lentiviraux auto-inactivés (Self-Inactivated, SIN) (Iwakuma et al., 1999; Zufferey et al., 1998). Le génome proviral est normalement encadré par deux séquences LTRs qui contiennent chacune 3 régions : U3, R et U5. La région U3 correspond au promoteur viral et la région R en 3'-LTR au signal de polyadénylation. Dans l'approche SIN, un fragment de l'élément U3 en 3' LTR, incluant la TATA box et les sites de liaison aux facteurs de transcription SP1, NFkB, et NFAT, est supprimé. Ces séquences sont normalement essentielles pour la transcription et la réplication (Miyoshi et al., 1998). En absence de promoteur viral, l'expression du transgène n'est alors possible que suite à l'insertion d'un promoteur interne, en amont du transgène (Figure 12). Le choix du promoteur est crucial car il doit permettre une expression la plus spécifique du tissu cible (pour éviter au maximum une expression ectopique) et à des niveaux assez forts pour permettre d'atteindre la dose thérapeutique et ceci sans présenter de génotoxicité cellulaire (Logan et al., 2004; Modlich et al., 2009; Montini et al., 2009; Schambach et al., 2013).



II-B-5) Vecteurs lentiviraux de 3^{ème} génération

Les vecteurs de 3^{eme} génération ont été développés en 1998 afin d'améliorer la biosécurité (Dull et al., 1998). Pour cela, les vecteurs sont pourvus du système LTR_{SIN} qui permet, comme nous l'avons vu précédemment, d'éliminer le promoteur viral LTR fort, et de produire des vecteurs Tat indépendant. Une autre modification consiste à produire la protéine Rev sur un plasmide séparé des autres gènes viraux. En conclusion, les quatre plasmides utilisés pour

générer ces vecteurs de 3^{ème} génération sont : (i) le plasmide d'assemblage contenant seulement Gag et Pol, (ii) le plasmide codant pour Rev, (iii) le plasmide d'enveloppe hétérologue et (iv) le plasmide de transfert contenant le transgène sous promoteur hétérologue dans un système sécurisé LTR_{SIN}. Le vecteur de 3^{ème} génération ne contient donc plus que 3 gènes sur les 9 initiaux du VIH-1, augmentant ainsi la biosécurité. Ainsi, la conception d'un vecteur lentiviral sûr et efficace est passée par l'élimination des séquences inutiles du génome d'origine mais aussi par l'ajout d'éléments ayant montré un effet positif sur le titre viral et l'expression du transgène. Par exemple, la région cis-active d'initiation centrale cPPT (central polypurine tract) du VIH-1 a été rajoutée en position central dans les vecteurs lentiviraux. Cette séquence semble jouer un rôle important dans l'import nucléaire (Zennou et al., 2000) en permettant une décapsidation efficace au niveau du pore nucléaire et permet in fine une meilleure expression du transgène (Arhel et al., 2007). Un autre élément en cis est utilisé afin d'améliorer l'expression du transgène : l'élément de régulation post-transcriptionnel du virus de l'hépatite de la marmotte « WPRE ». WPRE permet d'augmenter le niveau d'expression des ARN épissés dans le noyau et le cytoplasme (Donello et al., 1998) et donc in fine l'expression du transgène (Zufferey et al., 1999).

II-C/ Strat¶gie de pseudotypage des particules lentivirales

II-C-1) Principe du pseudotypage

Lors de la transduction, l'étape d'entrée du vecteur lentiviral à l'intérieur de la cellule cible est possible via la liaison de la glycoprotéine d'enveloppe à un récepteur cellulaire spécifique, suivie d'une étape de fusion des membranes virales et cellulaires. Dans les approches de thérapie génique, il est important que le vecteur viral cible la population cellulaire d'intérêt afin d'éviter au maximum l'expression du transgène de façon ectopique. De ce fait, il a été mis au point la stratégie de pseudotypage (« surface targeting »), en utilisant le tropisme naturel de certaines glycoprotéines d'enveloppe pour modifier celui du vecteur lentiviral (Frecha et al., 2008b). Ces virus modifiés sont dits « pseudotypés » et produisent des vecteurs d'une plus grande stabilité, capables de résister à la concentration et la purification, ce qui augmente le titre viral, limite le volume à utiliser et améliore la biosécurité de ces systèmes. Le choix du pseudotype est donc crucial pour obtenir une adhésion et une fusion spécifique des vecteurs avec les cellules d'intérêt.

II-C-2) VSV-G : Glycoprotéine d'enveloppe à tropisme large

Une étape importante vers l'utilisation en clinique des vecteurs lentiviraux a été le développement du pseudotype lentiviral VSV-G (Naldini et al., 1996). Il s'agit de la glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculeuse, un virus à ARN négatif de la famille des Rhabdoviridae. VSV a pour réservoir naturel les chevaux, les cochons et autres mammifères et insectes (Coll, 1995). Lors d'une infection chez l'homme, le VSV peut causer des symptômes grippaux ou des encéphalites virales (Letchworth et al., 1999). Récemment, le récepteur cellulaire à la glycoprotéine d'enveloppe VSV-G été identifié comme étant la famille des récepteurs aux lipoprotéines de basse densité (LDL-R) (Amirache et al., 2014; Finkelshtein et al., 2013). Les particules lentivirales pseudotypées avec la glycoprotéine VSV-G ont montré une stabilité accrue (congélation/décongélation, ultracentrifugation) et l'obtention d'un meilleur titre viral lors de la production (Yee et al., 1994). La glycoprotéine VSV-G est la plus largement utilisée de par son tropisme large et sa forte fusogénicité. Elle permet une transduction efficace ex vivo des CSPH exprimant le marqueur CD34+ et la transduction in vivo des cellules du système nerveux central, du muscle et du foie (Matrai et al., 2010). Cependant, in vivo, la glycoprotéine VSV-G est inactivée par le complément du sérum humain (DePolo et al., 2000). Les vecteurs pseudotypés VSV-G sont actuellement utilisés dans de nombreux essais cliniques de thérapie génique ex vivo.

II-C-3) Les glycoprotéines d'enveloppe virale à tropisme spécifique

Le large tropisme des vecteurs lentiviraux pseudotypés VSV-G peut ne pas convenir à certaines applications de thérapie génique où l'on cherche à cibler spécifiquement un type cellulaire. Pour cela, il est possible d'utiliser de nombreux pseudotypes plus spécifiques d'un tissu donné (table 4).

Virus	Glycoprot¶ines	Tropisme	R¶f¶rences
Rabies virus	Rabies-G	Neurones	(Kato and Kobayashi, 2014; Wong et al., 2006)
Mokola virus	MK-G	Neurones	(Wong et al., 2006)
Lymphocytic choriomeningitis virus	WE, WE-HP1	Cellules souches neurales et gliome Cellules dentritiques	(Stein et al., 2005; Zhang et al., 2014a)
Ross river virus	E1, E2	Cellules gliales	(Kang et al., 2002)
Ebola virus	EboZ	Epithelium respiratoire	(Silvertown et al., 2006)
Baculovirus	GP64	Hépatocytes	(Kang et al., 2005)

HCV (Hepatitis C virus)	E1, E2	Hépatocytes	(Bartosch et al., 2003)
Sendai virus	Protéine F	Hépatocytes	(Kowolik and Yee, 2002)
RD114 feline	RD114/TR	Cellules	(Sandrin et al., 2002)
endogenous		hématopoïétiques	
virus			
Gibbon Ape	GALV/TR	Cellules	(Christodoulopoulos and
Leukemia virus		hématopoïétiques	Cannon, 2001; Sandrin et
			al., 2002)
Baboon	BaEV/TR,	Cellules	(Girard-Gagnepain et al.,
endogenous	BaEVRLess	hématopoïétiques	2014)
virus			
Measles virus		Cellules	(Frecha et al., 2009; Frecha
(virus de la	H et F	hématopoïétiques	et al., 2008a)
rougeole)		(lymphocytes T et B)	
Influenza A	HA	Epithelium retinal	(Duisit et al., 2002; Wang
Virus			et al., 2008)
hemagglutinin			
Nipah virus	NiV-G	Cellules	(Palomares et al., 2013;
	NiV-F	embryonnaires,	Witting et al., 2013)
		hématopoïétiques et	
		cellules endothéliales	
Chikungunya	E1 et E2	Tropisme large sauf	(Hu et al., 2014; Salvador et
virus		cellules	al., 2009)
		hématopoïétiques	
Severe acute	SARS-CoV	Cellules épithéliales	(Fukushi et al., 2005;
respiratory		aériennes	Kobinger et al., 2007)
syndrome			
coronavirus			
Western equine	WEEV	Neurones	(Poluri et al., 2008)
encephalitis virus			

Tableau 4: Liste des glycoprot¶ines d`enveloppe pour pseudotyper des vecteurslentiviraux et/ou r¶troviraux

Pour un ciblage plus particulier des cellules du système hématopoïétique, il est possible d'utiliser la glycoprotéine du virus leucémogène du Gibbon (GALV) (Christodoulopoulos and Cannon, 2001) celle du rétrovirus endogène félin RD114 (Sandrin et al., 2002; Zhang et al., 2004) ou celle récemment décrite du rétrovirus endogéne du babouin (BaEV) (Girard-Gagnepain et al., 2014).

Enveloppes virales modifiées

L'incorporation de certaines glycoprotéines d'enveloppe hétérologues à la surface des vecteur lentiviraux est parfois très inefficace. C'est par exemple le cas pour les glycoprotéines GALV ou RD114 dont les pseudotypes lentiviraux ne sont pas infectieux. Ces protéines Env contiennent, à l'extrémité C-terminale de la queue cytoplasmique, une région dite peptide R, qui doit être clivée par la protéase virale lors du bourgeonnement du virion hors de la cellule. Ce clivage est requis pour l'activation de la fonction fusogénique de la glycoprotéine virale (Kubo et al., 2007) De ce fait, la queue cytoplasmique des glycoprotéines d'enveloppe de RD114 et GALV a été remplacée par celle de la glycoprotéine d'enveloppe du virus leucémogène murin amphotrope (MLV-A) qui est clivable par la protéase du VIH-1, permettant ainsi une incorporation efficace dans la particule virale (Christodoulopoulos and Cannon, 2001; Sandrin et al., 2002). Cette modification est appelée « TR » puisque la partie TM et le peptide R sont les séquences appartenant à la glycoprotéine d'enveloppe du MLV-A. Ces nouvelles enveloppes ainsi modifiées sont appelées GALV/TR et RD114/TR

II-D/ Syst·me de production et titration des vecteurs lentiviraux

II-D-1) Production de vecteurs lentiviraux de 3^{ème} génération

Les cellules de reins embryonnaires humains (human embryonic kidney) HEK-293T ou des clones dérivées des HEK-293T comme HEK-293T/17 (A.T.C.C. CRL-11268 hautement transfectables) (Pear et al., 1993) sont les outils principaux pour la production de vecteurs lentiviraux. Ces cellules ont été modifiées de manière à exprimer l'antigène T du virus simien 40 (SV40) rendant ainsi ces cellules plus efficaces pour la production lentivirale : meilleur titre virale ainsi que capacité à s'adapter à la culture en suspension dans un milieu sans sérum ce qui est particulièrement intéressant pour les productions à grande échelle (Gama-Norton et al., 2011; Merten et al., 2016).

Il existe deux stratégies de production de vecteurs lentiviraux actuellement utilisées : (i) la transfection transitoire avec différents plasmides ; (ii) l'utilisation de lignées d'empaquetage ou productrices stables.

Production de vecteurs lentiviraux par transfection transitoire

L'expression transitoire est la méthode la plus couramment utilisée pour produire les vecteurs lentiviraux. Ce type de procédé permet une production rapide et adaptée à l'utilisation en laboratoire. La production transitoire consiste à transfecter les plasmides codant pour les

vecteurs de 3^{ème} génération, décrits précédemment en II/B-5 à l'aide de divers agents transfectants. La précipitation au phosphate de calcium (Ca2PO4) est une technique de transfection très utilisée pour la production à petite échelle, mais également en 50L pour les approches cliniques (Merten et al., 2011). On peut également utiliser des peptides ou lipides cationiques commerciaux (Lipofectamine, FuGENE, 293fectin, TransIT ...), mais ils ont un coût non négligeable. Pour des productions lentivirales en suspension, le Ca2PO4 ne fonctionne pas. Un additif comme le polyethylenimine (PEI) est plus couramment utilisé. (Merten et al., 2016; Pham et al., 2006).

II-D-2) Titration des vecteurs lentiviraux

Avant la transduction de cellules cibles avec le vecteur lentiviral, il est nécessaire de déterminer le titre viral pour ajuster les doses, évaluer la qualité de la production et également évaluer l'efficacité de transduction sur les cellules d'intérêt. Plusieurs méthodes existent : (i) mesurer la quantité de particules virales physiques; (ii) mesurer le nombre de copies d'ADN proviral ou (iii) mesurer l'expression du transgène après transduction d'une lignée cellulaire de référence (Kutner et al., 2009).

Méthodes de titration des particules virales physiques

Le nombre de particules lentivirales peut être quantifié en dosant par ELISA le nombre de protéines de capside p24 présentent dans le surnageant, pour les vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1 (Geraerts et al., 2006). La quantification de particules virale peut également être réalisée en déterminant le contenu du surnageant en ARN génomique viral par qRT-PCR (Polymerase Chain Reaction quantitative en temps réel après transcription inverse) (Geraerts et al., 2006). Cependant, les titres viraux obtenus par ces méthodes ne mettent pas en évidence l'infectiosité des particules mais leur seul présence physique dans le surnageant.

Méthodes de titration fonctionnelle des particules virales infectieuses

Lorsqu'un gène rapporteur est inclus dans le vecteur lentiviral (e.g. La protéine fluorescente verte (GFP), le récepteur au NGF tronqué (Δ NGFR)), la mesure directe de l'expression du transgène dans les cellules transduites est facilement analysable par cytométrie en flux. Avec cette méthode de titration, les lignées permissives classiquement utilisées sont les lignées HCT116, HT1080, HEK-293T (Barde et al., 2010) ou TE671 (Sandrin et al., 2002), le titre infectieux déterminé est spécifique de la lignée. Il est donc un référentiel pour comparer différents lots de production, mais ce titre n'est pas représentatif de celui qui serait obtenu sur

des cellules d'intérêt à transduire. En effet, la permissivité des cellules pour les vecteurs lentiviraux est variable, en particulier pour un pseudotype donné.

Le titre infectieux peut également être évalué en dosant le nombre de copies d'ADN proviral (VCN) présent dans les cellules infectées. Pour cela, l'ADN génomique est isolé à partir des cellules cibles après transduction, ensuite le nombre total de VCN est déterminé par qPCR en temps réel à l'aide de séquences spécifiques du VIH-1. Cette méthode est utilisée lorsque l'expression du transgène n'est pas facilement détectable par cytométrie en flux. En effet, pour les vecteurs ne contenant pas de gène rapporteur, cette méthode de titration des VCNs ne reflète pas l'expression du transgène mais seulement son intégration dans le génome de la cellule cible (Kutner et al., 2009).

_____ **(** 44 **)**_____

CHAPITRE 2

Utilisation d'additifs de culture pour promouvoir la transduction virale

_____ **4**6 **)**_____

Les vecteurs rétroviraux et lentiviraux de 3^{ème} génération ont fait la preuve, au cours des dernières années, de leur grande efficacité en tant qu'outil de transfert de gène et d'expression à long terme dans les cellules cibles. En revanche, malgré les développements récents concernant la thérapie génique des cellules souches, deux éléments sont critiques : (i) la durée de manipulation ex vivo, qui augmente le risque de différenciation cellulaire, (ii) la nécessité d'utiliser des doses élevées de vecteur pour transduire de façon efficace un maximum de CSHs. Ainsi, les difficultés pour transduire les cellules primaires et les concentrations limitantes de vecteurs produits sont des problèmes récurrents. Des développements technologiques ont donc été réalisés afin d'augmenter l'efficacité de transduction des cellules cibles avec des vecteurs lentiviraux, et ceci, via le développement d'additifs de culture capables de promouvoir l'entrée virale comme :

Les polymères,

Les lipides cationiques,

Les peptides ou protéines cationiques.

<u>I/ Les polym·res</u>

Les polymères sont des assemblages de macromolécules (comme des hydrocarbures, des monosaccharides...), modifiés via diverses réactions chimiques afin de posséder les groupements chimiques nécessaires à leur fonction (comme des groupements cationiques).

Polymères cationiques

Concernant les vecteurs viraux, les polymères cationiques s'assemblent avec ces derniers en formant des complexes capables d'interagir avec la surface cellulaire et ainsi permettre l'internalisation par endocytose (Davis et al., 2004; Porter et al., 1998).

Par exemple, le polybrène, ou hexadimethimethrine bromide, a été décrit pour sa capacité à promouvoir l'infection rétrovirale. Ce polymère cationique est actuellement utilisé en laboratoire pour le transfert de gène via des vecteurs rétroviraux mais également adénoviraux (Arcasoy et al., 1997; Cornetta and Anderson, 1989; Toyoshima and Vogt, 1969). Les interactions électrostatiques existant entre le virus, la cellule cible et le polymère cationique permettent de définir le mécanisme d'action. Les polymères cationiques permettent ainsi une transduction efficace par agrégation virale et neutralisation des charges négatives à la surface de la membrane cellulaire et virale (Davis et al., 2004).

Polymères non ioniques : Poloxamères

Les poloxamères sont des grandes molécules amphiphiles et non ioniques avec deux branches oxyde éthylène hydrophile flanquant une région d'oxyde propylène hydrophobe. Ils sont décrits comme interagissant avec la membrane cellulaire et permettant la réparation de lésions (Lee et al., 1992) ou pour permettre la délivrance de macromolécules telles que les acides nucléiques ou des drogues (Hannig et al., 2000). L'utilisation du poloxamère pluronique F127 (aussi appelé poloxamère p407) a été suggérée pour promouvoir la transduction lentivirale dans les cellules endothéliales humaines et de cellules gliales de rat (Dishart et al., 2003)

II/ Les lipides cationiques

Les lipides cationiques sont des lipides formés par une chaîne hydrophobe et une tête hydrophile chargée positivement. Ces lipides sont capables de former des liposomes qui sont des bicouches lipidiques sous forme de micelles. L'ADN chargé négativement interagit avec les charges positives des lipides, créant ainsi des lipocomplexes ou lipoplexes. Cela procure aux lipides cationiques le rôle de vecteur non-viral pour son action transfectante (Jubeli et al., 2016; Sun and Zhang, 2010). Du point de vue de son rôle d'additif de culture pour la transduction virale, les lipides cationiques sont capables de former des complexes stables avec le virion afin d'augmenter l'efficacité de transduction du vecteur viral sur les cellules cibles (Hodgson and Solaiman, 1996; Innes et al., 1990).Cependant, ces lipides ne sont pas utilisés en clinique du fait de leur cytotoxicité observée lors de la fusion avec la membrane cellulaire, due à la présence du groupement hydrophile chargé positivement (Porter et al., 1998; Zabner et al., 1995).

III/ Divers peptides et prot¶ines cationiques

III-A/ La Protamine Sulfate

La protamine sulfate, ou salmine, est un mélange de peptides hautement cationiques, dérivés du sperme de saumon et d'autres espèces de poissons, couramment utilisé pour arrêter l'effet anticoagulant de fortes doses d'héparine lors de certaines interventions chirurgicales. En 1989, Cornetta et al. ont publié une étude montrant que ce peptide est efficace pour la thérapie génique avec des vecteurs rétroviraux et moins toxique en comparaison avec le polybrène qui était couramment utilisé en transfert de gène (Cornetta and Anderson, 1989). La protamine sulfate est actuellement utilisée dans divers essais cliniques (Cartier et al., 2009).

III-B/ SEVI et S¶m¶nog¶lines

Dans l'étude cherchant à identifier les agents naturels jouant un rôle dans la transmission sexuelle du VIH, les auteurs ont réalisé un criblage des protéines présentes dans le liquide séminal humain, afin d'identifier d'éventuels inhibiteurs ou promoteurs de l'infection par VIH-1 (Munch et al., 2007). Les auteurs ont ainsi identifié des peptides correspondants à des fragments de la protéine phosphatase acide prostatique (PAP) et ont montré que les fragments de PAP forment des fibrilles amyloïdes et augmentent fortement la fusion entre les virions VIH-1 et les cellules cibles. Les auteurs se sont focalisés plus particulièrement sur le peptide formant des fibrilles amyloïdes appelé SEVI (« Semen-derived Enhancer of Virus Infection »). Le SEVI a été montré comme étant capable également d'augmenter l'efficacité de transfert de gène par les LVs et y-RV pseudotypés avec différentes glycoprotéines d'enveloppe (Wurm et al., 2010). La capacité à augmenter la transduction virale dépend des caractéristiques structurales uniques du SEVI. Il adopte une structure amyloïde en « cross-β » dans laquelle les feuillets β sont orthogonaux à l'axe des fibrilles (Castellano and Shorter, 2012). Les fibrilles SEVI servent de « ponts cationiques » qui précipitent simultanément le virus à la surface des cellules et diminuent la répulsion électrostatique entre les surfaces chargées négativement du virus et de la cellule cible (Roan et al., 2009; Roan et al., 2010).Quatre ans après le SEVI, Roan et al. ont mis en évidence la présence des séménogélines dans le liquide séminal, des peptides qui ont la capacité d'augmenter de façon drastique l'adhésion et la fusion des virions avec la cellule cible (Roan et al., 2011).

III-C/ Les peptides d¶riv¶s de la gp120 du VIH-1

Il existe également d'autres peptides additifs de culture formant des nanofibrilles. Début 2013, un peptide dérivé de la glycoprotéine gp120 du VIH-1(acides aminés 413 à 431 de la séquence de gp120) a été identifié par l'équipe de Jan Münch (Yolamanova et al., 2013) pour sa capacité à augmenter l'efficacité d'infection du VIH-1. Afin d'identifier la séquence minimale nécessaire pour cet effet d'additif d'additif de culture, les auteurs ont développés des peptides variants (EF-B jusqu'à EF-H). Suite à cette étude, le peptide EF-C (Enhancing Factor C) a été décrit comme le plus performant. Cet additif de culture est capable d'augmenter l'infection rétrovirale de façon 4 fois plus importante que le SEVI.

III-D/ Les peptides d¶riv¶s de la gp41 du VIH-1

49

Zhang et al. (Zhang et al., 2014b) ont récemment identifié deux petits peptides de 13 résidus (P13) et 16 résidus (P16) dérivés de la protéine transmembranaire gp41 du VIH-1, capables d'augmenter l'efficacité d'infection par VIH-1. Ils ont également la capacité de former des fibrilles de type amyloïde.

III-E/ D¶riv¶s de la fibronectine humaine : La R¶tronectin÷

Dans le cadre clinique, l'additif le plus communément utilisé pour la transduction lentivirale est la Retronectin®, un fragment de fibronectine recombinante humaine (peptide CH-296) de 574 résidus acides aminés qui utilise la caractéristique des cellules hématopoïétiques à se lier à des domaines spécifiques de la fibronectine via les intégrines. La Retronectin® possède trois domaines de liaison : CS-1 (liaison à l'intégrine VLA-4), C-domain (liaison à l'intégrine VLA-5) et H-domain (heparin binding domain III de liaison aux LVs) (Hanenberg et al., 1996; Pollok and Williams, 1999). Cet additif de culture n'est pas un peptide fibrillaire contrairement au SEVI, EF-C, P16 et P13. L'hypothèse du mécanisme d'action de la Retronectin® est sa capacité à colocaliser des particules virales et les cellules cibles (Hanenberg et al., 1996) et à rendre les cellules plus permissives à la transduction (Article 1).

IV / Decouverte des Vectofusin÷, des peptides d¶riv¶s du prototype LAH4

IV -A/ Historique des peptides de la famille LAH4

Les peptides cationiques sont très utilisés en tant qu'agent de transfection en combinaison avec des polymères cationiques. La stratégie émergente durant les années 90 a été de développer des peptides multifonctionnels, capables à la fois de compacter l'ADN, de faire pénétrer le complexe à l'intérieur de la cellule et enfin de libérer l'ADN des vésicules endosomales avant son transport jusqu'au noyau.

Une étude a montré que le peptide KALA, un peptide cationique amphipathique, est capable de transfecter différentes lignées cellulaires sans nécessiter la présence d'un polymère ou d'un lipide cationique (Wyman et al., 1997). Grâce à ses nombreux résidus lysines, ce peptide est capable de compacter l'ADN mais également de déstabiliser la membrane de l'endosome du fait de son caractère amphipathique. De même, d'autres peptides ont été développés tels que ppTG20 (Rittner et al., 2002), Hel 11-7 (Niidome et al., 1999) et Vpr52-96 (Kichler et al., 2000). Ces peptides synthétiques ont une grande proportion d'hélices alpha qui permet de

positionner les lysines ou arginines sur une face de l'hélice conférant ainsi le caractère amphipathique (Bechinger et al., 2011; Kichler et al., 2006).

Au regard des propriétés des résidus histidines (pKa de 6 permettant une protonation lors de l'acidification dans l'endosome), il a été développé un peptide riche en histidines, avec deux lysines à chaque extrémité : le LAH4 (KKALLALALHHLAHLALHLALALKKA) (Bechinger, 1996; Kichler et al., 2003). En plus, des résidus cationiques, le LAH4 est constitué de quatre histidines et de résidus acides aminés hydrophobes (alanines et leucines). Le peptide LAH4 possède un fort potentiel de transfection mais également une activité anti-bactérienne (Mason et al., 2006a; Vogt and Bechinger, 1999).

IV-B/ Le peptide LAH4-L1

La synthèse de peptides mutants du peptide LAH4 est intéressante sachant que la modification des résidus acides aminés peut permettre une amélioration des capacités de transfection. Il a été synthétisé une variété de peptides mutants qui ont été testés pour leur capacité à compacter l'ADN et transfecter les cellules cibles (Kichler et al., 2003). La synthèse de différents mutants de LAH4 avait pour but d'identifier les résidus-clés de la séquence de 26 résidus acides aminés ainsi que leur position, les valeurs de l'angle hydrophile formé par les histidines dans la structure en hélice alpha afin d'établir un lien entre la structure secondaire du peptide et sa fonction. Il a été montré par exemple que la valeur de l'angle hydrophile est très importante pour une bonne efficacité de transfection. Dans la représentation en hélice de Schiffer-Edmunson (cette représentation permet de visualiser la distribution des résidus hydrophobes et polaires dans l'axe de l'hélice alpha), le LAH4-L1 présente une leucine (L1) entre deux paires d'histidine, formant ainsi un angle hydrophile de 80° (**Figure 13**). LAH4-L1 s'avère être un bon agent transfectant d'ADN (Mason et al., 2006b) et de siARN (Langlet-Bertin et al., 2010) tout en ayant également un rôle d'additif de culture sur la transduction de cellules cibles avec des pseudotypes lentiviraux GALVTR-LV (Fenard et al., 2013b).



Figure 13: Repr¶sentation en h¶lice de Schiffer-Edmunson du peptide LAH4- (de la position 6⁻23) Angle hydrophile de 80°.

Les peptides amphipathiques, comme LAH4-L1, interagissent avec les lipides de la membrane, adoptent une orientation transmembranaire à pH neutre et une orientation à la surface membranaire à pH acide (pH 5,5) et par conséquent déstabilisent la membrane plasmique (Mason et al., 2006a). Le mélange des lipides de la membrane virale et la membrane plasmique permet à l'enveloppe virale de créer des pores dits « viraux » (Chien et al., 2009). LAH4-L1 semble agir au niveau de l'étape d'entrée virale, dans un premier temps, grâce à sa forte affinité pour les lipides membranaires en neutralisant les lipides anioniques et les heparan sulfates. Ceci permet aux vecteurs lentiviraux de mieux adhérer aux cellules (Fenard et al., 2013b). LAH4-L1 permet ainsi d'augmenter de façon efficace la transduction des vecteurs GALVTR-LVs sur des CSPHs CD34+ humaines. En revanche, ce peptide ne permet pas l'augmentation de la transduction sur les vecteur VSVG-LVs (voir partie résultat, article 2).

IV-C/ Identification du peptide LAH4-A4 (Vectofusin1)

Dans le but de trouver un peptide de la famille LAH4 plus performant au regard de la transduction lentivirale, et connaissant le potentiel de LAH4-L1, une série de mutants de ce dernier a été créée.

Cette nouvelle famille de dérivés LAH4-L1 a été développée au sein du laboratoire GENETHON par le Dr David FENARD et est appelée dérivés Vectofusin® (Brevet W02013/001041 (Fenard et al., 2013d)). Le peptide Vectofusin-1, appelé également LAH4-A4, est le plus performant au regard de la transduction lentivirale avec le pseudotype

GALVTR-LV (Fenard et al., 2013d). Il a été montré que Vectofusin-1 agit sur la transduction lentivirale au niveau de l'entrée, comme LAH4-L1, probablement en neutralisant les feuillets lipidiques de la membrane permettant ainsi l'adhésion et la fusion du vecteur viral avec la cellule et ceci de façon indépendante du pseudotype d'enveloppe utilisé (**Figure 14)** (Fenard et al., 2013b).



Figure 14 : La Vectofusin-1, un additif am¶liorant la transduction lentivirale de CSPHs humaines CD34+.

(a) Représentation schématique de la séquence primaire du peptide LAH4-A4 (Vectofusin-1), constitué de 4 types de résidus acides aminés : Lysine (K), Histidine (H), Leucine (L) et Alanine (A) ; (b) Efficacité de transduction des CSPHs hCD34+ avec différents pseudotypes lentiviraux (b,c,d) ou rétroviral (e) en absence ou en présence de Vectofusin-1 (12µg/mL). Moyenne de transduction +/- l'écart type (SD) (Fenard et al., 2013b).

Une partie du travail présenté dans cette thèse a consisté à mieux caractériser la famille des Vectofusins et ainsi mieux comprendre le mécanisme d'action mis en jeu lors de la transduction lentivirale (Voir partie Résultat, Chapitre 2).

53

_____ 54)_____

CHAPITRE 3

Influence de l'autophagie sur la transduction lentivirale

6

I/Autophagie

I-A/ Diff¶rents types d`autophagie

La cellule maintient son homéostasie grâce à un équilibre finement régulé entre la biosynthèse et le catabolisme des macromolécules. Pour cela, la cellule dispose de deux systèmes majeurs de régulation : (i) la voie « ubiquitine-protéasome » pour la dégradation de protéines à durée de vie courte, et (ii) la voie de « dégradation lysosomale » (Appelqvist et al., 2013; Glickman and Ciechanover, 2002). La voie lysosomale est en partie responsable de la dégradation de matériel extracellulaire par endocytose appelée « hétérophagie » et d'autre part de la dégradation de matériel intracellulaire appelée « autophagie ». Le terme autophagie vient des mots grecs qui signifie « phagos » qui signifie manger et « autos » qui signifie soi-même. L'autophagie est un processus dynamique et universel présent chez tous les organismes eucaryotes allant de la levure aux mammifères (Hughes and Rusten, 2007). Il s'agit d'un mécanisme de dégradation des constituants intracellulaires au niveau des lysosomes telles que les protéines à durée de vie longue, les agrégats protéiques, les lipides, les carbohydrates, les organites endommagés ainsi que les microorganismes intracellulaires (Lilienbaum, 2013). Elle permet la dégradation et le recyclage des protéines et macromolécules intracellulaires afin d'assurer un maintien du contenu cellulaire et le statut bioénergétique de la cellule. Cette voie de dégradation cellulaire est activée par des stimuli lors de stress environnementaux ou de carences nutritionnelles (Kroemer et al., 2010; Liu et al., 2013; Yorimitsu and Klionsky, 2005).

Il existe trois types d'autophagies majeures :

- La macro-autophagie
- L'autophagie médiée par des protéines chaperonnes « chaperone mediated autophagy (CMA) »
- La micro-autophagie

Il est actuellement considéré qu'il existe deux types de macroautophagie : 1) une macroautophagie qui n'est pas ou peu sélective (activée en réponse aux carences en nutriments pour recycler des acides aminés afin d'assurer la survie) ; 2) une macroautophagie très sélective qui, grâce à l'intervention de récepteurs spécifiques, permet d'éliminer des cibles spécifiques. Au sein de cette macroautophagie sélective, on distingue, par exemple, la mitophagie (Ding and Yin, 2012), la ribophagie (Kraft et al., 2008), la pexophagie

(Manjithaya et al., 2010), la réticulophagie (Bernales et al., 2007), la lipophagie (Liu and Czaja, 2013), la virophagie et la xénophagie (Bauckman et al., 2015).

La micro-autophagie se caractérise par une invagination de la membrane lysosomale permettant la séquestration de constituants cytoplasmiques pour leur dégradation. Il existe un sous-type de micro-autophagie moins connu qui est la dégradation de portions de noyaux par les lysosomes appelée « piecemeal microautophagy of the nucleus PMN » (Li et al., 2012).

L'autophagie médiée par des protéines chaperonnes CMA est un mécanisme plus spécifique que les autres types. En effet, seules les protéines contenant un motif pentapeptidique spécifique du type « KFERQ » sont reconnues par les protéines chaperonnes Hsc70. Cette reconnaissance va permettre l'internalisation dans les lysosomes et la dégradation. Ce mécanisme a été non conservé au cours de l'évolution et se retrouve présent uniquement chez les organismes eucaryotes supérieurs (Dice, 2007).

Concernant la macro-autophagie, qui est plus communément appelée sous le terme générique « autophagie », c'est la voie majeure et la mieux caractérisée de dégradation et de recyclage des composants cytoplasmiques (**Figure 15**) (Feng et al., 2014). Ce mécanisme dépend de deux voies d'ubiquitylation pour la formation d'une double membrane afin d'aboutir à la formation de vacuoles appelées « autophagosomes » (Ohsumi and Mizushima, 2004). Cellesci vont par la suite fusionner avec des lysosomes pour dégrader le contenu cytoplasmique à l'aide d'hydrolases lysosomales, les « cathepsines ». Ce contenu va par la suite être recyclé et réutilisé par la cellule (Levine and Klionsky, 2004; Wang and Klionsky, 2003). Les études sur l'autophagie sont longtemps restées anecdotiques par manque d'outils. Au milieu des années 90, la découverte des gènes Atg (Autophagy-related) qui régulent ce processus a permis à ce domaine d'émerger. Le prix Nobel de Médecine et de Physiologie a été décerné cette année à Yoshinori Ohsumi pour la découverte de ces gènes chez la levure Saccharomyces Cerevisae (Tsukada and Ohsumi, 1993). Aujourd'hui, cette famille comporte plus de trente gènes participant tous au processus d'autophagie chez les mammifères (Mizushima et al., 2011).

L'ensemble des études sur le mécanisme de l'autophagie ont montré que l'autophagie est impliquée dans d'autres fonctions cellulaires. Tout d'abord, au niveau de l'immunité innée, de par son rôle dans la dégradation des pathogènes intracellulaires (virophagie) (Wileman, 2013). Egalement, l'autophagie aide à la maturation des antigènes afin de les présenter au complexe

majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II), lui conférant ainsi un rôle dans l'immunité adaptative (Espert et al., 2007; Randow and Munz, 2012).

L'autophagie est également impliquée dans d'autres réponses biologiques telles que le développement, la différenciation des cellules, l'inflammation, les réponses immunitaires, la survie cellulaire et le vieillissement. De ce fait, sa dérégulation favorise le développement et la progression de plusieurs pathologies dont le cancer (Levine and Kroemer, 2008; Meijer and Codogno, 2009).



Figure 15: Repr¶sentation sch¶matique de la macroautophagie

La protéine LC3-II (microtubule-associated protein light chain 3) est impliquée dans l'élongation de l'autophagosome et sa maturation. Etant la seule protéine ATG ancrée dans la membrane autophagosomale, LC3-II constitue un marqueur de l'autophagosome (Kabeya et al., 2000).

I-B/ M¶canismes mol¶culaire de l`autophagie

I-B-1)/Initiation de l'autophagie

La machinerie de l'autophagie est orchestrée par les gènes atg à travers une succession d'étapes. Au cours de l'initiation de l'autophagie, il y a formation dans le cytoplasme d'une membrane isolée appelée « phagophore ». Celle-ci est très riche en phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P). Il semblerait que la membrane du phagophore ait plusieurs origines, comme le réticulum endoplasmique (Hayashi-Nishino et al., 2009) ou encore de la membrane nucléaire (English et al., 2009), de la mitochondrie (Hailey et al., 2010), de l'appareil de Golgi (Itoh et al., 2008) ou encore de la membrane plasmique (Ravikumar et al., 2010).

L'initiation de l'autophagie, chez les mammifères, nécessite un nombre important d'acteurs qui sont regroupés en 2 complexes afin de former le phagophore :

(i) Le complexe Pi3k complexe III/Beclin1 (phosphatidyl inositol 3 kinase de classe III/Beclin1)

(ii) Le complexe ULK (UNC-51-Like Kinase) activé par mTOR (mammalian target of rapamycin complex 1) et AMPk

Ces voies de signalisation sont actives ou réprimées selon diverses voies de signalisation (Pattingre et al., 2008).

I-B-2) Régulation de l'autophagie

La protéine ULK1/2 est une sérine/thréonine kinase et celle-ci est régulée par mTORC1 qui comme indique son nom est une des cibles de la rapamycine et l'AMP kinase. Dans des conditions physiologiques, le complexe mTORC1 interagit avec ULK1 conduisant ainsi à la phosphorylation d'ULK1 et de la protéine ATG13 inhibant de ce fait l'activité d'ULK1 et l'autophagie. En revanche, lors d'une carence de nutriments, il y a inactivation de mTORC1 ce qui induit la dissociation du complexe ULK1 ainsi que sa déphosphorylation de façon à activer ULK1 contribuant de ce fait à l'initiation de l'autophagie (Hosokawa et al., 2009). Des études ont montré qu'ULK1 pouvait aussi phosphoryler AMBRA1 (« activating molecule in BECLIN1 regulating autophagy ») (Di Bartolomeo et al., 2010) et Beclin1, activant de ce fait le complexe Pi3K de classe III et la formation de l'autophagosome (Russell et al., 2013).

La formation de phagophore, sa nucléation et son élongation nécessitent la formation de complexes PI3K de classe III avec d'autres protéines partenaires. En effet, lors de l'initiation de l'autophagie, il y a production de molécules PI3P nécessaires à la membrane du phagophore, ce qui permet le recrutement d'autres protéines effectrices assurant l'étape d'élongation (formation d'autophagosomes).

L'élongation du phagophore est dépendante de deux systèmes de conjugaison semblables au processus d'ubiquitination. Le premier système conduit à la formation du conjugué ATG5-ATG12, qui se lie alors à ATG16L1. Ce complexe va servir de E3 ligase au deuxième système de conjugaison qui a la particularité de permettre la liaison covalente entre une protéine autophagique de la famille ATG8 (MAP-LC3B étant le membre le plus étudié chez

les mammifères) à un lipide, le phophatidyléthanolamine (PE). ATG8-PE (ou ATG8-II), est localisé sur les autophagosomes, en faisant ainsi un excellent marqueur de ces structures.

Quant à la production de PI3P, elle est assurée par le complexe PI3K de classe III/Beclin1. Il existe 3 types de complexes PI3K de classe III/Beclin1, mais la base commune de ces complexes reste la protéine PI3K de classe III elle-même, la protéine Beclin1 et la protéine p150 (**Figure 18**).



Figure 18 : Complexe Pi3K de classe III

La première étape de formation de l'autophagosome est initiée par l'association de la protéine Beclin1 aux protéines BARKOR (« Beclin1-associated autophagy-related key regulator ») et AMBRA1. Ce complexe est appelé le complexe 1. Grâce à la phosphorylation d'AMBRA1 par ULK1 il y a libération du complexe 1 PI3K de classe III du cytosquelette et induit ainsi la formation de phagophore. Cette interaction induit aussi l'activité de la GTPase Rab7, protéine responsable de la maturation de l'autophagosome et le trafic vésiculaire. (He and Levine, 2010; Tanida, 2011). Concernant la protéine BARKOR (ou appelée ATG14L), celle-ci est un régulateur positif nécessaire à la formation du phagophore et l'activité de la PI3K de classe III. Il a été montré que la déplétion d'ATG14L induit une diminution de l'activité de la PI3K et la formation des autophagosomes ainsi que le flux autophagique (Matsunaga et al., 2010).

Les protéines UVRAG (« UV-irradiation resistance-associated gene ») et BARKOR (ATG14L) sont en compétition pour l'interaction avec BECLIN1 (Itakura et al., 2008; Itakura and Mizushima, 2009). UVRAG interagit avec deux protéines que cela soit le complexe 2a ou le complexe 2b : BIF-1 (« Bax-interacting factor 1 ») ou RUBICON (« Run domain cystein rich domain containing Beclin1 interacting protein ») respectivement. Ces protéines sont des régulateurs positifs pour BIF-1 et négatifs pour RUBICON de la Pi3K de classe III. En effet, UVRAG est capable de se lier avec la protéine BIF-1 ce qui augmente l'activité de la PI3K et induit ainsi l'autophagie. BIF-1 étant localisée dans le cytoplasme dans

des structures ponctuées et ainsi colocalise avec les protéines ATG5 et LC3 (Takahashi et al., 2007). Des études ont montré que UVRAG est capable également d'interagir avec RUBICON et la VPS de classe C ce qui aurait un effet inhibiteur sur la maturation des autophagosomes (Liang et al., 2008).

I-C/ Autophagie et cellules souches h¶matopo¾¶tiques

Les CSHs sont centrales pour la maintenance du système hématopoïétique. De ce fait, cellesci disposent de mécanismes uniques de survie afin d'assurer leur protection à long terme. Leur localisation dans la moelle osseuse au sein des niches hypoxiques et la maintenance en stade quiescent contribuent à cette conservation des CSHs (Chotinantakul and Leeanansaksiri, 2012). Ces stratégies ont essentiellement pour fonction de minimiser le stress et la production d'espèces réactives oxygénées (ROS « reactive oxygen species »), associées à la réplication et la respiration cellulaire et représentant un potentiel cytotoxique vis-à-vis des CSHs (Dewaele et al., 2011). Cependant, les mécanismes par lesquels les CSHs se protègent de divers stress, potentiellement présents dans la cavité de la moelle osseuse, restent peu connus. Récemment, il a été montré que les CSHs peuvent survivre aux stress métaboliques par le biais d'une réponse cellulaire robuste médiée par l'autophagie (Warr et al., 2013). De plus, d'autres résultats de Warr MR. et al. ont montré que l'autophagie joue un rôle crucial dans le système sanguin adulte en protégeant les CSHs de carences en nutriments (Warr et al., 2013).

Gomez-Puerto et al. (Gomez-Puerto et al., 2016b) ont montré pour la première fois dans leur étude que les CSPHs humaines isolées à partir de sang de cordon ombilical présentent un taux élevé d'autophagie en comparaison avec les cellules différenciées de la lignée myéloïde ou érythroïde. Ce maintien de l'autophagie est crucial pour la survie des CSPHs immatures (CD34+, CD38-). Les auteurs ont montré que l'inhibition de l'expression des protéines autophagiques ATG5 et ATG7 induit une baisse dans la fréquence de progéniteurs CFC, ralentit la progression du cycle cellulaire, donc la prolifération et augmente l'apoptose. De façon plus importante, l'absence des protéines ATG5 et ATG7 détériore la capacité de greffe des CSPHs in vivo (Gomez-Puerto et al., 2016b). Ce résultat a également été observé chez les CSPHs murines (Cao et al., 2015).

L'autophagie est importante pour le développement du système hématopoïétique, comme l'a montré l'étude de Mortensen M. et al. avec la dérégulation de l'hématopoïèse fœtale et post-

natale observée chez les souris déficientes dans un gène essentiel à l'autophagie, atg7 (Gomez-Puerto et al., 2016a; Mortensen et al., 2011).

Ils ont montré, à travers cette étude sur les souris, que les CSHs déploient un mécanisme cytoprotecteur via un mécanisme pro-autophagique passant par l'expression du gène FOXO3a un facteur de transcription capable d'induire les gènes de l'autophagie suite à un stress métabolique. Leur travail soulève également le rôle protecteur de l'autophagie contre la sénescence cellulaire des CSHs. En effet, l'autophagie va permettre aux CSHs âgées de maintenir le statut bioénergétique et de survivre dans des conditions faibles en cytokines. Grâce à ces observations, il serait intéressant de voir si une dérégulation des processus autophagique peut contribuer au développement de maladies du sang liées à l'âge en permettant la survie des CSHs âgées, altérées, dysfonctionnelles ou transformées qui, en temps normal, sont éliminées par apoptose chez les animaux plus jeunes (Garcia-Prat et al., 2016; Mortensen et al., 2011; Warr et al., 2013).

I-D/ Autophagie et virus

Ces dernières années ont été riches en études portant sur l'autophagie et les infections virales (Dreux and Chisari, 2010; Jordan and Randall, 2012). Les premiers travaux reliant l'autophagie et les infections virales datent de 1978 lors de l'observation du virus de l'herpès (HSV) et du cytomégalovirus (CMV) dans des autophagosomes par microscopie électronique (Smith and de Harven, 1978; Yordy and Iwasaki, 2011). Ces études ont permis de mieux caractériser le mécanisme de l'autophagie et son rôle dans l'immunologie suggérant ainsi que la modulation de l'autophagie représente potentiellement une nouvelle stratégie thérapeutique pour traiter les maladies induites par des pathogènes viraux (Rubinsztein et al., 2012; Yordy and Iwasaki, 2011).

L'autophagie est un processus antiviral puissant. De ce fait, les virus ont évolué pour échapper à cette voie et peuvent se montrer également capable de la détourner à leur avantage afin de promouvoir la réplication virale.

I-D-1) Rôle antiviral de l'autophagie

La formation d'autophagosomes, lors du processus autophagique, exerce différents rôles antiviraux :

(i) la dégradation des composants cytoplasmiques viraux appelée « virophagie » (Wileman, 2013);

 (ii) l'activation de l'immunité innée en délivrant les acides nucléiques viraux aux endosomes exprimant des toll-like récepteurs (TLRs) (Delgado and Deretic, 2009);

(iii) l'activation de l'immunité adaptative en présentant les antigènes viraux endogènes aux molécules des CMH I et CMH II ;

(iv) la régulation de l'activation de l'immunité innée en contrôlant la production de ROS ;

(v) et enfin la promotion de la survie cellulaire (Deretic and Levine, 2009; Dong and Levine, 2013; Levine et al., 2011).

Concernant la virophagie, la présence de virions de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1), mutés pour le facteur de virulence ICP34.5, a été observé dans des autophagosomes de fibroblastes embryonnaires murins (Talloczy et al., 2006). Il a également été observé, en microscopie confocale, une colocalisation de la protéine Gag du VIH-1 avec des vésicules autophagiques (GFP-LC3) dans des macrophages primaires infectés, suggérant que les virions pourraient être dégradés par virophagie (Kyei et al., 2009). En revanche, ces virus arrivent tout de même à bloquer le mécanisme en utilisant leur propre protéines virales (Blanchet et al., 2010; Talloczy et al., 2006). Au-delà des particules virales entières, la dégradation de composants viraux individuels, tels que les protéines virales nécessaires au cycle de réplication du virus, peut également se produire par virophagie. Par exemple, la protéine de capside du virus Sindbis peut être sélectivement dégradée par virophagie et restreindre ainsi la neurovirulence associée à cette infection (Orvedahl et al., 2010). Le transactivateur viral Tat du VIH-1 est également dégradé sélectivement par virophagie qui exerce ainsi une forte activité anti-VIH. Ce virus a donc du développer des stratégies afin d'éviter cette dégradation (Sagnier et al., 2015).



Figure 16 : R×les antiviraux de l`autophagie (Adapt¶ de (Levine and Kroemer, 2008)) Pour l'immunité innée, il a été montré que l'autophagie est capable de diriger les protéines de réplication du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) et du virus Sendai vers des endosomes Toll-like récepteurs de type 7 (TLR7). Il faut savoir que la voie de signalisation des TLR est essentielle dans l'immunité innée grâce à l'induction de sécrétion d'interféron de type 1 constituant une barrière antivirale forte dans les cellules infectées (Delgado et al., 2008; Sanjuan et al., 2007).

I-D-2) Rôles proviral de l'autophagie

L'autophagie a maintenu une certaine pression sélective sur les virus à travers des millions d'années de co-évolution avec leurs hôtes eucaryotes. De ce fait, les virus ont évolué en développant diverses stratégies pour éviter et/ou supprimer la dégradation et l'activation du système immunitaire induits par l'autophagie.

Ces stratégies virales consistent à :

- (i) prévenir le virus de la capture autophagique,
- (ii) supprimer l'étape d'initiation de l'autophagie,
- (iii) et empêcher la maturation des autophagosomes (Deretic and Levine, 2009).

L'évasion efficace des virus aux effets antiviraux de l'autophagie a permis à ceux-ci de manipuler et exploiter le mécanisme autophagique et/ou ses composants afin d'en tirer avantage. Le processus autophagique et ses composants ont été impliqués dans des fonctions provirales pour plusieurs virus à ADN et ARN afin de favoriser leur réplication. Cependant, à ce jour, les mécanismes moléculaires utilisés ne sont pas tous bien définis. Nous allons décrire ici le cas particulier des virus à ARN.

Virus à ARN et autophagie :

Plusieurs virus à ARN de polarité positive ont été décrits pour utiliser les autophagosomes comme plateformes de réplication. En effet, une propriété commune de ces virus est de se répliquer au niveau de membranes intracellulaires. Ces membranes sont des plateformes d'échafaudage permettant de concentrer les complexes de réplication viraux et permettant un apport important de lipides membranaires. Ainsi de nombreux virus à ARN de polarité positive ont détourné l'autophagie pour utiliser les membranes autophagosomales (Kirkegaard and Jackson, 2005). C'est le cas du poliovirus, un picornavirus, qui va utiliser ses protéines virales 2BC et 3A pour induire la formation de doubles membranes. Le poliovirus se réplique sur des structures à double membrane et des études de microscopie confocale ont montré la colocalisation de la protéine 3A avec le marqueur des autophagosomes LC3 (Jackson et al., 2005; Taylor and Kirkegaard, 2007). Cela est également le cas pour d'autres picornavirus tels le coxsackievirus B3, l'entérovirus 71 et le virus de l'encéphalomyocardite (ECMV), qui se répliquent également sur des structures à double membrane avec leur complexe de réplication colocalisant avec des marqueurs autophagiques (Shi and Luo, 2012).
Les effets du VIH-1 sur l'autophagie durant l'infection sont complexes. Ceux-ci contribuent collectivement à la persistance virale et l'évasion du système immunitaire, mais de façon différente selon le type cellulaire, et selon que la particule VIH-1 infecte la cellule cible ou que la particule virale soit simplement en contact avec cette cellule (**Figure 17**).

Les cellules dendritiques (DCs) ont un rôle très important dans la reconnaissance du virus et dans l'initiation de la réponse immunitaire. Leur rôle est de capturer le pathogène, de le phagocyter et de présenter ses antigènes aux lymphocytes T CD4+ via le CMH de classe II. Les DCs sont les premières cellules du système immunitaire à être en contact avec le VIH au niveau des muqueuses. Dans les DCs exposées au VIH, l'autophagie est inhibée, ce qui favorise l'infection des lymphocytes T CD4+. L'inhibition de l'autophagie est induite par la voie d'activation de mTOR qui est accompagnée par une inhibition de la réponse TLR (TLR4, TLR8) (Blanchet et al., 2010). Cette stratégie mise en place permet de prévenir la clairance complète du VIH.

Contrairement aux lymphocytes T CD4+ et les DCs, le nombre de macrophages ne semblent pas diminuer au cours de l'infection au VIH-1 (Alexaki et al., 2008; Manches et al., 2014). Une première étude a révélé que les niveaux de vacuoles autophagiques augmentent dans les macrophages lors de l'infection au VIH-1 tandis que celles-ci diminuent dans les cellules T (Espert et al., 2009). Une autre étude, quant à elle, montre que si les étapes d'initiation de l'autophagie sont relativement préservées dans les macrophages infectés, les stades de maturation, par contre, sont inhibés par la protéine VIH-1 Nef, à travers son association avec le régulateur autophagique Beclin-1 (Kyei et al., 2009). Ainsi le VIH-1 exploite les phases précoces de l'autophagie dans les macrophages comme support d'assemblage des particules virales, tout en inhibant les stades de maturation de l'autophagie pour prévenir sa dégradation (Kyei et al., 2009).

Concernant les lymphocytes T CD4+ circulants, le développement de la phase SIDA chez les patients est caractérisé par un déclin de ces cellules au sein de l'organisme. En effet, ces cellules sont la cible du VIH-1 car elles expriment le récepteur CD4 et les co-récepteurs CXCR4 et CCR5 du VIH-1. Le contact de la protéine Env du VIH-1 avec les cellules T non infectées induit l'autophagie, processus nécessaire à leur mort par apoptose (Espert et al., 2006). Ainsi le lymphocyte T infecté peut contribuer à la déplétion de lymphocytes T non infectés (Doitsh et al., 2014; Espert et al., 2006). Via ce mécanisme l'autophagie est inhibée dans les lymphocytes T CD4+ productivement infectés montrant que ce virus a développé des

stratégies pour la bloquer afin d'éviter les effets antiviraux, notamment la dégradation de son transactivateur viral Tat (Espert et al., 2009; Sagnier et al., 2015; Zhou and Spector, 2008). En effet, il a été montré que la protéine virale Vif est en mesure de bloquer l'autophagie dans les cellules T infectées par le VIH-1 en interagissant avec LC3 (Borel et al., 2015).



Figure 17 : R¶sum¶ des interactions entre l`autophagie et le VIH-1 en fonction des cellules cibles (adapt¶ de (Dinkins et al., 2015))

De nouvelles études révèlent le rôle d'autres types cellulaires pendant l'infection du VIH tels que les cellules B, les cellules T non CD4+, les cellules « natural killer » NK, les astrocytes et autres cellules du système nerveux central (SNC) (Alexaki et al., 2008; Moir and Fauci, 2014; Svicher et al., 2014). Comment l'autophagie pourrait être impliquée dans ces cellules et sa contribution dans l'immunopathogenèse médiée par le VIH n'a pas encore été élucidé.

II- D¶couverte de Tat-Beclin1, un peptide antiviral inducteur d`autophagie

II-A/ Beclin-1, un acteur crucial dans la biologie des membranes

Beclin-1 a été découvert initialement comme étant le partenaire de la protéine antiapoptotique B-cell lymphoma-1 (Bcl-2). D'où le nom donné à cette protéine : « Bcl-2 interacting myosin-like coiled-coil protein » pour Beclin-1 (Liang et al., 1998). Beclin-1, aussi appelé ATG6, fait partie de la famille des protéines autophagiques ATG. Il a été montré, que l'autophagie n'est pas fonctionnelle dans les cellules souches embryonnaires invalidées pour le gène BECN1 (Yue et al., 2003). D'autre part, il a également été montré que les souris défectives pour Beclin-1 meurent rapidement durant l'embryogenèse, soulignant un rôle crucial de Beclin-1 dans les étapes précoces du développement (Yue et al., 2003). Outre son rôle dans l'autophagie, la protéine Beclin-1 est également un acteur crucial dans d'autres voies non autophagiques, comme l'adaptation au stress, la mort cellulaire, le développement, l'endocytose, la cytokinèse, l'immunité, la tumorigenèse et le vieillissement (Wirawan et al., 2012). Le rôle central de Beclin-1 dans plusieurs voies biologiques implique une régulation importante de son expression et de son activité.

La protéine Beclin-1 est une protéine de 60kDa qui arbore trois domaines distincts (**Figure 19**) :

- un domaine « Bcl-1 homology » : BH3

- un domaine « Coiled-Coil Domain » : CCD

- et un domaine « Evolutionary Conserved Domain » : ECD

Grâce à ces domaines, la protéine Beclin-1 peut interagir avec diverses protéines (Wirawan et al., 2012).





Le domaine BH3 est impliqué dans l'interaction avec les protéines de la famille Bcl-2 (Erlich et al., 2007; Oberstein et al., 2007). De façon intéressante, Beclin-1 forme de larges oligomères grâce aux interactions des domaines CCD et BH3. La multimérisation de Beclin-1 est nécessaire pour le recrutement d'autres facteurs induisant l'autophagie (Adi-Harel et al., 2010; Ku et al., 2008). Le domaine ECD quant à lui permet à la protéine Beclin-1 d'interagir avec la protéine Pi3K de classe III et permet également le recrutement de protéines autophagiques ATG pour orchestrer la formation de l'autophagosome (Kihara et al., 2001) (comme décrit dans le paragraphe II-c-1/). Le domaine ECD, par ailleurs, a été montré comme possédant trois résidus acides aminés aromatiques, formant une région hydrophobe impliquée dans l'association de Beclin-1 avec des lipides membranaires, faisant ainsi de Beclin-1 une protéine partiellement membranaire (Huang et al., 2012).

L'équipe de Beth Levine a identifié récemment la protéine Beclin-2, homologue à Beclin-1 (57% d'homologie de séquence), présente uniquement chez les mammifères. Beclin-1 présente une expression ubiquitaire tandis que Beclin-2 est tissue-spécifique (muscle squelettique, placenta, thymus, uterus, cerveau) (He et al., 2013). Comme Beclin-1, la protéine Beclin-2 régule l'autophagie et interagit avec les protéines du complexe Pi3K de classe III (ATG14, AMBRA, UVRAG, Becl-2). Beclin-2 est très similaire à Beclin-1 en possédant également des domaines BH3, CCD et ECD. En revanche, elles diffèrent du côté N-terminal, puisque ce domaine confére spécifiquement à Beclin-2 un rôle dans l'endocytose des récepteurs couplés à la protéine G par son interaction à la protéine GASP1 (« G-protein coupled receptor associated sorting protein 1 ») (Galluzzi and Kroemer, 2013; He et al., 2013).

II-B/Tat-Beclin 1, peptide inducteur d`autophagie

Le facteur de virulence Nef joue un rôle essentiel dans la réplication virale et la pathogénicité associée au VIH-1. Une des nombreuses fonctions de Nef est de se lier à Beclin-1, bloquant ainsi l'initiation de l'autophagie lors de l'infection de cellules cibles par le VIH-1 (Campbell et al., 2015 ; Kyei et al., 2009). Shoji-Kawata et al. (Shoji-Kawata et al., 2013) ont défini le motif peptidique minimal de Beclin-1 nécessaire pour interagir avec le facteur Nef. Ce domaine correspond aux résidus acides aminés 267 à 284, présents dans le domaine ECD. De là, les auteurs ont créé un peptide chimérique comportant en N-terminal le domaine de transduction de la protéine Tat du VIH-1 (pour permettre au peptide de pénétrer dans les cellules (Mishra et al., 2011)), fusionné à la séquence 267-284 de Beclin-1 via un linker

diglycine (GG).Les auteurs ont réalisés trois substitutions dans la séquence de Beclin1 267-284 afin d'augmenter la solubilité du peptide. Ce peptide est appelé Tat-Beclin1 (**Figure 20**).



Figure 20 : Repr¶sentation sch¶matique du peptide Tat-Beclin1 et de sa s¶quence primaire. Tat-Scrambled est le peptide contrôle (séquence aléatoire des résidus acides aminés du domaine Beclin-1). (Shoji-Kawata et al., 2013)

Il a été montré dans cette étude que ce nouveau peptide activateur d'autophagie est capable d'inhiber in vitro la réplication virale de plusieurs virus à ARN positif tels que Chikungunya (CHIKV), Sindbis (SINV), West Nile (WNV), VIH-1 ainsi que des bactéries intracellulaires comme Listeria monocytogenes. L'autophagie étant décrite comme ayant un aspect antiviral et proviral (voir paragraphe II-b-3/) le peptide Tat-Beclin1 en activant l'autophagie permet à la cellule de contrer l'infection virale (xénophagie). In vivo, le peptide permet également l'activation de l'autophagie et ceci semble avoir un effet positif sur les résultats cliniques des modèles murins infectés par CHIKV et WNV en diminuant la mortalité des souris. De ce fait, Tat-Beclin1 offre le potentiel d'un nouveau peptide thérapeutique en traitement des infections virales.

D'autres part, cette étude a identifié un nouveau régulateur négatif de l'autophagie appelé GAPR-1 (« Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1 » ou appelé aussi GLIPR-2 « Glioma pathogenesis-related protein 2 »). GAPR-1 est décrit comme interagissant avec Beclin-1 sur le domaine ECD₂₆₇₋₂₈₄, conduisant ainsi à une séquestration de Beclin-1 dans l'appareil de Golgi, empêchant ainsi le déclenchement de l'autophagie.

GAPR-1 fait partie de la famille des « Plant Pathogenesis Protein 1 » qui, elle-même appartient à la superfamille des CAP protéines (« Cystein-rich secretory, <u>Antigen 5</u>, <u>Pathogenesis protein 1 »</u>). Les membres de cette superfamille couvrent l'ensemble du règne animal et regroupe un ensemble de protéines ayant des fonctions biologiques allant de la

reproduction aux réponses immunitaires (Gibbs et al., 2008). GAPR-1 se trouve être un membre atypique de la famille des CAP protéines du fait de l'absence du peptide signal et de la présence d'un domaine transmembranaire. Elle n'est donc pas sécrétée comme les autres membres des CAP protéines mais est associée aux radeaux lipidiques du côté cytosolique de la membrane de l'appareil de Golgi (Eberle et al., 2002). Cette association membranaire est possible suite à la myristoylation de l'extrémité N-terminale de GAPR-1. Cependant, à ce jour, aucune étude n'a identifié la fonction de GAPR-1 dans les cellules. On ne sait toujours pas si GAPR-1 joue un rôle dans l'immunité innée, capable de contrer les pathogènes (exemple lentivirus dans notre cas) comme les autres membres de la famille PR-1.

Le peptide Tat-Beclin1 contient la séquence du domaine ECD₂₆₇₋₂₈₄ de Beclin-1, qui permet l'interaction, à la fois avec VIH-1 Nef mais aussi avec GAPR-1. De ce fait, le mécanisme d'action de Tat-Beclin1 décrit actuellement consiste à pénétrer dans le cytoplasme, interagir avec GAPR-1, permettant ainsi le relargage de Beclin-1 de l'appareil de Golgi et donc le déclenchement de l'initiation du processus autophagique.

Bien que l'autophagie ait été suggérée comme ayant un rôle protecteur pour les cellules, une nouvelle étude a observé que Tat-Beclin1 induit une mort cellulaire de façon dose dépendante (Liu et al., 2013). Ce type de mort cellulaire n'est ni l'apoptose ni la nécrose, celle-ci exhibe des caractéristiques morphologiques différentes. La mort cellulaire médiée par l'autophagie est appelée « Autosis ». Un autre peptide inducteur d'autophagie, Tat-vFlipα2, très différent de Tat-Beclin1, a été montré comme capable d'induire aussi l'autosis et de façon dose dépendante (Lee et al., 2009). Ceci confirme que l'autosis est un type de mort cellulaire consécutif à un déclenchement du processus autophagie. L'autosis peut être identifiée selon plusieurs critères : (i) l'absence de preuves morphologiques, biochimiques et génétiques pour d'autres voies de mort cellulaire ; (ii) les changements morphologiques uniques et (iii) une dépendance unique à la protéine Na+,K+ ATPase (Liu and Levine, 2015). Ainsi, le peptide Tat-Beclin1 peut avoir une certaine cytotoxité à forte dose mais seulement activateur d'autophagie à plus faible dose.

Pour conclure, le peptide Tat-Beclin1 est capable d'inhiber la réplication du VIH-1. En revanche, de nombreuses études ont montré, dans le passé, que les protéines de l'autophagie sont essentielles pour les premières étapes d'infection du VIH-1 (Brass et al., 2008; Eekels et al., 2012). Le VIH-1 est capable d'utiliser l'autophagie pour les stades précoces d'infection et par la suite, via le facteur de virulence Nef du VIH-1, inhibe l'autophagie pour l'étape de production virale (Kyei et al., 2009). Dans le cadre des approches de thérapie génique, les

vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1 qui sont développés sont non réplicatifs et n'expriment pas le facteur Nef. Ce travail de thèse a cherché à étudier l'effet de l'autophagie, et plus particulièrement du peptide Tat-Beclin1, sur la transduction des cellules cibles hématopoïétiques par un vecteur lentiviral.

RESULTATS

_____ **75**

<u>Etude des effets des additifs de culture sur la fusion et la transduc</u>tion <u>lentivirale de cellules h¶matopo¾¶tiques [–] l`aide de l`essai ĭ BLAMě</u>

En 2002, l'équipe de Warner Greene a mis au point un essai capable de quantifier la fusion de la particule VIH-1 avec la cellule cible, basé sur la technique du transfert d'énergie de deux molécules fluorescentes (FRET, Fluroresence Resonance Energy Transfert) et appelé BLAM assay (Cavrois et al., 2004). Au sein de notre l'équipe, Dina Ingrao a adapté cet essai pour étudier la fusion et la transduction, dans la même population de cellules cibles, avec les vecteurs lentiviraux recombinants et non-réplicatifs (essai « BLAM-LV »). Cet essai consiste à produire des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1 (LVs) ayant incorporé la protéine chimérique β -lactamase (BLAM)-Vpr. L'incorporation de cette protéine chimérique est possible grâce à l'interaction spécifique entre la protéine VIH-1 Vpr et la polyprotéine VIH-1 gag (Bachand et al., 1999; Kondo et al., 1995). Le génome proviral de ces vecteurs contient également un gène rapporteur qui code la forme tronquée du récepteur au facteur de croissance nerveuse (Δ NGFR) (Bonini et al., 2003). Lors de la transduction de cellules cibles avec ces vecteurs BLAM-LVs, la fusion entre la membrane virale et la membrane cellulaire peut être mesurée grâce à l'entrée de Blam-Vpr dans le cytoplasme et le clivage par Blam du substrat fluorescent CCF2, préalablement chargé dans la cellule. Le clivage du CCF2 change de spectre d'émission de fluorescence du vert au bleu, quantifiable par cytométrie en flux. Le niveau de transduction est lui aussi quantifiable par cytométrie en flux en suivant le niveau d'expression de ANGFR à la surface des cellules. Cet essai BLAM-LV permet ainsi de détecter de façon concomitante les niveaux de fusion et de transduction lentivirale dans les cellules cibles.

Cet essai nous a permis de confirmer que les vecteurs lentiviraux sont soumis à des restrictions post-entrée, que ce soit dans des lignées cellulaires T ou dans les CSPHs CD34+. Nous avons montré également que cette inhibition post-entrée peut être partiellement saturée après une forte augmentation de la quantité de vecteurs ou lorsque les additifs de culture tels que la Vectofusin-1 ou la Retronectin, sont utilisés pour promouvoir les niveaux de transduction.

Mon travail au sein de cette étude a été, dans un premier temps, de prendre l'essai en main pour confirmer ces résultats en répétant les expériences sur CSPHs. Dans un second temps, j'ai contribué à montrer l'effet de saturation de l'inhibition post-entrée en présence de différentes quantités de vecteurs ou en présence des deux additifs de culture suivants : la

Vectofusin-1 et la Retronectin. L'ensemble de ces résultats publié en 2014 est présenté dans l'article 1 dont je suis seconde auteure.

ARTICLE 1

"Concurrent measures of fusion and transduction efficiency of primary CD34+ cells with HIV-1 based lentiviral vectors reveal different effects of transduction enhance?

D. Ingrao, S. Majdoul, A.K. Seye, A. Galy and D. Fenard

Human Gene Therapy Methods 25(1):48-56 (2014) Doi: 10.1089/hgtb.2013.090

_____ **(** 79 **)**_____

Concurrent Measures of Fusion and Transduction Efficiency of Primary CD34 + Cells with Human Immunodeficiency Virus 1-Based Lentiviral Vectors Reveal Different Effects of Transduction Enhancers

Dina Ingrao,^{1–3} Saliha Majdoul,^{1–3} Ababacar K. Seye,^{1,2} Anne Galy,^{1–3} and David Fenard^{1–3}

Abstract

Lentiviral vectors (LVs) are used for various gene transfer applications, notably for hematopoietic gene therapy, but methods are lacking for precisely evaluating parameters that control the efficiency of transduction in relation to the entry of vectors into target cells. We adapted a fluorescence resonance energy transfer-based human immunodeficiency virus-1 fusion assay to measure the entry of nonreplicative recombinant LVs in various cell types, including primary human hematopoietic stem progenitor cells (HSPCs), and to quantify the level of transduction of the same initially infected cells. The assay utilizes recombinant LVs containing β -lactamase (BLAM)-Vpr chimeric proteins (BLAM-LVs) and encoding a truncated form of the low-affinity nerve growth factor receptor (Δ NGFR). After infection of target cells with BLAM-LVs, the vector entry rapidly leads to BLAM-Vpr release into the cytoplasm, which is measured by cleavage of a fluorescent substrate using flow cytometry. Parallel cultures of the same infected cells show transduction efficiency resulting from Δ NGFR expression. This LV-based fusion/transduction assay is a dynamic and versatile tool, revealing, for instance, the postentry restrictions of LVs known to occur in cells of hematopoietic origin, especially human HSPCs. Furthermore, this BLAM-LV assay allowed us to evaluate the effect of cytokine prestimulation of HSPCs on the entry step of LVs. The assay also shows that transduction enhancers such as Vectofusin-1 or Retronectin can partially relieve the postentry block, but their effects differ in how they promote LV entry. In conclusion, one such assay should be useful to study hematopoietic postentry restrictions directed against LVs and therefore should allow improvements in various LV-based gene therapy protocols.

Introduction

H UMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS 1 (HIV-1)-based lentiviral vectors (LVs) are highly efficient tools for gene transfer approaches, especially in the context of *ex vivo* hematopoietic gene therapies (D'Costa *et al.*, 2009; Naldini, 2011). However, a limiting factor that can be encountered during lentiviral transduction is the low efficacy of the entry or postentry events into target cells. One strategy to optimize the binding and the fusion of LVs with target cells is the capacity to pseudotype LVs with heterologous viral envelope glycoproteins (GPs) or ligand-fused GPs, leading to a cellular entry through different surface receptors (Frecha *et al.*, 2008b; Anliker *et al.*, 2010). Another strategy to improve the entry step is the addition of cofactors during the transduction procedure, such as cationic polymers—for example, polybrene (Toyoshima and Vogt, 1969; Cornetta and Anderson, 1989), DEAE-Dextran (Vogt, 1967), or cationic peptides [e.g., Vectofusin-1 (Fenard *et al.*, 2013b), Retronectin (Pollok and Williams, 1999), protamine sulfate (Cornetta and Anderson, 1989), human semen enhancer of viral infection (Wurm *et al.*, 2010), or HIV-1 gp120-derived peptides (Yolamanova *et al.*, 2013). The action mechanism of these cationic additives is mainly described as the capacity to neutralize membrane charges, to improve virus–cell interactions and virus–cell fusion, and/or to promote virus aggregation (Pollok and Williams, 1999; Davis *et al.*, 2004; Roan *et al.*, 2009; Fenard *et al.*, 2013b; Yolamanova *et al.*, 2013).

¹Généthon, F-91002 Evry Cedex, France.

²INSERM UMR_S951, Généthon, F-91002 Evry Cedex, France.

³Université Evry Val d'Essonne, UMR_S951, F-91002 Evry Cedex, France.

CONCURRENT STUDY OF LENTIVIRAL FUSION/TRANSDUCTION

Despite an improvement of the fusion step with the target cell membranes, LVs are sometimes restricted into the cytoplasm during the trafficking from the plasma membrane to the nucleus. These postentry restrictions have been extensively studied in HIV-1-infected T cells, macrophages, and monocytes from different species, with the identification of major antiviral factors such as SAMHD1, tetherin, TRIM5 α , the APOBEC3 family [for reviews, see Wolf and Goff (2008), Duggal and Emerman (2012), and Harris et al. (2012)], and some DNA repair pathways (Lau et al., 2004; Lloyd et al., 2006; Yoder et al., 2006; Fenard et al., 2009; Weil et al., 2013). Concerning the human hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs), an attractive target for gene therapy developments, the endogenous proteasome activity, and also the cyclin-dependent kinase inhibitor $p21^{Waf1/Cip1/Sdi1}$ have been shown to exert a strong restriction on the transduction efficiency with LVs or on HIV-1 infection (Zhang et al., 2005, 2007; Santoni de Sio et al., 2006, 2008).

To evaluate the extent of postentry restriction into HSPCs and to study the effect of transduction enhancers on entry and postentry steps, it is critical to develop an assay that is capable to concurrently study the fusion and the transduction efficiency in the same cell population. Using an HIV-1 fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based fusion assay (Cavrois *et al.*, 2002), adapted to study nonreplicative LVs and recombinant transgene expression, we show that LVs are subjected to a strong postfusion restriction in human hematopoietic cells, either immortalized T lymphocytes or HSPCs expressing the hCD34+ marker. This postfusion restriction can be partially saturated when increasing amounts of LVs are used in the assay and/or when transduction enhancers such as Vectofusin-1 or Retronectin are used in the transduction protocol.

Materials and Methods

Reagents

CCF2-AM substrate and the CO₂-independent medium were purchased from Life Technologies (St-Aubin, France). Bovine serum albumin, human γ -globulins, bafilomycin A1, paraformaldehyde (PFA), and probenecid were obtained from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). Retronectin was purchased from Ozyme (St-Quentin-en-Yvelines, France). Vectofusin-1 was synthesized by Genecust (Dudelange, Luxembourg).

Plasmids

The plasmid encoding VAI and VAII (pAdVAntage) and the pCMV4- β -lactamase (BlaM)-Vpr were, respectively, obtained from Promega (Charbonnières-les-Bains, France) or from Addgene (Cambridge, MA) (plasmid 21950) (Cavrois *et al.*, 2002). The plasmids encoding HIV-1 Rev (pK.Rev) and HIV-1 gagpol (pKLgagpol) were described by Merten *et al.* (2011). The lentiviral transfer plasmid pRRL-PGK-low-affinity nerve growth factor receptor (Δ NGFR) was constructed based on pRRLsin-cPPT-hPGK-GFP-WPRE by substituting the GFP coding sequence, after digestion with *Bam*HI and *SalI*, with that of Δ NGFR coding sequence obtained by polymerase chain reaction from the commercial plasmid pMACS-LNGFR-IRES (Miltenyi Biotec, Paris, France).

Cell line culture

HCT116 cells derived from a human colorectal carcinoma (CCL-247; ATCC) and 293T cells (Merten *et al.*, 2011) were cultured at 37°C and 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM+Glutamax) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Life Technologies). Jurkat E6.1 immortalized T cells (TIB-152, ATCC) were maintained in RPMI 1640 (Life Technologies) supplemented with 10% heat-inactivated FCS.

Human CD34+ cell culture

Umbilical cord blood (UCB) samples were obtained in accordance with international ethics principles and French national law under declaration number DC-201-1655 to the French Ministry of Research and Higher Studies. UCB samples were collected from the Centre Hospitalier Sud-Francilien in Evry after uncomplicated births. hCD34 + cells were obtained by immunomagnetic selection (Miltenyi Biotec) from the mononuclear cell fraction of UCB. hCD34 + cells were preactivated as described previously (Charrier *et al.*, 2011). Briefly, hCD34 + cells were incubated overnight with X-vivo 20 medium (Lonza, Levallois-Perret, France) supplemented with 50 U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, and 2 mM L-glutamine (Life Technologies) and SCF (25 ng/ml), Flt-3 ligand (50 ng/ml), TPO (25 ng/ml), and IL-3 (10 ng/ml) (Miltenyi Biotec).

Viral vector production and vector titering

HIV-1-derived LVs were generated by transient calcium phosphate transfection of 293T cells with a six-plasmid vector system as described in Supplementary Table S1 (Supplementary Data are available online at www.liebertonline.com/ hgtb). The viral supernatants were collected 48 hr post-transfection, filtered (0.45 μ m), aliquoted, and stored at -80° C before use. An ultracentrifugation step is added before freezing for experiments requiring high titers of LVs. Infectious titers, expressed as the number of infectious genomes per milliliter (ig/ml), were determined by quantitative polymerase chain reaction on genomic DNA of serially infected HCT116 cells as described previously (Merten *et al.*, 2011). Physical particle titers were determined by measuring HIV-1 p24 capsid contents using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France).

Fusion and transduction assay

HCT116 cells (4×10^5 plated cells/well), Jurkat T cells (5×10^5 cells/well), or preactivated hCD34+ cells (7×10^4 cells/well) were incubated with VSV-G-BLAM-LVs for 2.5 hr at 37°C and 5% CO₂. For Retronectin conditions, LV particles were preadsorbed on plate-bound Retronectin ($7 \mu g/cm^2$) for 2 hr and hCD34+ cells were subsequently added to the well for 2.5 hr at 37°C and 5% CO₂. Next, for each condition, the cell sample was split in two: an aliquot of cells was transferred into a new well and further cultured for 4–7 days, while the remaining cells were processed for the fusion assay (Cavrois *et al.*, 2004). Briefly, cells were washed with 200 μ l of a CC₂-independent medium and incubated with 100 μ l of a CCF2/AM loading solution for 1 hr at room temperature in the dark. After the loading step, cells were washed and incubated with 200 μ l of the CO₂-independent medium



FIG. 1. Schematic representation of the BLAM-LV system. Representation of the VSV-G-BLAM-LV production using a sixplasmid vector system (left) and the target cell transduction with VSV-G-BLAM-LVs (right), allowing the concurrent study of the fusion efficiency (CCF2 cleavage) and the transduction efficiency (ΔNGFR expression at the cell surface). ΔNGFR, low-affinity nerve growth factor receptor; BLAM, β-lac-tamase; LV, lentiviral vector.

supplemented with 10% FCS and 2.5 mM probenecid for 16 hr at room temperature in the dark. Cells were then washed with PBS1×and fixed with 1.2% PFA. The change in emission fluorescence of CCF2 was monitored by flow cytometry by an LSRII and data were analyzed with DiVa software (BD Biosciences, Le Pont de Claix-Cedex, France). To evaluate the level of transduction, cells maintained in the culture for 4–7 days were washed and the nonspecific binding on hCD34+ cells was prevented by preincubating the cells with human γ -globulins. Next, cells were labeled for 30 min at 4°C with allophycocyanin-conjugated antihuman LNGFR (Miltenyi Biotech). Cells were then washed and analyzed by flow cytometry.

Results

Production of LVs containing BLAM-Vpr and encoding Δ NGFR

To better understand the parameters that control the efficiency of transduction in relation with the entry of gene transfer vectors into target cells, we developed a new method based on a FRET-based fusion assay (BLAM fusion assay) previously developed to study the fusion of HIV-1 virions with target cells. Such assay could also be used to monitor the level of infection by following the expression of *de novo* intracellular HIV-1 gag expression after few days (Cavrois et al., 2002). However, with nonreplicative LVs (i.e., the proviral DNA is devoided of gag-pol-env gene sequences), it is not possible to follow intracellular HIV-1 gag de novo production as described in the original method. Hence, BLAM-LVs (LVs carrying the fusion protein BLAM-Vpr) were designed to encode a truncated form of the low-affinity nerve growth factor receptor (Δ NGFR) (Rudoll *et al.*, 1996; Bonini et al., 2003) under the control of the ubiquitously expressed PGK promoter. This transmembrane protein is a safe and easily detectable marker at the surface of any transduced cells, including primary cells (e.g., HSPCs). High titers of recombinant BLAM-LVs pseudotyped with the VSV-G envelope GP (VSV-G-BLAM-LVs) were generated by transient calcium phosphate transfection of 293T cells with a sixplasmid vector system (Fig. 1 and Supplementary Table S1). Four typical plasmids are used to produce third-generation LVs: the plasmids encoding the HIV-1 rev protein, the HIV-1 gagpol polyprotein, the VSV-G envelope GP, and the transfer vector plasmid encoding ANGFR. For BLAM-LV production, two other plasmids have to be included (Supplementary Table S1). The plasmid pCMV4-BlaM-Vpr encoding, the BLAM enzyme fused to the HIV-1 Vpr protein, specifically



FIG. 2. Concurrent study of VSV-G-BLAM-LV fusion/ transduction with a nonhematopoietic cell line. (A) Analysis of VSV-G-BLAM-LV fusion in the HCT116 human colorectal cancer cell line (upper panels). Analysis of the cell transduction (day 5) with VSV-G-BLAM-LVs after ΔNGFR expression at the surface of HCT116 cells (lower panels). (B) Histograms are representing the average fusion (gray) and transduction (white) efficiency obtained for HCT116 cells±SD (n=3). SD, standard deviations.

CONCURRENT STUDY OF LENTIVIRAL FUSION/TRANSDUCTION

incorporated into lentiviral particles through its interaction with the p6 region of HIV-1 p55gag (Paxton *et al.*, 1993; Kondo *et al.*, 1995) and the pAdVAntage plasmid, encoding adenoviral VAI/VAII RNAs, acting as specific inhibitors of the Protein Kinase R (Supplementary Table S1). This last plasmid improves the level of expression of the BLAM-Vpr chimeric construct (Cavrois *et al.*, 2002) and is also used to improve the efficiency of LV production (Pernod *et al.*, 2004). The use of these Δ NGFR-encoding BLAM-LVs allows us to monitor, in the same cell population, the efficiency of lentiviral fusion and the level of effective transduction of target cells (Fig. 1).

Concurrent study of the lentiviral fusion and transduction of hematopoietic and nonhematopoietic cell lines

First, the BLAM-LV assay has been performed on adherent HCT116 cells (Fig. 2A), a nonhematopoietic cell line, highly permissive to VSV-G lentiviral peudotypes. As shown in Fig. 2, the use of only 3.8×10^6 ig/ml of VSV-G-BLAM-LVs can lead to comparable efficiencies of fusion (27%) and transduction (24%) in an infection protocol of only 2 hr and in the absence of any culture additives. To evaluate the specificity and the sensitivity of this assay, an inhibitor of the vacuolar proton ATPase (bafilomycin A1) was added. As expected, the fusogenic activity of the pH-dependent VSV-G envelope GP is strongly inhibited in presence of bafilomycin (Fig. 2A and B).

Next, VSV-G-BLAM-LVs were used to transduce Jurkat cells, a highly permissive immortalized human T cell line. As shown in Fig. 3A, the use of 7.5×10^6 ig/ml of VSV-G-BLAM-LVs can lead to a strong lentiviral fusion with Jurkat cells (above 77%). However, in the same cell suspension, the transduction efficiency is reaching only 29%. Interestingly, the ratio between the fusion and the transduction efficiency (*F*/*T* ratio) is decreasing when increasing amounts of VSV-G-BLAM-LVs are used in the assay (Fig. 3B). This discrepancy between fusion and transduction is not an artifact since the transduction efficiencies obtained with Jurkat cells at 7.5×10^6 ig/ml (27%) are comparable to the one obtained with HCT116 cells (around 24%) in which we observed a comparable level of fusion and transduction (Fig. 3B).

Numerous LV-based hematopoietic gene therapies target hCD34+ HSPCs. The fusion efficiency of VSV-G lentiviral pseudotypes with HSPCs has never been studied before. For that, hCD34+ HSPCs isolated by positive immunomagnetic selection from cord blood samples were used (Fig. 4). hCD34 + HSPCs were transduced with low doses of VSV-G-BLAM-LVs for only 2 hr, which results in low levels of detectable vector-infected cells (6%) (Fig. 4). As expected, this percentage was downregulated in the presence of bafilomycin (1%). This result highlights the strong difference in lentiviral fusion potency between hCD34+ cells and Jurkat T cells since the percentage of fusion is one log higher in Jurkat T cells (77%) using the same infectious titer of VSV-G-BLAM-LVs (Fig. 2). Therefore, the BLAM-LV assay is a powerful tool to highlight postfusion restrictions into target cells and shows that these restrictions are cell-type dependent and sensitive to the amount of LVs used in the assay.



FIG. 3. Concurrent study of VSV-G-BLAM-LV fusion/ transduction with an immortalized human T cell line. (A) Analysis of the fusion and the transduction of Jurkat T cells with VSV-G-BLAM-LV. The fusion-positive cell gate was established based on untransduced living cells loaded with the CCF2 substrate (upper left panel). In the presence of VSV-G-BLAM-LV, a control condition including the VSV-G fusion inhibitor bafilomycin (150 nM) was used. The cell transduction efficiency with VSV-G-BLAM-LVs was monitored at day 5 by following Δ NGFR expression at the cell surface (lower panels). (B) Histograms are representing the fusion (gray) and the transduction (white) efficiency obtained for Jurkat T cells incubated with various infectious titers (ig/ml) of VSV-G-BLAM-LVs. A control condition including bafilomycin (Baf.) was added for the highest dose of vector. Data are represented as the average values ±SD (n=3). The numbers in italic represent the ratio between fusion and transduction efficiency (F/T ratio) for each vector dose.

0.75

1.5

4

Titers (ig/ml x 10⁶)

7.5

7.5

Effect of hCD34+ HSPC prestimulation with cytokines on lentiviral fusion/transduction efficiencies

Current transduction protocols of hCD34+ cells with LVs include a cytokine prestimulation step to increase infection of HSPCs. The BLAM-LV assay was used to investigate whether or not the cytokine prestimulation step had an effect on the entry of lentiviral pseudotypes. hCD34+ cells were cultured in the absence (Mock) or presence of cytokines and



FIG. 4. Gating strategy for analysis of hCD34+ cells transduced with VSV-G-BLAM-LVs. Preactivated hCD34⁺ cells were left untransduced (Mock) or were transduced with VSV-G-BLAM-LVs for 2 hr at 37°C in the absence (None) or presence of a fusion inhibitor (bafilomycin A1, 150 nM). Subsequently, the viral fusion efficiency was estimated by measuring the level of cleaved CCF2 substrate.

transduced in parallel during 2.5 hr with VSV-G-BLAM-LVs. Figure 5A shows that the treatment of hCD34+ cells with cytokines significantly improved the fusion efficiency of VSV-G-BLAM-LVs, on average by 1.5-fold (27–39% of cleaved CCF2+ cells). In addition, cytokines also enhanced the transduction efficiency (Fig. 5B) to the same extent as fusion (16–23% of Δ NGFR+ cells). This result suggests that the effect of cytokines on HSPCs during lentiviral transduction is mainly exerted at the level of entry.

Influence of transduction enhancers on postfusion restrictions observed for VSV-G lentiviral pseudotypes in human CD34+ HSPCs

Most of the gene therapy protocols describing HSPC transduction are currently using a fragment of the human fibronectin protein, called Retronectin, as a transduction enhancer, but the effects of Retronectin on the fusion of lentiviral particles and target cell membranes have never been evaluated. Furthermore, we have recently described the Vectofusin-1 peptide as a strong enhancer of lentiviral adhesion and fusion (Fenard et al., 2013b). Vectofusin-1 acts in a dose-dependent manner and in a solution in the presence of LVs and cells, thus providing a practical system to study the dynamics of LV entry and transduction. To test the influence of Retronectin and Vectofusin-1 on fusion and transduction, various concentrations of VSV-G-BLAM-LVs were used to transduce hCD34+ HSPCs in the absence or presence of the culture additives (Fig. 6A and B). The average F/T ratios calculated for each condition were plotted on a 2D contour chart (Fig. 6C). The lines in the contour chart delineate different F/T ratios ranging from 1–5- to 15–20-fold. The use of increasing concentrations of LV with hCD34+ cells decreases the F/T ratio, suggesting a partial saturation process of postentry restrictions (Fig. 6C). Such effects of increasing concentrations of LVs are also found on Jurkat cells, as observed in Fig. 2. In the presence of Retronectin, the level of lentiviral fusion is not statistically different from the control conditions in the absence of additive (Fig. 6A), whereas a slight effect on transduction is observed (Fig. 6B). Concerning the Vectofusin-1 peptide, the F/T ratio evolves in a more pronounced manner when this additive is added in the hCD34+ cell cultures and depending on the concentration of LV added (Fig. 6C), showing that Vectofusin-1-mediated fusion (Fig. 6A) is able to partially saturate the postentry restrictions without the need to increase LV input. This



FIG. 5. Effect of hCD34+ cell prestimulation on the efficiency of lentiviral fusion and transduction. hCD34+ cells cultured overnight in the absence (Mock) or presence of a cocktail of cytokines (see the Materials and Methods section) were incubated for 2.5 hr with VSV-G-BLAM-LVs (10^8 ig/ml), precoated for 2 hr on plate-bound Retronectin (7 µg/cm²). The viral fusion and transduction efficiency were estimated by measuring the level of cleaved CCF2 substrate (**A**) and the level of Δ NGFR expression (**B**), respectively. Data are obtained from five different cord blood donors in simplicate or duplicate. Bars indicate the mean value of the distributions (**p<0.01, bilateral paired Student's *t*-test).



FIG. 6. Influence of the infectious titers and the transduction enhancers on the *F*/*T* ratio in hCD34+ cells. Fusion **(A)** and transduction **(B)** efficiencies obtained for hCD34+ HSPCs isolated from four independent cord blood donors in the presence of three vector doses of VSV-G-BLAM-LVs and in the absence (None) or presence of Retronectin ($7 \mu g/cm^2$) or Vectofusin-1 (12 $\mu g/ml$). Bars indicate the mean value of the distributions. **(C)** The average *F*/*T* ratios obtained for each condition from **(A)** and **(B)** have been plotted on a 2D contour chart (2D view of the surface chart from above obtained with Microsoft Excel software). The lines in the contour chart delineate different *F*/*T* ratios ranging from 1–5- to 15–20-fold (**p < 0.01, *p < 0.05, bilateral paired Student's *t*-test).

Vectofusin-1 effect on the F/T ratio is observed at the optimal concentration of $12 \,\mu g/ml$, but is also effective at concentrations as low as $6 \,\mu g/ml$ (Supplementary Fig. S1). As shown in Fig. 6, the Retronectin effect does not seem to be optimal when low doses of VSV-G-BLAM-LVs are used. Hence, a high infectious titer of vector (10^8 ig/ml), typically used for transduction of hCD34 + cells in the presence of Retronectin, has been incubated with plate-bound Retronectin and hCD34 + HSPCs during 2 hr (Fig. 7). The fusion



FIG. 7. Influence of plate-bound Retronectin on the lentiviral F/T ratio using high titers of VSV-G-BLAM-LVs. Study of the fusion **(A)** and transduction **(B)** efficiencies of hCD34+ cells with high titers of VSV-G-BLAM-LVs (10^8 ig/ml) in the absence or presence of plate-bound Retronectin ($7 \mu g/cm^2$) for 2 hr. Data are obtained from five different cord blood donors. Bars indicate the mean value of the distributions (*p < 0.05, **p < 0.01, bilateral paired Student's *t*-test).

assay performed in these conditions showed a slight effect of Retronectin on the fusion process, from 37% to 46% (Fig. 7A), while at the same time, the level of transduction was increased by 2-fold from 12% to 24% (Fig. 7B), which constitutes a greater effect. In these conditions, the presence of Retronectin decreased the F/T ratio from 3- to 2-fold.

The concurrent study of the lentiviral fusion and transduction step therefore provides insights on the effects of culture additives such as Vectofusin-1 or Retronectin. Although both improve transduction, they utilize different mechanisms of action, acting mainly on the fusion and consequently on the postfusion steps for Vectofusin-1, while Retronectin seems to act mainly on the postfusion steps.

Discussion

In this report, an HIV-1 viral fusion assay was adapted to study nonreplicative LVs (BLAM-LVs) pseudotyped with the VSV-G envelope GP. The BLAM-LV assay allows the concurrent monitoring of the fusion efficiency between cellular and viral membranes and the determination of the effective transduction level in the same cell population.

The BLAM-LV assay shows that at low vector doses, the fusion of the vector with immortalized T cells or with hCD34+ HSPCs is lot more efficient than the effective transduction level achieved, revealing postentry restrictions in these cells. Using cord blood hCD34+ HSPCs that were either unstimulated or stimulated with mild concentrations of cytokines, the BLAM-LV assay shows that the positive effect of the cytokines on transduction is mainly exerted at the level of entry, probably through plasma membrane reorganization events. Indeed, it has been shown previously that early acting cytokines induce the polarization of plasma membranes and the redistribution of lipid raft markers on HSPCs (Giebel et al., 2004; Yamazaki et al., 2007). We also describe two distinct culture additives that enhance LV transduction through distinct mechanisms of action. For instance, the Vectofusin-1 peptide, derived from the LAH4-L1 transfection agent (Mason et al., 2006; Lam et al., 2012; Fenard et al., 2013a; Kichler et al., 2013), is a new culture additive that potently enhances the fusion and transduction of HSPCs with LVs (Fenard et al., 2013b). Using this additive, postentry restrictions observed in hCD34+ HSPCs were partially overcome much more efficiently than the strategy consisting to use increasing concentrations of vector only. When the effect of the broadly used transduction enhancer Retronectin was studied, the latter was shown to act mainly on postentry restrictions rather than the fusion step per se, potentially a consequence of the stimulation of VLA-4 and VLA-5 cell surface integrins by the Retronectin subdomains CS-1 and cell-binding domain, respectively (Yokota et al., 1998; Horiuchi et al., 2009).

Most of the lentiviral transduction protocols developed for clinical applications are using high concentrations of VSV-G-LVs, with sometimes two rounds of infection to reach the highest level of engraftment of genetically modified target cells in the patient. Despite encouraging results using this approach, it could be of high interest to be able to decrease the quantity of clinical-grade LVs to increase the number of patients that could be treated per clinical batch of vector and to reduce the potential toxicity associated with the manipulation of cells (especially with highly fusogenic VSV-G lentiviral pseudotypes). Studies aiming to improve the postentry steps are therefore of high interest, either through a better understanding of the molecular mechanisms responsible for this restriction or through the developments of compounds than can boost the entry step, or saturate or abrogate the postentry restrictions.

It could also be interesting to study various lentiviral pseudotypes with the BLAM-LV assay. Retargeting of LV entry to cell types of interest using heterologous viral GPs or ligand-fused GPs (Frecha *et al.*, 2008b; Anliker *et al.*, 2010) could be a way to avoid postentry restrictions. For instance, envelope GPs harboring a strong hematopoietic tropism, such as the modified gibbon ape leukemia virus (GALVTR) GP (Christodoulopoulos and Cannon, 2001), the modified

feline endogenous virus (RD114TR) GP (Sandrin *et al.*, 2002), or the Edmonston measles virus hemagglutinin/fusion (H/ F) GP (Frecha *et al.*, 2008a), may behave differently at the level of entry since they are using different target receptors. Of note, the use of H/F-LVs has been shown to efficiently transduce quiescent T and B lymphocytes, a particular feature described as the consequence of the specific interaction of H/F-LVs to both CD46 and SLAM receptors (Frecha *et al.*, 2011).

In conclusion, this BLAM-LV fusion assay is a useful tool (1) to evaluate the degree of postentry restriction for various LV pseudotypes into attractive target cells (e.g., HSPCs and lymphocytes); (2) to determine which cells are targeted during the entry process in comparison with cells that are really transduced in the same bulk population; (3) to better characterize culture additives that are able to improve the adhesion and fusion steps of LVs; and (4) to better define and develop compounds that can attenuate or abrogate the postentry restrictions. All these applications of the BLAM-LV assay will help to improve our knowledge of the lentiviral transduction and lead to the development of more effective transduction protocols for LV-based gene therapies.

Acknowledgments

This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM) and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). We thank Genethon collaborators: in particular, the Flow Cytometry Core for technical assistance, Armelle Viornery for cord blood processing, and Nathalie Holic for critical reading of the article. We are very grateful to the staff of the Maternité de l'hôpital Louise Michel, Evry, France, and the mothers for providing us with UCB samples. We also thank Warner C. Greene for the pCMV4-BlaM-Vpr plasmid and Veronique Parietti for constructing the pRRL-PGK-ΔNGFR.

Author Disclosure Statement

The authors declare no competing financial interests.

References

- Anliker, B., Abel, T., Kneissl, S., et al. (2010). Specific gene transfer to neurons, endothelial cells and hematopoietic progenitors with lentiviral vectors. Nat. Methods 7, 929– 935.
- Bonini, C., Grez, M., Traversari, C., et al. (2003). Safety of retroviral gene marking with a truncated NGF receptor. Nat. Med. 9, 367–369.
- Cavrois, M., De Noronha, C., and Greene, W.C. (2002). A sensitive and specific enzyme-based assay detecting HIV-1 virion fusion in primary T lymphocytes. Nat. Biotechnol. 20, 1151– 1154.
- Cavrois, M., Neidleman, J., Bigos, M., and Greene, W.C. (2004). Fluorescence resonance energy transfer-based HIV-1 virion fusion assay. Methods Mol. Biol. 263, 333–344.
- Charrier, S., Ferrand, M., Zerbato, M., *et al.* (2011). Quantification of lentiviral vector copy numbers in individual hematopoietic colony-forming cells shows vector dose-dependent effects on the frequency and level of transduction. Gene Ther. 18, 479–487.
- Christodoulopoulos, I., and Cannon, P.M. (2001). Sequences in the cytoplasmic tail of the gibbon ape leukemia virus envelope

CONCURRENT STUDY OF LENTIVIRAL FUSION/TRANSDUCTION

protein that prevent its incorporation into lentivirus vectors. J. Virol. 75, 4129–4138.

- Cornetta, K., and Anderson, W.F. (1989). Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated genetransfer: implications for human gene therapy. J. Virol. Methods 23, 187–194.
- Davis, H.E., Rosinski, M., Morgan, J.R., and Yarmush, M.L. (2004). Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. Biophys. J. 86, 1234–1242.
- D'Costa, J., Mansfield, S.G., and Humeau, L.M. (2009). Lentiviral vectors in clinical trials: current status. Curr. Opin. Mol. Ther. 11, 554–564.
- Duggal, N.K., and Emerman, M. (2012). Evolutionary conflicts between viruses and restriction factors shape immunity. Nat. Rev. Immunol. 12, 687–695.
- Fenard, D., Houzet, L., Bernard, E., et al. (2009). Uracil DNA glycosylase 2 negatively regulates HIV-1 LTR transcription. Nucleic Acids Res. 37, 6008–6018.
- Fenard, D., Genries, S., Scherman, D., et al. (2013a). Infectivity enhancement of different HIV-1-based lentiviral pseudotypes in presence of the cationic amphipathic peptide LAH4-L1. J. Virol. Methods 189, 375–378.
- Fenard, D., Ingrao, D., Seye, A., *et al.* (2013b). Vectofusin-1, a new viral entry enhancer, strongly promotes lentiviral transduction of human hematopoietic stem cells. Mol. Ther. Nucleic Acids 2, e90.
- Frecha, C., Costa, C., Negre, D., *et al.* (2008a). Stable transduction of quiescent T cells without induction of cycle progression by a novel lentiviral vector pseudotyped with measles virus glycoproteins. Blood 112, 4843–4852.
- Frecha, C., Szecsi, J., Cosset, F.L., and Verhoeyen, E. (2008b). Strategies for targeting lentiviral vectors. Curr. Gene Ther. 8, 449–460.
- Frecha, C., Levy, C., Costa, C., *et al.* (2011). Measles virus glycoprotein-pseudotyped lentiviral vector-mediated gene transfer into quiescent lymphocytes requires binding to both SLAM and CD46 entry receptors. J. Virol. 85, 5975–5985.
- Giebel, B., Corbeil, D., Beckmann, J., *et al.* (2004). Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells. Blood 104, 2332– 2338.
- Harris, R.S., Hultquist, J.F., and Evans, D.T. (2012). The restriction factors of human immunodeficiency virus. J. Biol. Chem. 287, 40875–40883.
- Horiuchi, Y., Onodera, M., Miyagawa, Y., *et al.* (2009). Kinetics and effect of integrin expression on human CD34(+) cells during murine leukemia virus-derived retroviral transduction with recombinant fibronectin for stem cell gene therapy. Hum. Gene Ther. 20, 777–783.
- Kichler, A., Mason, A.J., Marquette, A., and Bechinger, B. (2013). Histidine-rich cationic amphipathic peptides for plasmid DNA and siRNA delivery. Methods Mol. Biol. 948, 85–103.
- Kondo, E., Mammano, F., Cohen, E.A., and Gottlinger, H.G. (1995). The p6gag domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles. J. Virol. 69, 2759– 2764.
- Lam, J.K., Liang, W., Lan, Y., et al. (2012). Effective endogenous gene silencing mediated by pH responsive peptides proceeds via multiple pathways. J. Control Release 158, 293–303.

- Lau, A., Kanaar, R., Jackson, S.P., and O'Connor, M.J. (2004). Suppression of retroviral infection by the RAD52 DNA repair protein. EMBO J. 23, 3421–3429.
- Lloyd, A.G., Tateishi, S., Bieniasz, P.D., *et al.* (2006). Effect of DNA repair protein Rad18 on viral infection. PLoS Pathog. 2, e40.
- Mason, A.J., Martinez, A., Glaubitz, C., *et al.* (2006). The antibiotic and DNA-transfecting peptide LAH4 selectively associates with, and disorders, anionic lipids in mixed membranes. FASEB J. 20, 320–322.
- Merten, O.W., Charrier, S., Laroudie, N., *et al.* (2011). Large-scale manufacture and characterization of a lentiviral vector produced for clinical *ex vivo* gene therapy application. Hum. Gene Ther. 22, 343–356.
- Naldini, L. (2011). *Ex vivo* gene transfer and correction for cellbased therapies. Nat. Rev. Genet. 12, 301–315.
- Paxton, W., Connor, R.I., and Landau, N.R. (1993). Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. J. Virol. 67, 7229–7237.
- Pernod, G., Fish, R., Liu, J.W., and Kruithof, E.K. (2004). Increasing lentiviral vector titer using inhibitors of protein kinase R. Biotechniques 36, 576–578, 580.
- Pollok, K.E., and Williams, D.A. (1999). Facilitation of retrovirusmediated gene transfer into hematopoietic stem and progenitor cells and peripheral blood T-lymphocytes utilizing recombinant fibronectin fragments. Curr. Opin. Mol. Ther. 1, 595–604.
- Roan, N.R., Munch, J., Arhel, N., et al. (2009). The cationic properties of SEVI underlie its ability to enhance human immunodeficiency virus infection. J. Virol. 83, 73–80.
- Rudoll, T., Phillips, K., Lee, S.W., *et al.* (1996). High-efficiency retroviral vector mediated gene transfer into human peripheral blood CD4+ T lymphocytes. Gene Ther. 3, 695– 705.
- Sandrin, V., Boson, B., Salmon, P., *et al.* (2002). Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. Blood 100, 823–832.
- Santoni de Sio, F.R., Cascio, P., Zingale, A., *et al.* (2006). Proteasome activity restricts lentiviral gene transfer into hematopoietic stem cells and is down-regulated by cytokines that enhance transduction. Blood 107, 4257–4265.
- Santoni de Sio, F.R., Gritti, A., Cascio, P., *et al.* (2008). Lentiviral vector gene transfer is limited by the proteasome at postentry steps in various types of stem cells. Stem Cells 26, 2142–2152.
- Toyoshima, K., and Vogt, P.K. (1969). Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions. Virology 38, 414–426.
- Vogt, P.K. (1967). DEAE-dextran: enhancement of cellular transformation induced by avian sarcoma viruses. Virology 33, 175–177.
- Weil, A.F., Ghosh, D., Zhou, Y., et al. (2013). Uracil DNA glycosylase initiates degradation of HIV-1 cDNA containing misincorporated dUTP and prevents viral integration. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110, E448–E457.
- Wolf, D., and Goff, S.P. (2008). Host restriction factors blocking retroviral replication. Annu. Rev. Genet. 42, 143– 163.
- Wurm, M., Schambach, A., Lindemann, D., et al. (2010). The influence of semen-derived enhancer of virus infection on

the efficiency of retroviral gene transfer. J. Gene Med. 12, 137–146.

- Yamazaki, S., Iwama, A., Morita, Y., *et al.* (2007). Cytokine signaling, lipid raft clustering, and HSC hibernation. Ann. NY Acad. Sci. 1106, 54–63.
- Yoder, K., Sarasin, A., Kraemer, K., *et al.* (2006). The DNA repair genes XPB and XPD defend cells from retroviral infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 4622–4627.
- Yokota, T., Oritani, K., Mitsui, H., *et al.* (1998). Growth-supporting activities of fibronectin on hematopoietic stem/progenitor cells *in vitro* and *in vivo*: structural requirement for fibronectin activities of CS1 and cell-binding domains. Blood 91, 3263–3272.
- Yolamanova, M., Meier, C., Shaytan, A.K., *et al.* (2013). Peptide nanofibrils boost retroviral gene transfer and provide a rapid means for concentrating viruses. Nat. Nanotechnol. 8, 130–136.
- Zhang, J., Attar, E., Cohen, K., *et al.* (2005). Silencing p21(Waf1/ Cip1/Sdi1) expression increases gene transduction efficiency in primitive human hematopoietic cells. Gene Ther. 12, 1444–1452.
- Zhang, J., Scadden, D.T., and Crumpacker, C.S. (2007). Primitive hematopoietic cells resist HIV-1 infection via p21. J. Clin. Invest. 117, 473–481.

Address correspondence to: Dr. David Fenard INSERM UMR_S951 Généthon 1bis, rue de l'Internationale–BP60 F-91002 Evry Cedex France

E-mail: dfenard@genethon.fr

Dr. Anne Galy INSERM UMR_S951 Généthon 1bis, rue de l'Internationale–BP60 F-91002 Evry Cedex France

E-mail: galy@genethon.fr

Received for publication May 1, 2013; accepted after revision October 18, 2013.

Published online: October 23, 2013.

Supplementary Table S1. Six-Plasmid Vector System for VSV-G-BLAM-LV Production

Plasmids	Function / Encoded protein	Plasmid ratio ^a
pKLgagpol	HIV-1 gagpol	13
pKrev	HIV-1 rev	5
pRRL-PGK-NGFR	proviral DNA	20
pMDG	VSV-G envelope	7
pCMV4-BLAM-Vpr	BLAM-Vpr	15
pAdVAntage	PKR inhibitor	7.5

^aPlasmids ratio (μ g) used for the production of VSV-G-BLAM-LV in 293 T cells for a cell culture monolayer of 175 cm². BLAM, β lactamase; LV, lentiviral vector.

Supplementary Data



SUPPLEMENTARY FIG. S1. Influence of the infectious titers and Vectofusin-1 (6 μ g/ml) on the fusion/transduction (*F*/*T*) ratio in hCD34 + cells. Fusion (**A**) and transduction (**B**) efficiencies obtained for hCD34 + hematopoietic stem/ progenitor cells isolated from three independent cord blood donors in the presence of three vector doses of VSV-G-BLAM-LVs and in the absence or presence of 6 μ g/ml of Vectofusin-1. Bars indicate the mean value of the distributions. (**C**) The average *F*/*T* ratios obtained for each condition from (**A**) and (**B**) have been plotted on a 2D contour chart as in Fig. 6. The lines in the contour chart delineate different *F*/*T* ratios ranging from 1–5- to 40–50-fold (**p<0.01, *p<0.05, bilateral paired Student's *t*-test).

Etude structure/fonction des Vectofusins, une nouvelle famille d'additifs de transduction lentivirale

Le peptide Vectofusin-1, dérivé du peptide LAH4-L1 (Fenard et al., 2013a), a été décrit comme étant un additif de culture efficace pour promouvoir la transduction lentivirale de lignées cellulaires et CSPHs (Fenard et al., 2013c). Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de la Vectofusin-1, des études structure/fonction ont été réalisées en étudiant divers peptides isomères et divers peptides mutants de la Vectofusin-1.

Enfin, avant mon arrivée, des études de transduction de CSPHs CD34+ avec divers mutants de la Vectofusin-1 ont permis de montrer l'importance :

(i) des résidus Lysine à l'extrémité N-terminale

 (ii) de l'angle hydrophile de 140° formé par les résidus Histine dans la représentation en hélice de Schiffer-Edmundson

(iii) des résidus hydrophobes Leucine

Lors de la transduction de CSPHs CD34+, j'ai montré que la Vectofusin-1 est le peptide le plus performant parmi une série de 12 isomères, aussi bien avec des pseudotypes VSV-G-LVs que des pseudotypes GALVTR-LVs.

J'ai également montré que la Vectofusin-1 n'était pas efficace pour promouvoir la transduction de lymphocytes T ou B avec des pseudotypes VSV-G-LVs, mais au contraire très efficace avec des pseudotypes GALVTR-LVs.

L'ensemble des résultats est détaillé dans l'article 2 dont je suis première auteure.

_____ 81 **)**_____

ARTICLE 2

"Molecular determinants of Vectofusin-1 and its derivatives for the enhancement of lentivirally mediated gene transfer into hematopoietic stem/progenitor cells"

S. Majdoul, A.K. Seye, A. Kichler, N. Holic, A. Galy, B. Bechinger and D. Fenard

The Journal of Biological Chemistry 291(5):2161-9 (2016) Doi: 10.1074/jbc.M115.675033

_____ **(** 83 **)**_____

Molecular Determinants of Vectofusin-1 and Its Derivatives for the Enhancement of Lentivirally Mediated Gene Transfer into Hematopoietic Stem/Progenitor Cells^{*}

Received for publication, June 29, 2015, and in revised form, December 9, 2015 Published, JBC Papers in Press, December 14, 2015, DOI 10.1074/jbc.M115.675033 Saliha Majdoul^{\pm §¶}, Ababacar K. Seye^{\pm §}, Antoine Kichler^{\parallel **}, Nathalie Holic^{\pm §¶}, Anne Galy^{\pm §}^{\pm}, ^{1,2},

Burkhard Bechinger**^{‡‡1}, and ^(b) David Fenard^{‡§¶3}

From [‡]Généthon, 91000 Evry, France, [§]INSERM UMR_S951, 91000 Evry, France, [¶]University of Evry, 91000 Evry, France, [∥]CNRS, UMR_7199, 67401 Illkirch, France, the ^{**}University of Strasbourg, 67000 Strasbourg, France, and the ⁺⁺Institut de Chimie, CNRS, UMR_7177, 67401 Strasbourg, France

Gene delivery into hCD34+ hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) using human immunodeficiency virus, type 1-derived lentiviral vectors (LVs) has several promising therapeutic applications. Numerous clinical trials are currently underway. However, the efficiency, safety, and cost of LV gene therapy could be ameliorated by enhancing target cell transduction levels and reducing the amount of LV used on the cells. Several transduction enhancers already exist, such as fibronectin fragments or cationic compounds. Recently, we discovered Vectofusin-1, a new transduction enhancer, also called LAH4-A4, a short histidine-rich amphipathic peptide derived from the LAH4 family of DNA transfection agents. Vectofusin-1 enhances the infectivity of lentiviral and γ -retroviral vectors pseudotyped with various envelope glycoproteins. In this study, we compared a family of Vectofusin-1 isomers and showed that Vectofusin-1 remains the lead peptide for HSPC transduction enhancement with LVs pseudotyped with vesicular stomatitis virus glycoproteins and also with modified gibbon ape leukemia virus glycoproteins. By comparing the capacity of numerous Vectofusin-1 variants to promote the modified gibbon ape leukemia virus glycoprotein-pseudotyped lentiviral vector infectivity of HSPCs, the lysine residues on the N-terminal extremity of Vectofusin-1, a hydrophilic angle of 140° formed by the histidine residues in the Schiffer-Edmundson helical wheel representation, hydrophobic residues consisting of leucine were all found to be essential and helped to define a minimal active sequence. The data also show that the critical determinants necessary for lentiviral transduction enhancement are partially different from those necessary for efficient antibiotic or DNA transfection activity of LAH4 derivatives. In conclusion, these results help to

decipher the action mechanism of Vectofusin-1 in the context of hCD34+ cell-based gene therapy.

Lentiviral vectors (LVs)⁴ derived from human immunodeficiency virus, type 1 (HIV-1) are becoming major tools for gene transfer. Numerous clinical trials are currently being conducted, with promising therapeutic effects for the treatment of various diseases such as immune deficiencies, anemias, cancers, neurological disorders, and HIV infection (1). Nevertheless, optimization of clinical protocols is necessary to improve the efficiency, safety, and cost of lentiviral gene therapy.

For LV applications relying on ex vivo transduction of hCD34+ hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs), viral entry represents a critical step: the adhesion and the fusion of viral particles with the plasma membrane of HSPCs (2). Viral entry efficiency is partially dependent on the envelope glycoprotein (GP) used to pseudotype LVs and, therefore, the relative paucity of viral receptors interacting with the GP of choice. Among the first and still widely used GPs for pseudotyping LVs is the vesicular stomatitis virus GP (VSV-G), which has a broad tropism, a consequence of the specific interaction with the recently identified family of low-density lipoprotein receptors (3, 4). VSV-G pseudotypes are defined as pH-dependent vectors because the fusion of viral and cellular membranes requires endosomal acidification during vector trafficking (5). LVs can also be pseudotyped efficiently with other GPs harboring a more specific hematopoietic tropism, such as the modified gibbon ape leukemia virus GP (GALVTR) (6, 7), which has been used in the clinic for treatments of severe combined immunodeficiency (8) or graft versus host disease (9). Contrary to VSV-G, GALVTR pseudotypes are described as pH-independent vectors, meaning that the viral fusion step is independent of endosomal acidification (10) and probably occurs at the cell surface or in early endosomes after interaction with the Pit-1 sodium phosphate symporter (11–13).

Despite the strong capacity of LVs to be pseudotyped with numerous GPs, a highly efficient transduction process usually

SASBMB

^{*} This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (to A. G. and D. F.) and Fondation pour la Recherche Médicale Grant DCM2012-1225742 (to A. G., B. B., and D. F.). This work was also supported by Agence Nationale de la Recherche Projects TRANSPEP 07-PCV-0018 and LabEx Chemistry of Complex Systems 10-LABX-0026_CSC and the RTRA International Center of Frontier Research in Chemistry (to B. B.). The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence may be addressed: Généthon, INSERM UMR_S951, 1bis rue de l'Internationale, 91000 Evry, France. Tel.: 33-69-47-34-40; Fax: 33-69-47-28-38; E-mail: galy@genethon.fr.

³ To whom correspondence may be addressed: Généthon, INSERM UMR_S951, 1bis rue de l'Internationale, 91000 Evry, France. Tel.: 33-69-47-25-31; Fax: 33-69-47-28-38; E-mail: dfenard@genethon.fr.

⁴ The abbreviations used are: LV, Lentiviral vector; VF-1, Vectofusin-1; HIV-1, human immunodeficiency virus, type 1; HSPC, hematopoietic stem/progenitor cell; GP, glycoprotein; VSV-G, Vesicular stomatitis virus glycoprotein; GALVTR, modified gibbon ape leukemia virus glycoprotein; eGFP, enhanced GFP.

requires the addition of culture additives to promote viral entry. Various molecules may be used, such as polymers (e.g. Polybrene (14), DEAE-dextran (15), or poloxamers (16)), cationic lipids (e.g. Lipofectin or Lipofectamine (17, 18)), or cationic peptides/proteins (e.g. fibronectin fragments (19-21), protamine sulfate (22), prostatic acid phosphatase fragments (23), or HIV-1 gp41- and gp120-derived peptides (24, 25)). These mostly cationic additives have the capacity to neutralize membrane charges and promote viral adhesion, viral fusion (2), virus aggregation (26), and/or virus pulldown through the formation of nanofibrillar structures (27). For clinical applications, transduction protocols usually include the human fibronectin fragment CH-296 (also called Retronectin). However, the use of this material is cumbersome both practically and for precise dosage of the additive (coating step), and Retronectin-coated surfaces may reduce the yield of cells obtained after transduction (28). Therefore, the identification of safe, soluble, and easy to manipulate additives with a potent capacity to promote target cell transduction with a broad spectrum of lentiviral pseudotypes, including clinical-grade VSV-G-LVs, remains highly necessary.

Recently, we described a new transduction enhancer, Vectofusin-1 (29), also called LAH4-A4, a short histidine-rich amphipathic peptide derived from the LAH4 family of DNA transfection agents (30-33). Vectofusin-1 promotes the transduction of HSPCs and different cell lines with a broad range of lentiviral and γ -retroviral pseudotypes with no apparent cytotoxicity (29). The enhancing effects of Vectofusin-1 are comparable with those of other viral transduction enhancers, such as semen-derived enhancer of viral infection peptide or Retronectin, a human fibronectin fragment used currently in clinical settings (29). However, the critical determinants of Vectofusin-1 playing a key role in lentiviral transduction enhancement are still unknown. To investigate this question, numerous isomers and mutants of Vectofusin-1 were designed and tested for their capacity to augment lentiviral transduction of human HSPCs, a highly relevant target cell for hematopoietic gene therapy approaches. Because Vectofusin-1 is derived from a family of peptides acting as DNA transfection agents and antibiotic molecules, we also studied whether Vectofusin-1 harbors these diverse functions.

Experimental Procedures

Peptide and Reagents—The LAH4-A4/Vectofusin-1 peptide and its derivatives were produced by standard fluorenyl-methyloxy-carbonyl chloride solid-phase peptide synthesis, purified by preparative reverse-phase HPLC, and analyzed by HPLC and mass spectrometry (Genecust, Dudelange, Luxembourg). 7amino-actinomycin D and trypan blue were obtained from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France).

Cell Line Culture—HCT116 cells derived from a human colorectal carcinoma cell line (CCL-247, ATCC), HeLa cells, HuH7 cells, and HEK293T cells (34) were cultured at 37 °C, 5% CO_2 in DMEM and Glutamax supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Life Technologies).

Viral Vector Production and Vector Titering—LVs were generated by transient calcium phosphate transfection of HEK293T cells with four plasmids: the gagpol (pKLgagpol) and rev (pBA.rev) expression plasmids (34), the transfer plasmid (pCCLsin.cPPT.hPGK.eGFP.WPRE), and the plasmid encoding either the VSV-G (pMDG) or the GALVTR envelope glycoprotein (pBA.GALV/Ampho-Kana) (29). After 24 h of production, raw viral supernatants were harvested, filtered (0.45 μ m), and frozen at -80 °C. The purification of eGFP-expressing VSV-G-LVs, through several membrane-based and chromatographic steps, has been described previously (34). Physical particle titers were determined by measuring HIV-1 p24 capsid contents using a commercial ELISA kit (PerkinElmer Life Sciences). Infectious titers were determined on HCT116 cells using either the detection of eGFP by flow cytometry (FAC-SCalibur, BD Biosciences) with titers expressed as transducing units per milliliter (35) or using quantitative PCR with titers expressed as infectious genome per milliliter (34).

Culture and Transduction of Human Primary Cells-Umbilical cord blood samples were collected with informed consent after uncomplicated births at the Centre Hospitalier Sud Francilien, Evry, France, in accordance with international ethical principles and French national law (bioethics law no. 2011-814) under declaration no. DC-201-1655 to the French Ministry of Research and Higher Studies. Human CD34+ cells were isolated by immunomagnetic selection (Miltenyi Biotec, Paris, France) from the mononuclear cell fraction of umbilical cord blood samples and stored at -80 °C. After thawing, the survival rate of hCD34+ cells was evaluated using the trypan blue exclusion method. Next, preactivation of hCD34+ cells was performed overnight as described previously (2). Preactivated cells were plated in 96-well plates, and transduction was initiated by adding the desired amount of LV particles (2×10^7 infectious genome/ml for highly purified VSV-G-LVs and $1-2 \times 10^6$ transducing units/ml for GALVTR-LVs) mixed with or without LAH4 peptide derivatives (final concentration of $12 \,\mu g/ml$). Six hours post-transduction, reactions were diluted by adding differentiation medium to each well.

Peripheral blood mononuclear cells were isolated from fresh whole blood, purchased from the French Blood Establishment, using Ficoll density gradient centrifugation (Eurobio, Les Ulis, France). Next, peripheral blood mononuclear cells were stimulated with 10 μ g/ml of plate-bound anti-CD3 and anti-CD28 in the presence of 100 IU/ml rIL-2 (Miltenyi Biotec). Transductions of peripheral blood mononuclear cells were performed for 6 h with GALVTR-LVs or VSV-G-LVs (2 × 10⁶ transducing units/ml) in the absence or presence of Vectofusin-1 (12 μ g/ml).

In all primary cells, cellular mortality and transduction efficiency were evaluated, respectively, by 7-amino-actinomycin D labeling and measurement of eGFP expression using flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences) after 4–6 days. Cellular immunophenotyping was performed for hCD45, hCD3, and hCD19 with fluorescently labeled mAbs (BD Biosciences).

Antibacterial Activity—Antibacterial activity of LAH4 derivatives was evaluated as reported previously (32). Briefly, *Escherichia coli* bacteria (DH5 α) grown in Luria Bertani nutrient broth until mid-logarithmic phase were diluted with Luria Bertani nutrient broth to A_{600} 0.15 and aliquoted into 96-well microtiter plates with serial dilutions of LAH4 or Vectofusin-1 peptides and citrate buffer to adjust the pH of the culture to 5.5. After incubating the plates for 6 h at 37 °C with constant shaking, bacterial growth was evaluated by monitoring A_{600} using a spectrophotometer.

DNA Transfection Activity—One microgram of pEGFP-C1 plasmid (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) was complexed with the indicated concentrations of peptide in a 150 mm NaCl solution (100 μ l) for 15 min at room temperature. Next, DNA complexes were added to serum-free DMEM (final volume of 0.25 ml) and transferred into a 48-well plate containing 15 \times 10⁴ cells/well. After incubation for 3 h at 37 °C, the medium was replaced with DMEM containing 10% FCS. eGFP expression was measured 48 h post-transfection using flow cytometry.

Results

Design and Evaluation of Various Vectofusin-1 Isomers for Lentiviral Transduction of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells-Vectofusin-1, also called LAH4-A4, is characterized by the presence of two charged residues (lysine) on both extremities of the peptide sequence (Fig. 1A). Circular dichroism studies have shown that, between these lysine residues, the central core of the peptide sequence, composed of alanine, leucine, and histidine residues, has a strong propensity to form an α -helical structure,⁵ like the prototypic LAH4 peptide (30). To systematically investigate the molecular requirements for efficient transduction enhancement, Vectofusin-1 isomers were designed with different angles subtended by the two pairs of histidine residues (60°-180°) when represented as Schiffer-Edmundson wheels (Fig. 1, C and D) from positions 6-23 (36). As a second variable, the influence of the amino acid composition between the two pairs of adjacent histidine residues was evaluated. These residues either consist of alanine residues for the "LAH4-A" series (Fig. 1, A-C) and leucine residues for the "LAH4-L" series (Fig. 1, B–D), where the nomenclature directly reflects the number of alanine or leucine residues at the corresponding locations (e.g. for LAH4-L1, L1 stand for one leucine between the two pairs of adjacent histidines) (Fig. 1D). The degree of amphipathicity was quantified using the mean helical hydrophobic moment ($\mu_{\rm H}$), calculated with the Heliquest web server (37, 38). Peptides of the LAH4-A series harbor a stronger degree of amphipathicity compared with peptides of the LAH4-L series.

The A and L isomers of Vectofusin-1 were tested for their capacity to modulate the transduction of preactivated hCD34+ HSPCs with low titers of GALVTR-LVs (Fig. 1, *E* and *F*) or VSV-G-LVs (Fig. 1, *G* and *H*). As expected, the transduction of hCD34+ HSPCs with GALVTR-LVs is highly inefficient (around 1%) in the absence of any transduction enhancers (Fig. 1, *E* and *F*). On the contrary, the transduction levels are enhanced in the presence of any members of the LAH4-A or LAH4-L series but to different extents. The strongest effect being observed for Vectofusin-1/LAH4-A4 (Fig. 1*E*). The most efficient peptides on GALVTR infectivity, in either the LAH4-A or LAH4-L series, harbor a hydrophilic angle of 140° (*i.e.* Vectofusin-1/LAH4-A4 and LAH4-L4_{iso}), suggesting that this feature is highly relevant. Furthermore, a high degree of amphipathicity (μ H >0.3) may be crucial because Vectofusin-1 and LAH4-A5 are the most potent peptides in the entire family. These data have been confirmed with dose-response curves showing that Vectofusin-1 is approximately three to four times more efficient than LAH4-L1 (Fig. 2), published previously for its capacity to enhance GALVTR-LVs infectivity (39).

Concerning HSPC transduction with highly purified VSV-G-LVs, the results were strikingly different from those obtained with GALVTR-LVs. Only two peptides significantly improved lentiviral transduction (**, p < 0.01); namely, Vectofusin-1/LAH4-A4 and LAH4-L4_{iso}, the two peptides harboring a hydrophilic angle of 140°. Surprisingly, two peptides, LAH4-A2 and LAH4-A6_{iso}, significantly inhibited lentiviral transduction compared with the baseline in the absence of any culture additive (Fig. 1*G*). For all other peptides, the slight variations in lentiviral transduction efficiency were poor (*, p < 0.05 for LAH4-L0 and LAH4-L3) or not statistically significant.

Critical Determinants of Vectofusin-1 for Lentiviral Transduction Enhancement-To evaluate the specific role of Vectofusin-1 histidine residues on lentiviral transduction enhancement, Ala-scanning mutagenesis was performed (Fig. 3A). LAH2-A4 and LAH2-A6 mutants, containing only two histidine residues, harbor hydrophilic angles of 100° and 140°, respectively (Fig. 3B). Because Vectofusin-1 is highly efficient on GALVTR-LVs, subsequent experiments involving Vectofusin-1 mutants were performed on HSPCs transduced with GALVTR-LVs. As shown in Fig. 3C, the transduction of hCD34+ HSPCs with GALVTR-LVs was comparable in the presence of either LAH2-A6 or Vectofusin-1 with no apparent cytotoxicity (data not shown). On the contrary, LAH2-A4 is not functional. This loss of activity may be due to the presence of a non-optimal angle (100°) subtended by the two histidine residues (Fig. 3B). The total absence of histidine residues (K2-L10A12-K2 peptide) is also highly deleterious, with a more than 80% decrease in lentiviral transduction compared with the Vectofusin-1 condition. Therefore, it seems that histidine residues strongly improve the efficiency of Vectofusin-1 only when the hydrophilic angle subtended by the latter corresponds to 140°.

To better define the role of the lysine residues, at either the N-terminal or the C-terminal extremity of Vectofusin-1, four peptide derivatives were designed (Fig. 4A). As shown in Fig. 4B, transduction of HSPCs with GALVTR-LVs is not detectable in the presence of LAH4-A4-dKn (corresponding to a deletion of N-terminal lysine residues in Vectofusin-1). This absence of transduction is not the consequence of a strong cytotoxic effect (data not shown). The presence of only one lysine residue on the N-terminal extremity of LAH4-A4-K1n is sufficient to restore 60% of the lentiviral transduction level compared with the Vectofusin-1 control. Moreover, Vectofusin-1 activity is not improved by the addition of an extra lysine on the N-terminal extremity (LAH4-A4-K3n peptide) (Fig. 4B). Interestingly, the deletion of both C-terminal lysine residues (LAH4-A4-dKc) slightly decreased the activity to 61%, but the activity was not abrogated as observed when N-terminal lysine deletions were performed.

Next, to identify the minimal active sequence in Vectofusin-1, necessary for an efficient viral transduction enhance-



⁵ S. Majdoul, L. Vermeer, L. Hamon, J. Wolf, A. K. Seye, N. Holic, D. Pastré, D. Stockholm, A. Galy, B. Bechinger, and D. Fenard, manuscript in preparation.

ment, shorter peptides were designed (Fig. 5*A*). As shown in Fig. 5*B*, the deletion of the C-terminal alanine (LAH4-A4-d1aa) has a tendency to decrease peptide efficiency without statistical

significance. Deletion of one amino acid residue on both sides of the peptide (LAH4-A4-d2aa) decreased efficiency to 30% compared with Vectofusin-1. Finally, deletion of two amino





FIGURE 2. **Dose-response curves of LAH4-L1, VF-1/LAH4-A4, and LAH4-A5 on the transduction of human CD34+ cells with GALVTR-LVs.** hCD34+ cells were transduced with GALVTR-LVs in the absence or presence of various concentrations of LAH4-L1, VF-1/LAH4-A4, and LAH4-A5 (3, 6, and 12 μ g/ml). Transduction efficiencies are represented as the mean percentage of eGFP+ cells \pm S.D. (n = 2) obtained 5 days post-transduction.

acid residues from the C-terminal side (LAH4-A4-d2Caa) or three amino acid residues (LAH4-A4-d3aa) or five amino acids residues (LAH4-A4-d5aa) decreased efficiency below 15% (Fig. 5*B*). In conclusion, any attempt to shorten Vectofusin-1 peptide length was detrimental for the promotion of lentiviral transduction of HSPCs.

Evaluation of Vectofusin-1 Activity on Lentiviral Transduction of Human T and B Cells-Because Vectofusin isomers act differently on the transduction of hCD34+ cells depending on the lentiviral pseudotype used, the activity of Vectofusin-1 was evaluated on B and T cells to define the influence of the primary cell type and the lentiviral pseudotype on its transduction enhancer activity. As shown in Fig. 6, Vectofusin-1 enhanced 4-fold the transduction of human B and T cells with GALVTR pseudotypes. However, in the same experiments, Vectofusin-1 was unable to promote the transduction of B and T cells using VSV-G pseudotypes. This result is reminiscent of observations with hCD34+ cells (Fig. 1), showing less efficiency of Vectofusin isomers on VSV-G-LV than with other pseudotypes. Together, these data underline the influence of cell type and lentiviral pseudotype on the transduction enhancer activity of Vectofusin-1 derivatives.

Evaluation of the Antibiotic Activity of Vectofusin-1—Vectofusin-1 is a derivative of the LAH4 peptide, which has antibiotic activity (33, 40–42). This function has never been evaluated on Vectofusin-1. Using a protocol described previously (32), the antibiotic activity of Vectofusin-1 was evaluated on the DH5 α *E. coli* strain. As shown in Fig. 7, the LAH4 control peptide



FIGURE 3. Transduction of hCD34+ cells with GALVTR-LVs in the presence of Vectofusin-1 histidine derivatives. *A*, primary peptide sequences of Vectofusin-1 (*VF-1/LAH4-A4*), LAH2-A4, LAH2-A6, and K2-L10-A12-K2. *B*, Schiffer-Edmundson's helical wheel representation of the amphipathic α -helical region (amino acids 6–23) of VF-1 histidine derivatives. The peptide name and the polar angle formed by the hydrophilic histidine residues (*underlined*) are mentioned in the wheel projection. *C*, hCD34+ cells were transduced with GALVTR-LVs in the absence (*none*) or presence of VF-1 histidine derivatives (12 μ g/ml). Transduction efficiencies are expressed as the percentage of the VF-1 control condition. Data are the mean \pm S.D. of two experiments performed in duplicate. ***, *p* < 0.001; paired Student's *t* test.

strongly inhibited bacterial growth above 12 μ g/ml, whereas Vectofusin-1 was not able to affect bacterial growth, even at concentrations as high as 100 μ g/ml. Interestingly, LAH4 was highly inefficient for the enhancement of HSPC transduction with either GALVTR-LVs or VSV-G-LVs (data not shown). These data underline the fact that these two functions likely rely on different critical molecular determinants.

FIGURE 1. Lentiviral transduction of hCD34 + cells in the presence of Vectofusin-1 isomers. *A* and *B*, primary peptide sequences of Vectofusin-1 isomers of the LAH4-A series (*A*) or the LAH4-L series (*B*). *C* and *D*, Schiffer-Edmundson helical wheel representations of the putative amphipathic α -helical region (residues 6–23) of LAH4-A (*C*) and LAH4-L peptides (*D*). The peptide name, the polar angle formed by the hydrophilic histidine residues (*underlined*), and the hydrophobic moment are shown inside the wheel projections. *E*-*H*, preactivated hCD34+ cells were transduced with GALVTR-LVs (*E* and *F*) or VSV-G-LVs (*G* and *H*) in the absence (*none*) or presence of Vectofusin-1 isomers of the LAH4-A (*E* and *G*) or LAH4-L series (*F* and *H*). Transduction efficiencies were measured by monitoring eGFP expression. Data are expressed as the mean \pm S.D. of three (*G* and *H*) to four (*E* and *F*) independent experiments performed in duplicate. ***, p < 0.001; **, p < 0.01; *, p < 0.01; *, p < 0.05; ns, not significant; Student's *t* test.





FIGURE 4. Transduction of hCD34+ cells with GALVTR-LVs in the presence of Vectofusin-1 lysine derivatives. *A*, primary peptide sequences of VF-1/LAH4-A4, LAH4-A4-dKn, LAH4-A4-K1n, LAH4-A4-K3n, and LAH4-A4-dKc. *B*, hCD34+ cells were transduced with GALVTR-LVs in the absence (*none*) or presence of VF-1 lysine derivatives (12 μ g/ml). Transduction efficiencies are expressed as the percentage of the VF-1 control condition. Data are the mean \pm S.D. of two experiments performed in duplicate. ***, *p* < 0.001; **, *p* < 0.01; paired-Student's *t* test.

Α



В



FIGURE 5. Transduction of hCD34+ cells with GALVTR-LVs in the presence of Vectofusin-1 length derivatives. *A*, primary peptide sequences of VF-1/LAH4-A4, LAH4-A4-d1aa, LAH4-A4-d2aa, LAH4-A4-d2Caa, and LAH4-A4-d5aa. *B*, hCD34+ cells were transduced with GALVTR-LVs in the absence (*none*) or presence of VF-1 length derivatives (12 μ g/ml). Transduction efficiencies are expressed as the percentage of the VF-1 control condition. Data are the mean \pm S.D. of two experiments performed in duplicate. ***, *p* < 0.001; paired Student's *t* test.

Cell Line Transfection with Vectofusin-1 Derivatives—LAH4 derivatives have been described previously as nucleic acid transfection agents (31–33, 43). Therefore, we tested the capacity of Vectofusin-1 and some derivatives to transfect 293T cells with an eGFP-expressing plasmid. As shown in Fig. 8A, 12 μ g/ml of Vectofusin-1 was not sufficient to efficiently promote the transfection of 293T cells. However, an increase in Vectofusin-1 concentration to 24 μ g/ml allowed highly efficient



FIGURE 6. Vectofusin-1 activity on lentiviral transduction of human T cells and B cells. CD3/CD28-activated peripheral blood mononuclear cells were transduced for 6 h with GALVTR-LVs or VSV-G-LVs (2×10^6 transducing units/ml) in the absence or presence of Vectofusin-1 ($12 \mu g$ /ml). After 3–4 days, transduction levels were evaluated in T and B cells by monitoring eGFP expression using flow cytometry. Data are represented as the -fold of transduction normalized to the control condition (in absence of Vectofusin-1). 1-fold corresponds to transduction levels of 3%, 6%, 12%, and 4% for T cell/GALVTR, B cell/GALVTR, T cell/GALVTR, G conditions respectively. Data are the average \pm S.E. of *n* experiments performed in duplicate. ****, p < 0.0001; *ns*, not significant; paired-Student's t test.



FIGURE 7. **Evaluation of the antibiotic activity of Vectofusin-1.** DH5 α bacteria were incubated with increasing concentrations of LAH4 or Vectofusin-1 peptide in pH 5.5-buffered Luria Bertani nutrient broth. Bacterial growth was evaluated by optic density after 6 h. Data are represented as the mean \pm S.D. of two independent experiments performed in duplicate.

transfection of 293T cells. Next, this optimal concentration of Vectofusin-1 was used to transfect various cell lines. As shown in Fig. 8B, Vectofusin-1 is capable of promoting the transfection of all cell lines tested, although to a different extent. Because the histidine residues have been described previously to be essential for DNA transfection (44), we evaluated the transfection activity of Vectofusin-1 histidine mutants on 293T cells. As expected, the absence of histidine residues in the K2-L10A12-K2 peptide is highly detrimental. The presence of only two histidine residues in LAH2-A4 (hydrophilic angle of 100°) is sufficient to restore transfection activity (Fig. 8C). However, the presence of two histidine residues forming a hydrophilic angle of 140° in LAH2-A6 restores only a third of the baseline activity of Vectofusin-1, suggesting that not only the presence but also the position of the histidine residues are crucial for DNA transfection efficacy.

Discussion

In this study, using a series of isomers and mutants, we investigated the structure-function characteristics of Vectofusin-1, also called LAH4-A4, that determine its capacity to promote


FIGURE 8. DNA plasmid transfection of different cell lines using Vectofusin-1 and some derivatives. *A*, the eGFP-expressing plasmid was mixed with 12, 18, 24 or 36 µg/ml of Vectofusin-1. Next, the DNA/peptide mixture was diluted in 200 µl of DMEM without FCS and loaded onto cell monolayers. 3 h post-transfection, the medium was replaced with DMEM containing 10% FCS. 48 h later, transfection efficiencies were estimated by monitoring eGFP expression using flow cytometry. Data are the mean \pm S.D. of two independent experiments performed in duplicate. *B*, HCT116, HeLa, Huh7, and 293T cells were transfected as in *A* in the presence of 24 µg/ml of Vectofusin-1. Data are represented as the mean \pm S.E. of three independent experiments performed in duplicate. *C*, 293T cells were transfected as in *A* but in the absence (*NaCl*) or presence of 24 µg/ml of LAH4-L1 (*n* = 5), Vectofusin-1 (*n* = 5), LAH2-A6 (*n* = 3), LAH2-A4 (*n* = 3), or K2-L10-A12-K2 peptide (*n* = 2). Data are represented as the mean \pm S.E. of *n* independent experiments performed in duplicate. **, *p* < 0.01; *, *p* < 0.05; Student's t test.

lentiviral transduction in HSPCs. All Vectofusin-1 isomers tested were capable of promoting HSPCs transduction with GALVTR-LVs, although to a different extent, with Vectofusin-1 being the most potent transduction enhancer. Interestingly, transduction experiments performed with the broadly used VSV-G-LVs showed slightly different results. Vectofusin-1 was still the most potent culture additive, but some

Molecular Determinants of Vectofusin-1 and Its Derivatives

Vectofusin-1 isomers were either ineffective (e.g. LAH4-L1) or capable of partially inhibiting the baseline level of HSPC transduction (e.g. LAH4-A2, LAH4-A6_{iso}). Although Vectofusin-1 was capable of increasing 4-fold the transduction level of B cells and activated T cells using GALVTR pseudotypes or, as shown previously, using RD114TR pseudotypes (45), it was ineffective on the same cells using VSV-G pseudotypes. The GALVTR and VSV-G envelope glycoproteins lead to different viral entry pathways: a pH-independent and pH-dependent route, respectively (5, 10). This feature is likely responsible for the transduction variability observed between these lentiviral pseudotypes in the presence of Vectofusin-1 isomers. In the case of VSV-G pseudotypes, Vectofusin-1 isomers probably traffick with LVs from the plasma membrane surface (neutral pH) to acidified endosomes (below pH 6), leading to the protonation of all histidine residues. This change in the global charge of Vectofusin-1 isomers in the late endosome is accompanied by profound changes in physicochemical properties, such as their hydrophobic moment. These alterations certainly result in changes of the molecular and supramolecular structures of the peptide, similar to the transition from transmembrane to an in-plane configuration in lipid bilayers, as observed previously for the prototypic LAH4 peptide (46, 47). In contrast to the pH-independent GALVTR pseudotype, viral fusion with the plasma membrane or early endosomes occurs before endosomal acidification (10).

Overall, Vectofusin-1 and the LAH4-L4_{iso} peptide, harboring a polar angle of 140° formed by the histidine residues in the Schiffer-Edmundson wheel representation, were the most efficient peptides in the A and L series, respectively. Furthermore, using histidine mutants of Vectofusin-1, only LAH2-A6, composed of two histidine residues with a polar angle of 140°, was still efficient on lentiviral transduction and not the LAH2-A4 harboring a polar angle of 100°. It has been shown previously that the polar angle is one of the critical parameters for amphipathic peptide activities, especially for lipid interactions and the concomitant antibacterial (48-50) and transfection activities (33). Interestingly, the K2-L10A12-K2 peptide, corresponding to Vectofusin-1, in which all histidine residues are substituted by alanine residues, was still able to promote 17% of HSPC transduction. Therefore, histidine residues strongly improve Vectofusin-1 efficacy but are not strictly necessary to promote HSPC transduction with GALVTR-LV. We have also shown the critical role of lysine residues located on the N-terminal extremity and the less important role of C-terminal lysine residues. Another parameter, the hydrophobic moment ($\mu_{\rm H}$), is one of the highest for the Vectofusin-1 peptide ($\mu_{\rm H}$ 0.342) among the family of isomers. We increased this parameter by substituting all the leucine residues with isoleucine residues (i.e. IAH4-A4 peptide; $\mu_{\rm H}$, 0.365), but it resulted in a complete loss of activity on lentiviral vectors (data not shown), suggesting that the choice of leucine as hydrophobic residue is critical.

Notably, all sequences tested here that were shorter than the actual Vectofusin-1 sequence lost much of the transduction activity. It is possible that the transmembrane orientation plays a crucial role in Vectofusin-1 activity. It has been reported that an average of 21 amino acids residues is necessary to form a typical transmembrane domain in lipid bilayers (51), exactly



Molecular Determinants of Vectofusin-1 and Its Derivatives

the number of amino acid residues that are present between the charged lysine residues of Vectofusin-1.

In addition to its strong activity on lentiviral transduction, Vectofusin-1 is capable of promoting DNA transfection as efficiently as the LAH4-L1 prototype, but this function requires higher concentrations of peptide. Interestingly, the LAH2-A4 peptide is not capable of promoting lentiviral transduction, whereas, at the same time, it retains a high capacity to promote DNA transfection in cell lines, arguing for the fact that these two functions rely on different molecular determinants. Last but not least, Vectofusin-1 strongly promotes lentiviral transduction but has no antibiotic activity against *E. coli*, whereas the opposite is observed with the prototypic LAH4 peptide.

In conclusion, in the family of LAH4 histidine-rich cationic amphipathic peptides, LAH4-A4/Vectofusin-1 is the leading peptide for the promotion of viral transduction. Interestingly, the molecular requirements for the antibiotic, DNA transfection, and viral transduction functions of LAH4 derivatives seem to rely on different molecular determinants that are still to be defined.

Author Contributions—S. M. and A. K. S. conducted the experiments. S. M., A. K. S., N. H., and D. F. performed data analyses. A. K. and B. B. contributed new reagents. A. K., A. G., and B. B. contributed to the writing of the paper. D. F. designed the study and wrote the paper.

Acknowledgments—We thank Genethon collaborators, especially the Standardized Production Department, for highly purified lentiviral vector production, Julien Buisset and Sharon Biton for technical assistance, and Armelle Viornery for cord blood processing. We also thank the mothers and staff of the Center Hospitalier Sud Francilien (Evry, France) for umbilical cord blood samples.

References

- 1. Sakuma, T., Barry, M. A., and Ikeda, Y. (2012) Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem. J.* **443**, 603–618
- Ingrao, D., Majdoul, S., Seye, A. K., Galy, A., and Fenard, D. (2014) Concurrent measures of fusion and transduction efficiency of primary CD34+ cells with human immunodeficiency virus 1-based lentiviral vectors reveal different effects of transduction enhancers. *Hum. Gene Ther. Methods* 25, 48–56
- Amirache, F., Lévy, C., Costa, C., Mangeot, P. E., Torbett, B. E., Wang, C. X., Nègre, D., Cosset, F. L., and Verhoeyen, E. (2014) Mystery solved: VSV-G-LVs do not allow efficient gene transfer into unstimulated T cells, B cells, and HSCs because they lack the LDL receptor. *Blood* 123, 1422–1424
- Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S., and Rubinstein, M. (2013) LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 7306–7311
- Aiken, C. (1997) Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A. J. Virol. 71, 5871–5877
- Sandrin, V., Boson, B., Salmon, P., Gay, W., Nègre, D., Le Grand, R., Trono, D., and Cosset, F. L. (2002) Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* 100, 823–832
- 7. Christodoulopoulos, I., and Cannon, P. M. (2001) Sequences in the cytoplasmic tail of the gibbon ape leukemia virus envelope protein that prevent its incorporation into lentivirus vectors. *J. Virol.* **75**, 4129–4138

- Gaspar, H. B., Cooray, S., Gilmour, K. C., Parsley, K. L., Zhang, F., Adams, S., Bjorkegren, E., Bayford, J., Brown, L., Davies, E. G., Veys, P., Fairbanks, L., Bordon, V., Petropoulou, T., Petropolou, T., Kinnon, C., and Thrasher, A. J. (2011) Hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency leads to long-term immunological recovery and metabolic correction. *Sci. Transl. Med.* 3, 97ra80
- Zhan, H., Gilmour, K., Chan, L., Farzaneh, F., McNicol, A. M., Xu, J. H., Adams, S., Fehse, B., Veys, P., Thrasher, A., Gaspar, H., and Qasim, W. (2013) Production and first-in-man use of T cells engineered to express a HSVTK-CD34 sort-suicide gene. *PloS ONE* 8, e77106
- Liang, M., Morizono, K., Pariente, N., Kamata, M., Lee, B., and Chen, I. S. (2009) Targeted transduction via CD4 by a lentiviral vector uses a clathrin-mediated entry pathway. *J. Virol.* 83, 13026–13031
- Kavanaugh, M. P., Miller, D. G., Zhang, W., Law, W., Kozak, S. L., Kabat, D., and Miller, A. D. (1994) Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 7071–7075
- O'Hara, B., Johann, S. V., Klinger, H. P., Blair, D. G., Rubinson, H., Dunn, K. J., Sass, P., Vitek, S. M., and Robins, T. (1990) Characterization of a human gene conferring sensitivity to infection by gibbon ape leukemia virus. *Cell Growth Differ.* 1, 119–127
- Olah, Z., Lehel, C., Anderson, W. B., Eiden, M. V., and Wilson, C. A. (1994) The cellular receptor for gibbon ape leukemia virus is a novel high affinity sodium-dependent phosphate transporter. *J. Biol. Chem.* 269, 25426-25431
- Toyoshima, K., and Vogt, P. K. (1969) Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions. *Virology* 38, 414-426
- Vogt, P. K. (1967) DEAE-dextran: enhancement of cellular transformation induced by avian sarcoma viruses. *Virology* 33, 175–177
- Höfig, I., Atkinson, M. J., Mall, S., Krackhardt, A. M., Thirion, C., and Anastasov, N. (2012) Poloxamer synperonic F108 improves cellular transduction with lentiviral vectors. *J. Gene Med.* 14, 549–560
- 17. Hodgson, C. P., and Solaiman, F. (1996) Virosomes: cationic liposomes enhance retroviral transduction. *Nat. Biotechnol.* **14**, 339–342
- Innes, C. L., Smith, P. B., Langenbach, R., Tindall, K. R., and Boone, L. R. (1990) Cationic liposomes (Lipofectin) mediate retroviral infection in the absence of specific receptors. *J. Virol.* 64, 957–961
- Hanenberg, H., Xiao, X. L., Dilloo, D., Hashino, K., Kato, I., and Williams, D. A. (1996) Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat. Med.* 2, 876–882
- Moritz, T., Dutt, P., Xiao, X., Carstanjen, D., Vik, T., Hanenberg, H., and Williams, D. A. (1996) Fibronectin improves transduction of reconstituting hematopoietic stem cells by retroviral vectors: evidence of direct viral binding to chymotryptic carboxy-terminal fragments. *Blood* 88, 855–862
- Moritz, T., Patel, V. P., and Williams, D. A. (1994) Bone marrow extracellular matrix molecules improve gene transfer into human hematopoietic cells via retroviral vectors. *J. Clin. Invest.* 93, 1451–1457
- 22. Cornetta, K., and Anderson, W. F. (1989) Protamine sulfate as an effective alternative to Polybrene in retroviral-mediated gene-transfer: implications for human gene therapy. *J. Virol. Methods* **23**, 187–194
- 23. Wurm, M., Schambach, A., Lindemann, D., Hanenberg, H., Ständker, L., Forssmann, W. G., Blasczyk, R., and Horn, P. A. (2010) The influence of semen-derived enhancer of virus infection on the efficiency of retroviral gene transfer. *J. Gene Med.* **12**, 137–146
- Yolamanova, M., Meier, C., Shaytan, A. K., Vas, V., Bertoncini, C. W., Arnold, F., Zirafi, O., Usmani, S. M., Müller, J. A., Sauter, D., Goffinet, C., Palesch, D., Walther, P., Roan, N. R., Geiger, H., Lunov, O., Simmet, T., Bohne, J., Schrezenmeier, H., Schwarz, K., Ständker, L., Forssmann, W. G., Salvatella, X., Khalatur, P. G., Khokhlov, A. R., Knowles, T. P., Weil, T., Kirchhoff, F., and Münch, J. (2013) Peptide nanofibrils boost retroviral gene transfer and provide a rapid means for concentrating viruses. *Nat. Nanotechnol.* 8, 130–136
- Zhang, L., Jiang, C., Zhang, H., Gong, X., Yang, L., Miao, L., Shi, Y., Zhang, Y., Kong, W., Zhang, C., and Shan, Y. (2014) A novel modified peptide derived from membrane-proximal external region of human immunode-

Molecular Determinants of Vectofusin-1 and Its Derivatives

ficiency virus type 1 envelope significantly enhances retrovirus infection. *J. Pept. Sci.* **20,** 46–54

- Davis, H. E., Rosinski, M., Morgan, J. R., and Yarmush, M. L. (2004) Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophys. J.* 86, 1234–1242
- 27. Meier, C., Weil, T., Kirchhoff, F., and Münch, J. (2014) Peptide nanofibrils as enhancers of retroviral gene transfer. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **6**, 438–451
- Lamers, C. H., van Elzakker, P., van Steenbergen, S. C., Sleijfer, S., Debets, R., and Gratama, J. W. (2008) Retronectin-assisted retroviral transduction of primary human T lymphocytes under good manufacturing practice conditions: tissue culture bag critically determines cell yield. *Cytotherapy* 10, 406–416
- Fenard, D., Ingrao, D., Seye, A., Buisset, J., Genries, S., Martin, S., Kichler, A., and Galy, A. (2013) Vectofusin-1, a new viral entry enhancer, strongly promotes lentiviral transduction of human hematopoietic stem cells. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2, e90
- Georgescu, J., Munhoz, V. H., and Bechinger, B. (2010) NMR structures of the histidine-rich peptide LAH4 in micellar environments: membrane insertion, pH-dependent mode of antimicrobial action, and DNA transfection. *Biophys. J.* 99, 2507–2515
- Kichler, A., Leborgne, C., Danos, O., and Bechinger, B. (2007) Characterization of the gene transfer process mediated by histidine-rich peptides. *J. Mol. Med.* 85, 191–201
- Kichler, A., Leborgne, C., März, J., Danos, O., and Bechinger, B. (2003) Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 1564–1568
- Mason, A. J., Martinez, A., Glaubitz, C., Danos, O., Kichler, A., and Bechinger, B. (2006) The antibiotic and DNA-transfecting peptide LAH4 selectively associates with, and disorders, anionic lipids in mixed membranes. *FASEB J.* 20, 320–322
- 34. Merten, O. W., Charrier, S., Laroudie, N., Fauchille, S., Dugué, C., Jenny, C., Audit, M., Zanta-Boussif, M. A., Chautard, H., Radrizzani, M., Vallanti, G., Naldini, L., Noguiez-Hellin, P., and Galy, A. (2011) Large-scale manufacture and characterization of a lentiviral vector produced for clinical *ex vivo* gene therapy application. *Hum. Gene Ther.* **22**, 343–356
- Kutner, R. H., Zhang, X. Y., and Reiser, J. (2009) Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nat. Protoc.* 4, 495–505
- Schiffer, M., and Edmundson, A. B. (1967) Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophys. J.* 7, 121–135
- Eisenberg, D., Weiss, R. M., and Terwilliger, T. C. (1982) The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature* 299, 371–374
- Gautier, R., Douguet, D., Antonny, B., and Drin, G. (2008) HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α-helical properties. *Bioinformatics* 24, 2101–2102

- Fenard, D., Genries, S., Scherman, D., Galy, A., Martin, S., and Kichler, A. (2013) Infectivity enhancement of different HIV-1-based lentiviral pseudotypes in presence of the cationic amphipathic peptide LAH4-L1. *J. Virol. Methods* 189, 375–378
- 40. Vogt, T. C., and Bechinger, B. (1999) The interactions of histidine-containing amphipathic helical peptide antibiotics with lipid bilayers: the effects of charges and pH. *J. Biol. Chem.* **274**, 29115–29121
- Mason, A. J., Gasnier, C., Kichler, A., Prévost, G., Aunis, D., Metz-Boutigue, M. H., and Bechinger, B. (2006) Enhanced membrane disruption and antibiotic action against pathogenic bacteria by designed histidinerich peptides at acidic pH. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3305–3311
- 42. Mason, A. J., Moussaoui, W., Abdelrahman, T., Boukhari, A., Bertani, P., Marquette, A., Shooshtarizaheh, P., Moulay, G., Boehm, N., Guerold, B., Sawers, R. J., Kichler, A., Metz-Boutigue, M. H., Candolfi, E., Prévost, G., and Bechinger, B. (2009) Structural determinants of antimicrobial and antiplasmodial activity and selectivity in histidine-rich amphipathic cationic peptides. J. Biol. Chem. 284, 119–133
- Langlet-Bertin, B., Leborgne, C., Scherman, D., Bechinger, B., Mason, A. J., and Kichler, A. (2010) Design and evaluation of histidine-rich amphipathic peptides for siRNA delivery. *Pharm. Res.* 27, 1426–1436
- Kichler, A., Mason, A. J., and Bechinger, B. (2006) Cationic amphipathic histidine-rich peptides for gene delivery. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 301–307
- 45. Marin, V., Corna, S., Giuliani, E., Scavullo, C., Bossi, S., Bordignon, C., Galy, A., Rizzardi, G. P., Fenard, D., and Bovolenta, C. (2015) Vectofusin-1 significantly enhances transduction of *ex vivo* activated T cells with RD114-TR-pseudotyped lentiviral vectors derived from the RD3-Mol-Pack stable packaging cells. *Mol. Ther.* 23, S217-S217
- Bechinger, B. (1996) Towards membrane protein design: pH-sensitive topology of histidine-containing polypeptides. *J. Mol. Biol.* 263, 768–775
- Bechinger, B., Kinder, R., Helmle, M., Vogt, T. C., Harzer, U., and Schinzel, S. (1999) Peptide structural analysis by solid-state NMR spectroscopy. *Biopolymers* 51, 174–190
- 48. Uematsu, N., and Matsuzaki, K. (2000) Polar angle as a determinant of amphipathic α -helix-lipid interactions: a model peptide study. *Biophys. J.* **79**, 2075–2083
- Dathe, M., Wieprecht, T., Nikolenko, H., Handel, L., Maloy, W. L., Mac-Donald, D. L., Beyermann, M., and Bienert, M. (1997) Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Lett.* **403**, 208–212
- Wieprecht, T., Dathe, M., Epand, R. M., Beyermann, M., Krause, E., Maloy, W. L., MacDonald, D. L., and Bienert, M. (1997) Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides. *Biochemistry* 36, 12869–12880
- Senes, A., Gerstein, M., and Engelman, D. M. (2000) Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions. *J. Mol. Biol.* 296, 921–936

JANUARY 29, 2016 • VOLUME 291 • NUMBER 5



Etude du peptide inducteur d'autophagie et facteur antiviral Tat-Beclin1: Définition de Tat-Beclin1 comme un nouvel additif capable de promouvoir la transduction lentivirale

Introduction:

Un grand nombre de publications dans la littérature montrent d'une part, un lien complexe entre l'autophagie et certains virus, notamment le VIH-1, et d'autre part, un rôle essentiel de l'autophagie dans la biologie des CSPHs. L'autophagie, est un mécanisme cellulaire hautement régulé, permettant la survie programmée en période de stress cellulaire, et ceci par le biais d'une dégradation d'une partie des organelles cytoplasmiques par les lysosomes de la cellule. La protéine Beclin 1 est connue pour être un inducteur majeur de l'autophagie. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'autophagie est décrite comme pouvant avoir un rôle antiviral sur les virus réplicatifs (VIH-1, Sindbis virus, West Nile virus, Chikungunya...) (Dinkins et al., 2015; Kobayashi et al., 2014; Shoji-Kawata et al., 2013; Tang et al., 2012). Au-delà du rôle antiviral, de nombreuses études ont aussi montré que les protéines liées à l'autophagie sont provirales au niveau des premières étapes de l'infection par le VIH-1.

De façon très intéressante, dans les CSPHs, l'autophagie a un rôle protecteur et régulateur des propriétés de quiescence et de survie des cellules souches. A la vue de ces éléments, mon projet de thèse a eu pour objectif d'évaluer l'influence du peptide inducteur d'autophagie, le peptide Tat-Beclin1, sur la transduction lentivirale des CSPHs humaines. Comme expliqué dans l'introduction (Partie2-III), ce peptide chimérique est la fusion entre le peptide de transduction Tat, qui permet de traverser les membranes, et un fragment de la protéine humaine Beclin-1, protéine cruciale dans plusieurs mécanismes cellulaires. La translocation intracellulaire du peptide Tat-Beclin1 favorise la libération de Beclin-1, séquestrée dans le Golgi par la protéine GAPR-1 (Golgi-associated plant-pathogenesis protein-1) et déclenche ainsi la voie de l'autophagie, conduisant à une inhibition de la réplication de plusieurs agents pathogènes, notamment le VIH-1 (Shoji-Kawata et al., 2013).Notre hypothèse de travail est de tester l'influence du peptide Tat-Beclin1 sur la transduction lentivirale sachant que les LVs recombinants, contrairement aux virus sauvages, sont non réplicatifs.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse sur ce projet ont fait l'objet d'un brevet déposé auprès de l'Office Européen des Brevets le 03/12/2015 (Majdoul and Fenard, 2015) dans lequel je suis co-inventrice.

Matériels et méthodes :

Peptide et réactifs

La Vectofusin-1 (séquence: KKALLHAALAHLLALAHHLLALLKKA-NH2), Tat-Scrambled, Tat-Beclin1 (séquence: YGRKKRRQRRRGGVGNDFFINHETTGFATEW) et ses peptides dérivés ont été produits par synthèse peptidique en phase solide de chloride fluorenylmethyloxy-carbonyl, purifié par HPLC en phase inverse, et analysés par HPLC et spectrométrie de masse (Genecust, Dudelange, Luxembourg). Le 7-amino-actinomycin D (7-AAD), la Bafilomycin A1, le Bleu de Trypan et le Triton X-100 ont été obtenus chez Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France).

Lignées cellulaires

Les cellules HCT116 sont des cellules tumorales humaines issues d'un cancer du côlon (CCL-247; ATCC, Manassas, VA). Les cellules HEK293T sont des cellules immortalisées dérivées de cellule de rein embryonnaire humain (Merten et al., 2011). Ces deux lignées sont cultivées dans du milieu DMEM, 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF), 1% de Pénicilline/Streptomycin et 1% de Glutamine.

Production et titration de vecteurs viraux

Les vecteurs lentiviraux sont générés comme décrit précédemment (Fenard et al., 2013b). Les cellules HEK293T ont été transfectées, en utilisant la technique de précipitation au phosphate de calcium, avec quatre plasmides : les plasmides d'expression gagpol (pKLgagpol) et rev (PKrev), le plasmide de transfert (pCCLsincPPT.hPGK.eGFP.WPRE) et le plasmide codant pour soit pour la glycoprotéine d'enveloppe VSV-G (pMDG), GALVTR (pBA.GALV/Ampho-Kana) ou RD114TR (pHCMV-RD114TR). Après 24h de production, les surnageants viraux bruts ont été récoltés, filtrés (0,45 µm) et conservés à -80°C. Les vecteurs VSV-G-LVs purifiés exprimant la GFP, ont subi plusieurs étapes de purification suivant un procédé clinique, comme décrit précédemment (Merten et al., 2011). Les titres en particules physiques ont été déterminés par la quantification par ELISA du nombre de

protéines de capside p24 du VIH-1 présente dans le surnageant en utilisant un kit ELISA commercial (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France).

Les titres infectieux sont déterminés en infectant des cellules HCT116 avec des dilutions sérielles de vecteur et en suivant par la suite le niveau d'expression de la GFP par cytométrie en flux (FACSCalibur, BD Bioscience, Le Pont de Claix, France). Les titres sont exprimés en unités de transduction par millilitre (TU/mL) (Kutner et al., 2009). Une autre approche consiste à quantifier le nombre de copies de vecteur intégrées dans le génome des HCT116 en utilisant la Q-PCR ; les titres sont alors exprimés en génomes infectieux par millilitre (ig/mL) (Merten et al., 2011).

Culture et transduction de cellules CSPHs CD34+

Les échantillons de sang de cordon ombilical ont été obtenus après des naissances non compliquées (Maternité de l'hôpital d'Evry Sud Francilien) et en accord avec les principes éthiques et le droit national français sous déclaration N° DC-201-1655 au ministère français de la recherche et des études supérieures. Les cellules CD34+ sont isolées par sélection immunomagnétique (Miltenyi Biotec, Paris, France). Le niveau de survie des cellules hCD34+ fraîches ou congelées est évalué par la méthode d'exclusion au bleu de Trypan. Ensuite, la préactivation des cellules hCD34+ est réalisée sur la nuit comme décrit précédemment (Ingrao et al., 2014). Les cellules préactivées sont ensemencées dans des plaques 96 puits et la transduction est initiée en ajoutant la quantité désirée de particules lentivirales en absence ou présence des peptides d'intérêt. 6h post-transduction, les milieux de transduction sont dilués en ajoutant du milieu de différenciation dans chaque puits. Après 4 à 6 jours, la mortalité cellulaire et l'efficacité de transduction sont évaluées respectivement par marquage 7-AAD et mesure de l'expression de la GFP par cytométrie en flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

Test d'agrégation virale "Viral pull down assay"

La sédimentation des particules lentivirales en présence des additifs de culture a été adapté du protocole décrit précédemment par l'équipe de Yolamanova (Yolamanova et al., 2013). Le surnageant de particules VSV-G-LVs a été dilué à 100ng/mL de protéine p24 dans du milieu X-Vivo20 à température ambiante. Ensuite, 500µL de suspension virale ont été transférés dans des tubes eppendorf de 1,5mL en absence ou présence de 10µM de l'additif de culture indiqué. Après homogénéisation, les échantillons ont été centrifugés à basse vitesse (15 000g) pendant 5 min à température ambiante. Ensuite, le surnageant a été retiré, le culot

resuspendu dans 100µl de milieu frais et conservé à -20°C. Pour chaque condition, le niveau de p24 contenu dans les culots a été évalué en utilisant le kit commercial ELISA VIH-1 p24 comme décrit précédemment.

L'essai fusion BLAM-LV et le test d'adhésion

Le protocole d'adhésion des particules lentivirales aux cellules cibles a été décrit précédemment (Fenard et al., 2013b). Le surnageant viral a été incubé pendant 3h à 4°C sur les cellules HCT116 en absence ou présence des additifs de culture. Ensuite, les cellules ont été lavées 3 fois avec du tampon PBS1X froid et lysées dans du PBS1X contenant 1% de Triton-X-100 et du cocktail inhibiteur de protéase, Complete (Roche diagnostics, Meylan France). Ensuite, le contenu en p24 des lysats a été évalué en utilisant le kit commercial ELISA VIH-1 p24 et les résultats ont été normalisés par rapport au contenu total en protéines qui a été déterminé par le test Bradford « DC protein » (Bioread, Ivry-sur-Seine, France). Concernant l'essai fusion BLAM-LV, celui-ci a fait l'objet d'une publication qui correspond à l'article 1 présenté dans cette thèse (Ingrao et al., 2014).

Dosage des récepteurs rétroviraux

Les cellules HCT116 ont été traitées 1h à 37°C en absence ou présence de Tat-Beclin1 (5 μ M) ou Tat-Scrambled (5 μ M). Ensuite, les cellules ont été incubées avec une solution de RBD « Receptor Binding Domain » (Metafora) dans le tampon A (DMEM, 10%SVF, 1% Glutamine, 1% Pénicilline/Streptomycin, 0,1% Azide, 1mM EDTA) pendant 20 minutes à 37°C. Après marquage les cellules ont été lavées avec du tampon B froid (PBS1X, 0,1% Azide, 1mM Azide, 2%SVF). Les RBD utilisés sont RBD ASCT2-Fc souris, RBD Pit-1-Fc souris et RBD Pit-2 lapin. Les cellules après lavage sont marquées ensuite par un anticorps secondaire spécifique du fragment Fc de chaque RBD (Anticorps chèvre anti-lapin Alexa Fluor 647 IgG (H+L)) pendant 30 minutes à 4°C à l'abri de la lumière. Après lavage dans le tampon B les cellules sont analysées par cytomètrie en flux LSRII.

Mesure de l'autophagie par ImageStream

Les cellules HEK293T ont été transfectées avec le plasmide d'expression pBABEpuro-mCherry-eGFP-LC3 par la méthode de transfection transitoire au phosphate de calcium. Les cellules, à raison d'une concentration de 5×10^5 cellules/puit, ont été incubées en absence

87

ou présence de Tat-Beclin1 (5 μ M) ou dans un milieu minimum EBSS (Earle's Balanced Salts) pendant 6h à 37°C, 5% CO₂. Ensuite, les cellules ont été lavées avec du tampon PBS1X et fixées avec du PFA à 1,2%. Les cellules ont été analysées par ImageStream (Amnis corporation, Seattle, WA, USA).

Le test de « Coloning forming activity assay » CFC

Le test de différenciation in vitro a été réalisé en ensemençant 1000 cellules CD34+ par millilitre dans du milieu methocult, milieu de methylcellulose enrichi en cytokines recombinantes humaines (H4434, StemCell Technologies, Vancouver, CA, USA). Après 15 jours de culture, les colonies BFU-E, CFU-GM et CFU-GEMM ont été comptées par visualisation au microscope à lumière inversée.

Résultats:

Tat-Beclin1, à faibles doses, augmente la transduction lentivirale de lignées cellulaires avec différents pseudotypes lentiviraux

Afin d'évaluer l'effet du peptide Tat-Beclin1 sur la transduction lentivirale, les cellules HCT116 ont été transduites avec des vecteurs pseudotypés avec la glycoprotéine d'enveloppe VSV-G (VSV-G-LVs) en absence ou en présence de différentes doses du peptide Tat-Beclin1 ou du peptide contrôle Tat-Scrambled (**Figure 21A**). De façon intéressante, l'utilisation de faibles doses de Tat-Beclin1 permet une forte augmentation de la transduction lentivirale (10 fois supérieure à la condition basale, en absence de peptide). On remarque également que plus la dose de peptide est augmentée, plus l'effet positif sur la transduction diminue (**Figure 21A**). Cela conduit à une courbe dose-réponse qui suit l'allure d'une courbe de Gauss. La faible augmentation de transduction observée pour de très hautes doses (50 μ M) est liée à un effet non spécifique induit par le domaine de transduction Tat puisque l'on retrouve cette même augmentation en présence du peptide contrôle Tat-Scrambled (**figure 21.A**). De plus, l'effet du peptide Tat-Beclin1 n'est pas saturé en présence de concentrations de vecteur VSVG-LV allant de 10⁵ à 10⁶ TU/mL (correspondant à une MOI de 0,5 à 5) et permet d'atteindre 84% d'efficacité de transduction à 10⁶ TU/mL (**figure 21.B**).

Un des grands avantages de l'utilisation de vecteurs lentiviraux pour le transfert de gène est la capacité de pseudotypage avec différentes glycoprotéine d'enveloppe hétérologues

pour obtenir un tropisme cellulaire spécifique (Frecha et al., 2008b). Ainsi, l'effet de Tat-Beclin1 a été évalué en présence de différents pseudotypes lentiviraux : un vecteur lentiviral pseudotypé avec la glycoprotéine d'enveloppe modifiée du virus leucémogène du Gibbon (GALVTR-LV), ou avec la glycoprotéine modifiée du rétrovirus endogène félin RD114 (RD114TR-LV). Il est important de savoir que ces pseudotypes présentent un tropisme fort pour les cellules hématopoïétiques et également qu'ils nécessitent la présence d'additifs de culture afin d'obtenir des niveaux de transduction efficace. Sur les cellules adhérentes, divers additifs de culture solubles peuvent être utilisés comme le polybrène, la protamine sulfate ou la Vectofusin-1. Comme on peut observer sur le panel C de la **figure 21**, Tat-Beclin1 est capable d'augmenter la transduction lentivirale sur les cellules cibles avec les vecteurs GALVTR-LVs et RD114TR-LV de façon comparable aux additifs de culture couramment utilisés. Tat-Beclin1 est donc un additif de transduction lentivirale particulièrement efficace sur lignées cellulaires et ceci pour divers pseudotypes.



Figure 21: Tat-Beclin1 augmente la transduction de lignées cellulaire avec divers pseudotypes lentiviraux. A/ Les cellules HCT116 ont été transduites 6 heures avec des vecteurs VSV-G-LVs ($2x10^5$ TU/mL) en absence ou présence des peptides Tat-Scrambled ou Tat-Beclin1 aux différentes concentrations indiquées. B/ Les cellules HCT116 ont été transduites avec différents titres de vecteurs VSV-G-LVs en absence ou présence de Tat-Scrambled ou Tat-Beclin1 (5µM). C/ Les cellules HCT116 ont été transduites avec les vecteurs GALVTR-LVs ou RD114TR-LVs (10^6 TU/mL) en absence ou présence de Tat-

Scrambled (5µM), Tat-Beclin 1 (5µM), Vectofusin-1 (6µg/mL), protamine sulfate (4µg/mL) ou polybrene (3µg/mL). Sur les 3 panels, l'efficacité de transduction a été évaluée 3 à 4 jours post-infection par mesure de l'expression de la GFP. Tous les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en duplicat \pm l'écart type des moyennes (SEM).

Tat-Beclin1 potentialise la transduction lentivirale des cellules souches/progénitrices hématopoïétiques

Bien que cela soit intéressant d'augmenter la transduction lentivirale des lignées cellulaires pour de la recherche fondamentale, notre premier objectif est de pouvoir optimiser les protocoles cliniques actuels de transduction lentivirale en ciblant les CSPHs pour les approches de thérapie génique ex vivo. Comme montré sur la **figure 22A**, les vecteurs VSVG-LVs hautement purifiées ont été utilisées pour transduire les CSPHs hCD34+. En présence de Tat-Beclin1, la transduction lentivirale est doublée. La dose optimale de Tat-Beclin1 pour favoriser la transduction des CSPHs a été définie à 10μ M (**figure 22B**), une concentration supérieure à celle utilisée sur lignée cellulaire. De façon intéressante, Tat-Beclin1 dans nos conditions expérimentales est plus performant que la Retronectin qui a été pré-adhérée 24h avant transduction à 7μ g/cm².





représentent la moyenne de trois expériences indépendantes (3 donneurs) réalisées en duplicats \pm SEM. **B**/ les cellules hCD34+ (six donneurs) ont été transduites en duplicat avec le vecteur VSVG-LV (2x10⁵ TU/mL) en absence ou présence de Tat-Beclin1 (10µM). Chaque point représente le niveau de tranduction obtenu pour un donneur. Les barres représentent la

92

valeur moyenne de la distribution. La p-value a été déterminée en utilisant le test de Mann-Whitney (**P<0.01). **C**/ Différenciation des cellules hCD34+ transduites en test CFC. Les histogrammes représentent la moyenne du nombre de colonies obtenues à partir de 1000 cellules récoltées après transduction avec le vecteur VSV-G-LV ($5x10^7$ ig/mL) en absence ou présence de Retronectin (7μ g/cm²), Tat-Scrambled (10μ M) ou Tat-Beclin1 (10μ M). Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes (3 donneurs) réalisées en duplicat ± SEM.

Afin d'évaluer si Tat-Beclin1 est compatible avec une application clinique en thérapie génique, des études de toxicité ont été menées. Comme le montre la **figure 22.C**, le peptide ne semble pas altérer l'intégrité et la différenciation clonogénique in vitro des CSPHs, observé grâce aux tests de « Coloning forming activity assay » (CFC).

Afin de compléter ces observations, des greffes ont été réalisées in vivo. Pour cela, des CSPHs humaines transduites avec VSVG-LV en présence de Tat-Scrambled, Tat-Beclin1 ou un mix utilisé en clinique de Retronectin/protamine sulfate, ont été injectées dans des souris immunodéficientes NSG (figure 24). Treize semaines plus tard, l'efficacité de reconstitution d'un système immunitaire humain est évaluée. Comme le montre le panel A,B,C,D , un niveau équivalent du nombre de cellules hCD45+ (marqueur pan-hématopoïétique) a été détecté dans la moelle osseuse (figure 24A), la rate (figure 24B), le thymus (figure 24C) et le sang périphérique (figure 24D) pour les différentes conditions de transduction. La greffe de cellules hCD45+ GFP dans la condition Tat-Beclin1 est comparable à la Retronectin hormis dans le cas de la rate où il existe une différence significative, la condition Retronectin apparaît bien plus efficace que Tat-Beclin1. Concernant le thymus, toutes les souris n'ont pas été capables de reconstituer un thymus ; le modèle NSG est un modèle « Thymus-déficient » d'où la difficulté à reconstituer un thymus complet malgré la greffe de hCD34+. Dans l'ensemble on remarque tout de même une tendance à obtenir plus de cellules transduites greffées en présence de Retronectine/Protamine Sulfate par rapport à la condition Tat-Beclin1. Et ce phénomène est statistique dans la rate. Sachant que les niveaux de greffes de cellules humaines (hCD45+) est comparable pour ces deux conditions, l'explication probable concernant la différence au niveau des cellules transduites humaines serait dans un premier temps le faible nombre de cellules injectées. En effet, ayant des sangs de cordon ombilical d'environ un million de cellules nous avons dû greffer 250 000 cellules maximum par condition, ce qui est à la limite de ce que l'on considère comme quantité nécessaire pour avoir une greffe efficace. Il est possible qu'à cause de ce nombre faible de cellules nous n'ayons pas efficacement greffé les cellules humaines dans le modèle murin. Comme on peut l'observer sur la figure 23, les pourcentages de cellules en taille/structure (FSC/SSC) sont comparables

pour les deux conditions. En revanche, ce qui suscite l'intérêt, c'est le nombre plus élevé de hCD45+ en présence de Tat-Beclin1 comparé à Retronectine/Protamine Sulfate (12,3% vs 3,14%), mais de façon surprenante, le niveau de hCD45+ transduites GFP+ est nettement plus élevé en présence de Retronectine/protamine Sulfate (60,4%). Ce qui ne coïncide pas avec les niveaux d'efficacité de transduction in vitro avant greffe des hCD34+ en présence de Tat-Beclin1 et Retronectine/Protamine Sulfate qui étaient identiques (50,6% et 52,2% respectivement). Tout ceci, suggère que Tat-Beclin1 pourrait ne pas favoriser la transduction des CSHs dans la population de cellules CD34+. De ce fait, les cellules transduites en présence de Tat-Beclin1 n'arriveraient pas à correctement greffer dans le modèle murin, ou du moins à se maintenir à long terme. Afin de confirmer cela, il serait intéressant, de réaliser des greffes secondaires de cellules CSHs. En effet, il serait intéressant de récupérer les CSPHs hCD34+ présentes dans la moelle osseuse des premières souris et de les réinjecter dans une seconde souris afin d'évaluer la capacité à reconstituer un système hématopoïétique complet. A partir de là, nous pourrions déterminer si Tat-Beclin1 permet de transduire des CSHs. D'autre part, le conditionnement au Busulfan est potentiellement insuffisant. En effet, nous avons rencontré des problèmes de resuspension de la poudre de Busulfan au moment de l'injection. Après filtration, la solution de Busulfan a été considéré injectable. Mais au regard de nos niveaux de greffe assez faibles, on suspecte un conditionnement non optimal.

Pour conclure de façon générale, ces résultats nous permettent de constater que le peptide Tat-Beclin1 ne semble pas avoir d'effets majeurs délétères sur la reconstitution hématopoïétique in vivo des souris NSG avec les hCD34+ transduites. Ceci suggère un résultat réminiscent de celui obtenu avec le test CFC in vitro. Il serait intéressant de pousser l'analyse afin de s'assurer de l'effet de Tat-Beclin sur la transduction des CSHs.



A/ Condition Retronectine/Protamine Sulfate (Rate) :

B/ Condition Tat-Beclin1 (Rate):



Figure 23 : Analyse en cytométrie en flux des niveaux de greffe dans la rate. A/ hCD34+ transduites et traitées avec Retronectine/protamine sulfate ; B/ cellules hCD34+ transduites et traitées avec Tat-Beclin1 à 10µM. Analyse réalisée par logiciel FlowJo.



95



Figure 24 : Evaluation de l'efficacité de greffe de cellules hCD34+, transduites en présence de Tat-Beclin1, dans le modèle murin immunodéficient NSG.

Les cellules hCD34+ ont été transduites avec le vecteur hautement purifié VSVG-LV en absence ou présence de Retronectin ($7\mu g/cm^2$), Tat-Scrambled ($10\mu M$) ou Tat-Beclin1 ($10\mu M$) pendant 6 heures. Les cellules ont ensuite été injectées aux souris et 13 semaines post-greffe, l'analyse du niveau d'expression du marqueur hCD45+ et de la GFP ont été évalués dans chaque organe. Chaque point représente une souris. La mesure de la GFP a été réalisée sur la population hCD45+. A/ Moelle osseuse (BM), B/ Rate (Spleen), C/ Sang (Blood). Le test statistique utilisé est le test non paramétrique de Mann-Whitney.

Tat-Beclin1 agit sur les étapes d'adhésion et de fusion des particules lentivirales avec la membrane cellulaire.

Tat-Beclin1 apparaît agir comme un additif de culture sur la transduction lentivirale. Dans la littérature, les additifs de culture sont majoritairement décrit pour leur action au niveau de l'entrée virale (adhésion et fusion virale avec la cellule cible). Dans le laboratoire, il a été adapté un essai fusion basé sur le FRET initialement développé pour l'étude de l'entrée du VIH-1 (Voir Article 1). De ce fait, nous avons décidé d'utiliser l'essai BLAM-LV et le test d'adhésion afin de déterminer si Tat-Beclin1 agit au niveau des étapes d'entrée virale. Comme le montre la **figure 25A**, Tat-Beclin1 augmente fortement l'étape de fusion virale. La quantification du nombre de particules virales interagissant avec les cellules à 4°C montre que le niveau d'adhésion virale est également fortement augmenté en présence de Tat-Beclin1, à un niveau comparable à la condition contrôle en présence de Vectofusin-1 (**figure 25B**). Cependant, l'augmentation de l'adhésion virale n'est pas une conséquence de l'agrégation virale comme cela est le cas pour des peptides agrégeants tels que la Vectofusin-1 (**figure 25C**). En conclusion, Tat-Beclin1 est capable d'augmenter les étapes d'adhésion et de fusion virale via un mécanisme moléculaire n'impliquant pas l'agrégation des particules virales.





A/ Test de fusion virale BLAM-LV. Les cellules ont été incubées 2,5h à 37° C avec les vecteurs VSV-G-BLAM-LVs en absence ou présence de Tat-Beclin1 (10µM). Ensuite,

l'efficacité de la fusion virale a été estimée par mesure du pourcentage de substrat CCF2 clivé dans les cellules cibles par cytométrie en flux. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes (3 donneurs pour les cellules hCD34+) réalisées en duplicat \pm SEM. **B**/ Test d'adhésion virale. Les cellules HCT116 ont été pré-incubées 30 min en absence ou en présence de Tat-Scrambled ou Tat-Beclin1 (5µM). Ensuite, les cellules ont été incubées 2,5 h à 4°C avec VSV-G-LVs (75ng de p24) en absence ou présence de Tat-Scrambled ou Tat-Beclin1 (5µM). Comme contrôle positif, les cellules HCT116 ont été incubées avec une solution froide de VSV-G-LVs pré-incubée avec le peptide Vectofusin-1 (12µg/mL). C/ Test « Viral pull-down ». Les particules VSV-G-LVs ont été mélangées avec Tat-Scrambled (10µM), Tat-Beclin1 (10µM) ou avec le contrôle positif Vectofusin-1 (10µM). Après une courte centrifugation à 15 000g), le pourcentage de sédimentation des particules virales a été quantifié par dosage ELISA de la protéine VIH-1 p24. Les résultats sont normalisés par rapport à la quantité d'antigène p24 totale présente dans l'échantillon au départ. Les résultats du panel B et C représentent la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en duplicat \pm SEM.

Tat-Beclin1 n'induit pas de changement du niveau des récepteurs rétroviraux

Plusieurs rétrovirus ont la particularité d'utiliser des transporteurs de nutriments à la surface cellulaire comme voie d'entrée (Manel et al., 2003). Metafora a développé l'outil RBD (Receptor Binding Domain). Ces recombinants RBDs sont dérivés des glycoprotéines d'enveloppe rétrovirales et sont ainsi des ligands aux transporteurs de nutriments présents à la surface cellulaire. Afin de pouvoir mesurer leur quantité, Metafora a fusionné le fragment Fc d'un anticorps de souris ou de lapin avec les RBD, permettant la fixation d'anticorps secondaires fluorescents et l'analyse cytométrie en flux.

Dans notre étude, nous avons utilisé le RBD ASCT-2 pour le récepteur au RD114TR-LV, le RBD Pit-1 pour GAVTR-LV et RBD Pit-2 pour MLV-A-LV (Collins et al., 2004). Avant marquage par les RBDs, les cellules HCT116 ont été traitées en absence ou présence de Tat-Beclin1 ou Tat-Scrambled à 5μ M. Comme le montre la **figure 26**, en présence de Tat-Beclin1, il n'y a pas de différence avec les conditions contrôles concernant le niveau d'expression des récepteurs rétroviraux. Tat-Beclin1 agit donc sur les étapes d'adhésion et de fusion sans altérer l'expression des récepteurs viraux présents à la surface de la cellule cible.



Figure 26 : Tat-Beclin1 n'induit pas de modification d'expression des récepteurs rétroviraux. Les cellules HCT116 ont été incubées en absence ou présence de Tat-Beclin ou Tat-Scrambled (5 μ M) pendant 1h. Ensuite les cellules ont été marquées pendant 20min à 37°C avec RBD ASCT2-Fc souris, RBD Pit-1 souris ou RBD Pit-2 lapin. Les cellules ont ensuite été lavées puis marquées par des anticorps secondaires chèvre anti-souris couplé à PË ou chèvre anti-lapin couplé Alexa fluor 647 pendant 30min à 4°C. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en duplicat ± SEM..

Tat-Beclin1 n'induit pas d'autophagie à la dose optimale qui favorise la transduction lentivirale.

Le flux autophagique est défini par la formation de vésicules intracytoplasmiques appelées autophagosomes, qui après fusion avec des lysosomes, deviennent des autophagolysosomes, capables de dégrader leur contenu protéique par hydrolyse. Ce mécanisme permet à la cellule de survivre suite à des signaux de stress environnementaux ou carences en nutriments.

Il est possible de suivre ce flux autophagique grâce une construction plasmidique spécifique qui induit un changement de fluorescence selon le stade de maturation des vésicules autophagiques (pBABE-puro-mCherry-eGFP-LC3). En effet, la construction plasmidique permet à la cellule de produire la protéine mCherry–GFP-LC3 chimérique (**figure 27**). Lors de la formation d'autophagosomes, la protéine LC3 lipidée se retrouve ancrée dans la membrane. Cette construction permet d'obtenir une double fluorescence verte et rouge lorsque les protéines eGFP et mCherry sont co-exprimés : il s'agit de la phase précoce de l'autophagie. En revanche, lors de la formation d'autophagolysosomes (fusion

autophagosome avec un lysosome ou endosome tardif), le contenu de la vésicule s'acidifie, ce qui induit la déstabilisation de la protéine eGFP. A ce stade tardif de l'autophagie, seule la fluorescence rouge de mCherry est détectable (Liu et al., 2014).



Figure 27: Suivie des différents stades de l'autophagie avec une construction LC3 chimérique fusionnée à deux protéines fluorescentes (Hansen and Johansen, 2011). La fusion en tandem de mCherry et eGFP à LC3 permet de créer une construction pH-sensible rendant la mesure du flux autophagique possible dans les cellules vivantes.

Au sein du laboratoire, nous disposons d'une nouvelle technologie qui est l'ImageStream (Amnis). Cet appareil est un cytomètre en flux en images. En effet, celui-ci va nous permettre à la fois de visualiser les cellules une par une et à la fois de pouvoir analyser la fluorescence émise par ces mêmes cellules. De ce fait, l'appareil est doté d'un logiciel qui permet de quantifier les spots de fluorescence présents dans la cellule analysée. Ainsi, nous avons pu quantifier et comparer le nombre de spots fluorescents rouges dans les cellules traitées ou non avec Tat-Beclin1. En contrôle positif nous avons utilisé le milieu EBSS, pauvre en nutriments, connu pour induire le processus autophagie.

Les résultats nous permettent de montrer qu'il n'existe aucune différence significative entre la condition Tat-Beclin1 à 5μ M et la condition contrôle en absence de peptide (**figure 28**). Les cellules ne semblent donc pas rentrer en autophagie en présence de Tat-Beclin1 à une dose optimale pour la transduction lentivirale des lignées cellulaires. Cette observation a été confirmée par des collaborateurs du laboratoire de Martine Biard-Piechaczyk à Montpellier, spécialiste de l'autophagie et des infections (CPBS – FRE3689 CNRS-UM1919). L'analyse

par immunoblot de LC3 n'a pas permis d'observer d'autophagie dans des lignées cellulaires en présence de $5\mu M$ de Tat-Beclin1.



Figure 28 : Tat-Beclin1 n'induit pas d'autophagie sur lignée cellulaire à la dose optimale favorisant la transduction lentivirale. Chaque point représente une cellule détectable dans le canal de fluorescence de la protéine mCherry. Les résultats représentent la moyenne (barre rouge) de trois expériences indépendantes. Le test statistique utilisé est le test non paramétrique de Mann-Whitney

_____ **(** 103 **)**_____

DISCUSSION PERSPECTIVES

_____ 105 **)**_____

Avec les récents succès des différents essais cliniques de thérapie génique ex vivo et in vivo utilisant les vecteurs viraux, les connaissances dans le domaine de la thérapie génique n'ont cessé d'évoluer. Les vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1 s'avèrent être de puissants outils pour la thérapie génique ex vivo fournissant ainsi des traitements aux maladies génétiques rares ou aux cancers hématopoïétiques (leucémie, lymphomes...). Plusieurs essais cliniques sont basés sur la modification génique de CSPHs pour traiter les maladies du système hématopoïétique. Cependant, l'efficacité de la thérapie génique peut être améliorée en augmentant les niveaux de transduction des cellules cibles. De plus, la sécurité et les coûts liés à la thérapie génique peuvent être optimisés afin de réduire la quantité de vecteur viral utilisée sur les cellules cibles. Une étape limitante majeure est l'entrée de la particule virale dans la cellule cible. Pour pallier à cela, plusieurs additifs de culture existent déjà tels que la Retronectine ou encore des peptides cationiques (e.g polybrène, protamine sulfate).

Dans cet esprit, mon projet de thèse a contribué, dans un premier temps, à caractériser la structure-fonction de la nouvelle famille d'additif de culture dérivée du LAH4, les Vectofusins. D'autre part, mon travail se concentre plus particulièrement sur la découverte du nouvel additif de culture, le peptide Tat-Beclin1.

Structure des Vectofusins : élément déterminant pour leur fonction

Dans ce travail, j'ai contribué à tester les différents membres de la famille des Vectofusins pour leur efficacité lors de la transduction lentivirale de CSPHs. Cette étude a permis de montrer que tous les isomères du peptide Vectofusin-1 sont plus ou moins capables de promouvoir la transduction des CSPHs, et ceci de façon dépendante du pseudotype lentiviral utilisé. En effet, l'utilisation du pseudotype lentiviral GALVTR-LV, qui entre dans la cellule de façon pH-indépendante, permet à tous les isomères d'augmenter la transduction. En revanche, en présence du pseudotype lentiviral VSV-G-LV, qui entre dans la cellule de façon pH-dépendante, certains isomères sont inefficaces, voire inhibiteurs de transduction en comparaison au niveau basal sans additif de culture. Cela nous a permis de corréler la structure des peptides à leur fonction. Dans le cas du vecteur lentiviral VSV-G-LV, les isomères de la Vectofusin-1 se déplacent probablement avec le vecteur de la membrane plasmique (pH neutre) jusqu'aux endosomes acidifiés (environ pH 6) ce qui provoque la protonation des résidus Histidine présents sur les isomères. Cette protonation induit un changement de charge globale des isomères de Vectofusin-1 modifiant ainsi les propriétés d'interaction à la membrane. Nous suggérons que cette modification de charge entraîne le déplacement du peptide d'une position transmembranaire à une position plane sur la bicouche lipidique, ce qui a déjà été observé pour le peptide prototype LAH4 (Bechinger, 1996; Bechinger et al., 1999). Au contraire, en présence d'un pseudotype lentiviral pH-indépendant, tel que GALVTR-LV, la fusion virale se produit au niveau de la membrane plasmique ou dans les endosomes précoces, avant l'acidification endosomale (Liang et al., 2009). De plus, grâce à cette étude nous avons pu mettre en lumière l'importance : (i) de l'angle polaire à 140° formé par les résidus histidine dans la représentation de Schiffer-Edmundson, (ii) du rôle nécessaire des résidus Lysine à l'extrémité N-terminale du peptide, (iii) et la présence de résidus leucine comme acide aminé hydrophobe (plutôt que des valines ou des isoleucines). Tous ces paramètres moléculaires semblent être cruciaux pour la fonction des peptides cationiques amphipathiques en tant qu'additif de culture pour la transduction lentivirale, ou en tant qu'agent transfectant ou encore agent antimicrobien. Il est intéressant de noter que malgré une homologie assez forte des séquences entre LAH4-L1 et LAH4-A4 (Vectofusin-1), les deux peptides ne présentent pas la même activité biologique. En effet, chaque peptide va avoir une activité préférentielle en fonction de leur composition en acides aminés au sein de leur séquence.

Cependant il reste à déterminer dans quelles mesures ces caractéristiques moléculaires permettent aux isomères de Vectofusin-1 de présenter des activités biologiques différentes. Au sein de la famille des Vectofusins, nous avons montré que le peptide Vectofusin-1 est l'additif de culture le plus performant. Les études ont donc été focalisées sur ce peptide leader. Notre équipe a pu montrer, par le biais de l'essai « viral pull down », que les complexes particules virales/Vectofusin-1 sédimentent en quelques minutes suite à une centrifugation à basse vitesse (voir Annexe 2). A l'aide de l'essai BLAM-LV, nous avons observé également une augmentation de l'adhésion et de la fusion virale avec la cellule cible en présence de la Vectofusin-1 (Fenard et al., 2013c). De ce fait, concernant le mécanisme d'action lors de la transduction lentivirale, le peptide Vectofusin-1 potentialise l'agrégation, l'adhésion et la fusion entre la particule lentivirale et la membrane cellulaire. Des études en collaboration avec un laboratoire de biophysique (l'équipe de Burkhard Bechinger, Strasbourg), nous ont permis d'explorer les caractéristiques structurales du peptide Vectofusin-1. L'observation du peptide en AFM (Atomic Force Microscopy) a confirmé que cette molécule est capable de former rapidement des agrégats annulaires et des nanofibres dans le milieu de culture (Annexe 2). Ensuite le marquage de la Vectofusin-1 avec la Thioflavine T (marqueur spécifique des fibrilles amyloïdes) a été inefficace, suggérant ainsi que les fibres de Vectofusin-1 ne sont pas de type amyloïde (fibres riches en feuillets β). De plus, les études structurales par dichroïsme circulaire ont confirmé ce résultat : la Vectofusin1 adopte une structure en hélice α (Annexe 2). Cependant une récente revue sur les additifs de culture montrent que la majorité des additifs de culture sont de type amyloïde (les peptides PAP, SEVI, EF-C, P16) (Meier et al., 2014). Ceci suggère que la Vectofusin-1 est le premier additif de culture nanofibrillaire formé d'hélices α , et non de feuillets β , capable de s'auto-assembler afin de former des complexes supramoléculaires permettant, lors du contact avec la particule virale, d'augmenter la transduction de cellules cibles dans le cadre de protocoles de thérapie génique.

Pour entrer un peu plus dans le détail, l'équipe de biophysique a testé le rôle du pH dans la formation de fibres de Vectofusin-1. Dans un tampon phosphate à pH 7 et non à pH 5, il y a formation de fibres. Nous pensons donc que le pH neutre en culture induit la formation rapide de fibres capables de guider les particules virales et de les concentrer à la surface de la cellule cible.

Afin de pousser l'étude plus loin, il serait intéressant de connaître la structure des agrégats, le mécanisme de nucléation et les interactions moléculaires qui relient chaque fibre entre elles. Une collaboration vient d'être engagée avec le Synchrotron SOLEIL sur ces aspects.

De plus, au sein de l'équipe, a été développé un nouveau procédé de production de vecteurs lentiviraux. Ce procédé consiste à produire des particules lentivirales à partir de cellules productrices HEK293T cultivées dans du milieu de culture tamponné à pH6 (Annexe 1) (Holic and Fenard, 2016). Les titres viraux en génome infectieux et en particules physiques sont nettement améliorés avec ce nouveau procédé de production. Au sein de cette étude, j'ai réalisé des transductions des CSPHs CD34+ avec deux pseudotypes, GALTR-LV et VSV-G-LV (produits à pH6), et ceci en absence ou présence de Vectofusin-1. Les transductions de cellules hCD34+ sont par contre réalisées à pH neutre dans du milieu X-Vivo20. Les résultats obtenus ont montré que, d'une part, les particules produites à pH6 sont capables de transduire efficacement les CSPHs CD34+, et d'autre part, que la Vectofusin-1 est efficace aussi bien sur les pseudotypes produits à pH7 que sur les pseudotypes produits à pH6. La Vectofusin-1 est ainsi un additif de culture robuste, indépendamment du procédé de production lentivirale utilisé.

Tat-Beclin1 : nouvel additif de culture pour la transduction lentivirale

La littérature documente une relation complexe entre l'autophagie et le VIH-1. Cette relation a été décrite pour la première fois par Zhou et Spector (Zhou and Spector, 2008) en montrant que le virus inhibe le processus autophagique pendant son infection. En effet, la glycoprotéine Env du VIH-1 induit une apoptose dépendante de l'autophagie dans les cellules lymphocytes T CD4+ voisines des cellules infectées. Ce phénomène conduit à une déplétion des lymphocytes T non infectées. En revanche, concernant les cellules lymphocytes T CD4+ activement infectées, le VIH-1 est capable de bloquer l'autophagie induite par la glycoprotéine Env afin d'échapper à l'effet antiviral de cette voie cellulaire. A partir de ce constat, les études se sont penchées sur la capacité du VIH-1 à réguler l'autophagie. Kyei et al. (Kyei et al., 2009) ont décrit l'implication du facteur Nef du VIH-1 dans cette régulation. En effet, les auteurs ont pu montrer que Nef est capable de se lier à la protéine autophagique Beclin1, bloquant ainsi le processus autophagique. Dans ce contexte, l'équipe de Shoji-Kawata et al. (Shoji-Kawata et al., 2013) a mis en évidence la séquence d'acides aminés minimale de Beclin1 qui permet au facteur Nef d'interagir avec cette dernière. De cette façon, les auteurs ont créés un peptide de fusion appelé Tat-Beclin1 consistant en la fusion du domaine de transduction du peptide Tat du VIH-1 avec le motif peptidique de Beclin1 permettant la liaison avec Nef. Ce nouveau peptide est un nouvel inducteur d'autophagie et a permis aux auteurs d'identifier un nouveau régulateur négatif de ce processus appelé GAPR-1. En effet, GAPR-1 et Nef interagissent avec le même motif peptidique de Beclin1, le rôle de GAPR-1 étant de séquestrer Beclin1 dans le Golgi de façon à bloquer l'initiation de l'autophagie. Le mécanisme d'action de Tat-Beclin1 a été décrit par les auteurs comme étant la capacité d'entrée dans la cellule grâce au domaine de transduction du peptide Tat, de se lier avec GAPR-1 et de cette façon permettre la libération de Beclin1 de l'appareil de Golgi afin d'activer le processus autophagique. Par le biais de l'activité autophagique de Tat-Beclin1, le peptide est capable d'induire une inhibition de la réplication de plusieurs virus réplicatifs, dont le VIH-1 in vitro. Ainsi Tat-Beclin1 est défini à la fois comme un inducteur d'autophagie et un facteur antiviral puissant.

Au sein des CSPHs, l'autophagie est un mécanisme cellulaire protecteur de l'état de quiescence face aux stress métaboliques ou aux carences en nutriments (Warr et al., 2013). Plus particulièrement, les CSPHs issues de sang de cordon ombilical présentent un fort taux d'autophagie afin d'assurer le maintien de leur survie (Gomez-Puerto et al., 2016b). Ainsi, dans ce cas de figure, l'autophagie présente un rôle protecteur concernant les CSPHs.

Dans le contexte de la thérapie génique, l'objectif de ce travail de thèse a consisté à tester l'effet du peptide Tat-Beclin1, inducteur d'autophagie, sur la transduction de CSPHs avec des vecteurs lentiviraux non réplicatifs. Nous avons ainsi montré que le peptide Tat-Beclin1 est capable, à faibles doses, de potentialiser fortement la transduction lentivirale sur lignées cellulaires avec différents pseudotypes lentiviraux. Cet effet est également observé lors de la transduction lentivirale de CSPHs CD34+ et ceci sans cytotoxicité apparente in vitro (test CFC) et in vivo par la greffe, dans des souris humanisées NSG, de cellules hCD34+ transduites en présence de Tat-Beclin1. Le peptide Tat-Beclin1, à faibles doses, augmente considérablement les niveaux d'adhésion et de fusion virale avec la cellule cible. En revanche, l'augmentation de ces étapes d'entrée n'est pas liée à l'agrégation des particules virales comme cela est le cas pour les additifs de culture agrégeants tels que la Vectofusin-1 (Annexe 2). Sachant que le peptide Tat-Beclin1 est décrit comme étant un inducteur d'autophagie, nous avons procédé à des études de flux autophagique afin de déterminer si l'autophagie est impliquée dans l'effet observé sur la transduction lentivirale. Les résultats obtenus ont montré une absence d'autophagie en présence de Tat-Beclin1 à une dose optimale pour la transduction lentivirale sur lignées cellulaires. Afin de pousser plus loin l'analyse de l'effet de ce peptide, nous avons établi une collaboration avec l'équipe de Martine Biard-Piechaczyk qui est spécialiste de l'interaction entre l'autophagie et les infections virales. Leur résultats ont permis de montrer que Tat-Beclin1 à 20µM potentialise fortement l'infection du VIH-1 sauvage sur cellules HeLa (détermination par mesure de l'activité beta-Galactosidase, travail en cours).

Le peptide Tat-Beclin1 potentialise donc aussi bien la transduction avec des vecteurs lentiviraux non réplicatifs que l'infection avec le VIH-1. Cet effet sur le VIH-1 a probablement lieu, comme sur les vecteurs, au niveau de l'étape d'entrée. Par contre, l'étude de Shoji-Kawata montre que l'ajout quotidien de Tat-Beclin1 au cours d'une infection VIH-1 inhibe la réplication virale (chute de la production d'antigène p24 dans le surnageant). Ces résultats suggèrent une inhibition de la réplication virale en présence de Tat-Beclin1 et ceci via l'activation de l'autophagie.

De façon intéressante, l'équipe de Julia JM. Eekels (Eekels et al., 2012) montre une inhibition de la réplication du VIH-1 induite par des ARN interférents dirigés contre des facteurs autophagiques. Leurs résultats montrent qu'il y a une diminution de la production intracellulaire de protéine p24 ainsi qu'une baisse de la concentration de p24 dans le surnageant cellulaire lorsque les gènes atg ont été inhibés. Moins de cellules sont infectées.

Ceci suggère que l'inhibition de l'autophagie bloque l'infection par le VIH-1 probablement au niveau des étapes précoces du cycle viral (e.g. entrée ou transcription inverse).

D'autre part, il a été montré que le facteur Nef et la protéine Gag du VIH-1 interagissent avec les protéines autophagiques Beclin1 et LC3 respectivement. La colocalisation de Gag avec LC3 suggère un rôle autophagique dans la biosynthèse ou l'assemblage des particules de VIH-1 (Kyei et al., 2009). Une fois arrivée au stade de maturation, l'autophagie va avoir un rôle dans la dégradation des particules VIH-1. De ce fait, le VIH-1 code pour le facteur Nef, qui par sa liaison avec Beclin1 va bloquer l'autophagie et ainsi jouer un rôle protecteur lors de la production des particules virales (Kyei et al., 2009).

L'ensemble de ces données suggère un rôle proviral de l'autophagie pour les stades précoces d'infection et un rôle antiviral concernant le stade de production/maturation du VIH-1. Dans notre étude, nous montrons que de faibles doses de Tat-Beclin1 potentialise l'infection des vecteurs lentiviraux et VIH-1 ce qui semble être en contradiction avec l'étude de Shoji-Kawata décrivant Tat-Beclin1 comme un peptide antivirale. Tout cela semble suggérer que Tat-Beclin1 agit par des voies moléculaires différentes de l'autophagie lorsqu'il est utilisé à faibles doses. Dans un premier temps, il serait intéressant de reproduire les données de Shoji-Kawata sur l'effet inhibiteur de Tat-Beclin1 sur la réplication du VIH-1, ainsi que d'autres virus réplicatifs (e.g. chikungunya, zika) afin de déterminer si l'effet est spécifique ou non du VIH-1. Ce travail est actuellement initié dans le cadre d'une collaboration avec le CPBS de Montpellier, en particulier l'équipe « autophagy and infections » (M. Biart-Piechaczyk/L. Espert) et l'équipe « Mosquito-borne viruses and host factors » (L. Briant). Sachant que dans nos conditions, l'autophagie ne semble pas être mise en jeu, il serait intéressant de se pencher sur les autres voies cellulaires dans lesquelles Beclin1 est impliquée. En effet, Beclin1 est un acteur crucial dans les voies d'adaptation au stress, de mort cellulaire, du développement, d'endocytose, de cytokinèse, d'immunité, de tumorigenèse et de vieillissement (Wirawan et al., 2012). L'hypothèse suggérée par nos résultats serait un effet de Tat-Beclin1 sur la voie d'endocytose. En effet, Tat-Beclin1 augmente l'entrée des vecteurs lentiviraux de façon considérable et ceci de façon indépendante du récepteur cellulaire d'entrée. Le trafic endosomal joue un rôle majeur dans l'entrée des vecteurs lentiviraux, en particulier pour le vecteur lentiviral VSV-G-LV qui requiert une acidification des endosomes via la voie des MVB (multivesicular bodies). En effet, les particules virales VSV-G-LV pénètrent dans la cellule après endocytose et sont ensuite acheminées dans les MVBs où aura lieu un phénomène de « back-fusion » à pH acide avec les membranes internes des vésicules contenues dans les MVBs, permettant ainsi au nucléoïde de forme conique d'être libéré dans le cytoplasme (Le Blanc et al., 2005). Nos résultats d'adhésion suggèrent également un rôle de Tat-Beclin1 sur la voie d'endocytose. En effet, 30 minutes de prétraitement des cellules avec Tat-Beclin1, avant infection lentivirale, suffisent à induire une meilleure adhésion des particules virales sur la cellule cible en comparaison au peptide contrôle. Il est probable qu'en présence de Tat-Beclin1, il y ait une modification lipidique de la membrane afin de favoriser l'entrée de la particule virale (Campbell et al., 2001). Il s'agit ici d'un phénomène cellulaire aigu et donc impliquant une voie cellulaire déjà préexistante.

La protéine endogène Beclin1 appartient au complexe Pi3K de classe III et interagit avec différents partenaires selon la voie de signalisation induite (Levine et al., 2015). Deux partenaires sont en compétition pour l'interaction avec Beclin-1 dans le complexe Pi3k de classe III : ATG14L (BARKOR) et UVRAG (**figure 29**) (Itakura and Mizushima, 2009).



Figure 29 : Interaction des partenaires Atg14L et UVRAG avec Beclin-1 au sein du complexe Pi3k de classe III. (D'après (Diao et al., 2015; Fogel et al., 2013; Liang et al., 2008; Pirooz et al., 2014))

UVRAG a été décrit comme étant un élément clé dans la régulation de maturation des autophagosomes et des endosomes et de façon plus générale un régulateur d'endocytose (Lee et al., 2011; Liang et al., 2008). L'autophagie et l'endocytose sont deux voies cellulaires différentes mais unies par un interlocuteur commun, UVRAG. L'équipe de Sara Pirooz (Pirooz et al., 2014) a montré que la protéine UVRAG est impliqué dans le mécanisme d'entrée virale. La surexpression d'UVRAG permet une augmentation de l'infection par des virus comme VSV et IAV (Influenza A virus). L'activité provirale d'UVRAG est difficile à concilier avec le rôle de cette même protéine dans le processus autophagique qui est largement décrit comme étant antiviral pour les virus réplicatifs. Durant l'étude, les auteurs

ont inhibé l'expression d'UVRAG dans des cellules déficientes du gène autophagique atg5, ce qui les a rendu moins sensibles à l'infection par VSV. Ceci suggère qu'il existe un mécanisme alternatif à l'autophagie par lequel UVRAG agit afin de favoriser l'étape d'entrée virale.

Suite à l'ensemble de ces résultats, il serait intéressant d'étudier les partenaires de Beclin-1 dans le complexe Pi3k de classe III. En effet, il est probable que la voie d'endocytose soit le mécanisme mis en place après libération de Beclin-1 de l'appareil de Golgi en présence de Tat-Beclin1. L'étude de marqueurs tels que les GTPase Rab5 et Rab7 par microscopie confocal permettrait d'établir la présence ou non de changements au niveau du trafic endosomal en présence du peptide Tat-Beclin1. L'étude des partenaires de Beclin1 tels qu'UVRAG, ATG14L et GAPR-1, par des tests d'inhibition d'expression par ARN interférence, sur des cellules traitées avec Tat-Beclin1, nous apporterait un premier élément de réponse concernant le mécanisme et la voie de signalisation mise en jeu.

Enfin, il est à noter que le groupe de Beth Levine (He et al., 2013) a identifié récemment la protéine Beclin2, qui partage les même caractéristiques que Beclin1 en terme de régulation de l'autophagie et d'interactions avec les protéines du complexe Pi3k de classe III ainsi que Bcl-2. De ce fait, il serait intéressant de produire et tester un peptide Tat-Beclin2 sur la transduction lentivirale et l'infection virale afin de déterminer si l'effet proviral est également porté par ce nouveau peptide et si cela implique les mêmes partenaires. Beclin2 est spécifique des mammifères et contient quelques divergences de séquence avec Beclin1. L'équipe de He C. (He et al., 2013) décrit Beclin2 comme étant un acteur important dans la dégradation endolysosomale de plusieurs récepteurs couplés aux protéines G (GCPRs). Beclin2 diverge de Beclin1 au niveau de la séquence en région N-terminale. Cette région permet à Beclin2 de se lier spécifiquement à la protéine 1 associée au récepteur couplé aux protéines G (GAPS1) et cette interaction est essentielle pour la dégradation des GCPRs. Cette fonction de Beclin2 est totalement indépendante du complexe Pi3k de classe III et du mécanisme d'autophagie.

L'ensemble de ces travaux a permis de découvrir une nouvelle fonction au peptide Tat-Beclin1 comme additif de culture pour des vecteurs lentiviraux de thérapie génique. Ce peptide est capable d'augmenter les stades précoces d'infection et ceci indépendamment de la voie autophagique. Cette étude suggère que Tat-Beclin1 module une voie de signalisation endosomale, parallèle à l'autophagie et utilisant les mêmes acteurs afin de potentialiser l'infection. Dans le cadre de la thérapie génique, il serait très intéressant de pouvoir identifier cette voie qui permet une meilleure infection des CSPHs par les vecteurs lentiviraux. Une analyse approfondie de cette nouvelle voie cellulaire mise en jeu améliorerait nos connaissances sur la biologie des CSPHs en relation avec leur permissivité lors de la transduction lentivirale et ceci dans un objectif in fine d'optimiser les protocoles cliniques pour le traitement de maladies du tissu hématopoïétique par thérapie génique ex vivo.

(115)


(117)

ARTICLE 3

"The transduction enhancing peptide Vectofusin-1 forms pHdependent a-helical coiled-coil nanofibrils, trapping viral particles"

L.C. Vermeer, L. Hamon, A. K Schirer, M. Schoup, J. Cosette, S. Majdoul, D. Pastré, D. Stockholm, N. Holic, P. Hellwig, A. Galy, D. Fenard and B. Bechinger

Soumis à Biomaterials

(119 **)**

The Transduction Enhancing Peptide Vectofusin-1 forms pHdependent α -Helical Coiled-coil Nanofibrils, Concentrating Viral Particles.

Louic S. Vermeer (1), Loic Hamon (2), Alicia Schirer (3), Michel Schoup (1), Jérémie Cosette (4), Saliha Majdoul (5), David Pastré (2), Daniel Stockholm (5), Nathalie Holic (5), Petra Hellwig (3), Anne Galy (5), David Fenard (4)* and Burkhard Bechinger (1)*

(1) CNRS, Univ. of Strasbourg, Institut de Chimie UMR_7177, Strasbourg, France; (2) INSERM, Univ. of Evry, UMR_S1204, Evry, France; (3) CNRS, Univ. of Strasbourg, UMR 7140, Strasbourg, France (4) Genethon, Evry, France (5) Genethon, INSERM, Univ. of Evry, EPHE, research unit Integrare UMR_S951, Evry, France

*To whom correspondence should be addressed: Burkhard Bechinger (University of Strasbourg, Chemistry, 4 rue Blaise Pascal, F-67070 Strasbourg, France. Tel +33 3 68 85 13 03; <u>bechinger@unistra.fr</u>) and David Fenard (Genethon, Technological Innovation Lentivirus, 1bis rue de l'Internationale, F-91000 Evry, France. Tel +33 1 69 47 25 31; <u>dfenard@genethon.fr</u>).

Abstract

Gene transfer using lentiviral vectors has therapeutic applications spanning from monogenic and infectious diseases to cancer. Such gene therapy can be improved by enhancing transduction levels of target cells or reducing the amount of lentivirus for greater safety and reduced costs. Vectofusin-1, a recently developed cationic amphipathic peptide with a viral transduction enhancing capacity, strongly promotes the entry of several retroviral pseudotypes into target cells when added to the culture medium. To clarify the molecular basis of its action, we show that vectofusin-1 rapidly forms spherical complexes that further assemble into annular and extended nanofibrils in culture medium. These associate with viral particles allowing them to be easily pelleted for optimal virus-cell interaction. Thioflavin T fluorescence, circular dichroism and infrared spectroscopies indicate that these fibrils have a unique coiled-coil α -helical structure whereas most other viral transduction enhancers form β-amyloid fibrils. A vectofusin-1 derivative (LAH2-A4) is inefficient and does not form nanofibrils, suggesting that supramolecular assembly is essential for transduction enhancement. Our observations define vectofusin-1 as a member of a new class of α -helical lentiviral transduction enhancers. Its coiledcoil fibril formation is reversible which bears considerable advantages in handling the peptide in conditions well-adapted to Good Manufacturing Practices and scalable gene therapy protocols.

Keywords

lentiviral vector, nanofibril, amphipathic peptide, gene therapy, vectofusin-1

Abbreviations

AFM	atomic force microscopy
ATR- FTIR	attenuated total reflection Fourier transform infrared
CD	circular dichroism
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
HPLC	high performance liquid chromatography
HSPC	hematopoietic stem/progenitor cells
LAH2-A4	peptide with the sequence KKALLAAALAALLALAHHLLALLKKA-NH2
LAH4-A4	peptide with the sequence KKALLHAALAHLLALAHHLLALLKKA- NH2
LV	lentiviral vector
MALDI-ToF	matrix-assisted laser desorption ionisation – time of flight
NMR	nuclear magnetic resonance
PBS	phosphate buffer saline
VF-1	vectofusin-1, another name for LAH4-A4
VSV-G	vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein

Introduction

With the recent success in clinical trials using lentiviral vectors (LVs), gene therapy has seen a renaissance [1]. Its efficiency can be improved by enhancing transduction levels of target cells and its safety optimized by reducing the amount of viral vectors used. One way to promote viral transduction is the addition of culture additives such as the cationic polymer polybrene [2], a compound mainly used for laboratory research. The mechanism of action of this cationic additive is based on its ability to neutralize membrane charges and promote virus aggregation [3].

For clinical applications in gene therapy, transduction protocols include the polypeptide CH-296 (also called retronectin), a fragment of the human fibronectin [4-6]. Retronectin enhances transduction by promoting the co-localization of viruses and cells and rendering the target cell more permissive to the vector [7]. However, its use is surface-based which is not optimal both practically and for precise dosage of the additive relative to the vector. More importantly, retronectin is weakly efficient on the broadly used lentiviral vector pseudotyped with the vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein (VSV-G-LV) [8, 9]. Identification of new additives that are easy to manipulate and capable of enhancing the infectivity of a broad spectrum of LV pseudotypes is therefore required.

Peptide additives are interesting for their biodegradability, reduced size, simplicity of characterization (as compared to polymers), and the ease of production of a large range of different derivatives. In the last few years, new peptides with transduction enhancing activity have been identified and were shown to self-assemble into β -amyloid nanofibrils [10]. Examples of such peptides are the semen-derived enhancer of viral infection (SEVI) [11, 12], the semenogelin peptides [13] or peptides derived from HIV-1 envelope glycoproteins, for example EF-C [14], P13 and P16 [15].

We recently focused our attention on the LAH4 peptide family, previously designed as antimicrobial agents while at the same time being efficient transfection agents for DNA and siRNA [16-22]. Some LAH4-derived peptides have been shown to strongly promote the transduction of human primary cells, especially hematopoietic stem/progenitor cells with various lentiviral pseudotypes [23-25]. The lead peptide LAH4-A4, also called vectofusin-1 (VF-1), can be dosed to result in an infectivity of a single virus per cell, is not toxic on stem cells, and reduces the inoculum of viral vector needed by 2 to 3-fold [24, 25]. Vectofusin-1 promotes the adhesion and fusion between viral and cellular membranes [7, 24], but the molecular basis of its mechanism of action remains to be elucidated.

Following the recent discoveries of nanofibrillar arrangements by multiple peptides in the viral transduction enhancer family [10], we investigated the putative fibril formation by vectofusin-1 using thioflavin-T fluorescence, circular dichroism and infrared spectroscopies, as well as confocal, electron and atomic force microscopies. The results of this investigation are presented, and the implications discussed for the VF-1 mechanism of action and the rational design of new transduction enhancing peptides.

Materials and Methods

Peptide Synthesis

Vectofusin-1 (sequence: KKALLHAALAHLLALAHHLLALLKKA-NH₂) was synthesised with an amidated carboxy-terminus using a Millipore 9050 automated peptide synthesiser and standard Fmoc chemistry. The resulting product was purified by reverse-phase HPLC, and to exchange the trifluoroacetic acid counter ions washed three times with 4% (vol) acetic acid, freeze-dried, and

stored at -18°C. Its mass was verified by MALDI-ToF mass spectrometry and its purity confirmed by HPLC. For infrared spectroscopy, acetic acid counter ions were exchanged for chloride by three cycles of dissolving the peptide in a 10 mM HCl solution at a concentration of 1 mg/ml and lyophilisation. For some experiments (viral pull-down assay, AFM and confocal microscopy), VF-1 and LAH2-A4 (sequence: KKALL<u>A</u>AALA<u>A</u>LLALAHHLLALLKKA-NH₂, substituted amino acids underlined) were obtained from Genecust (Dudelange, Luxembourg) and used without further treatment.

Viral Vector Production

Lentiviral vectors pseudotyped with the VSV-G envelope glycoprotein and encoding the modified nerve growth factor receptor marker (Δ NGFR) were labelled with the mCherry-Vpr fusion protein (VSV-G-mCherry-LV) and generated by transient calcium phosphate transfection of 293T cells with a 6-plasmid vector system as described previously [7] but using the pmCherry-Vpr plasmid [26]. Chromatography-purified VSV-G-LV particles encoding the enhanced green fluorescent protein (eGFP) were produced as described previously [27]. Infectious titres are expressed as the number of transduction units per millilitre (TU/ml) and physical titres as the number of p24 antigens per millilitre (ng p24/ml).

Viral Pull-down Assay

Chromatography-purified VSV-G-LV particles were diluted in culture medium to a final concentration of 100 ng p24/ml, and 500 μ l of viral vectors were mixed with the indicated culture additive, homogenised, and centrifuged at 15870 g for 10 minutes at room temperature. Supernatants were discarded and pellets suspended in 100 μ l Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO Life Tech., St-Aubin, France). Viral pull-down efficiencies were evaluated by quantifying the p24 content in the pellets using a commercial HIV-1 p24 ELISA kit (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France).

Thioflavin T Assay

A stock solution of thioflavin T (Sigma Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) was prepared in phosphate buffer (10mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ + 150mM NaCl at pH7) at 0.8 mg/ml, filtered and stored at -20°C. The working solution was prepared extemporaneously by diluting (50x) in either water or X-Vivo20 medium (Lonza, Levallois-Perret, France). Subsequently, VF-1 (12 μ g/ml) or EF-C (50 μ g/ml) was incubated with thioflavin-T for the indicated amount of time. Fluorescence emission (excitation: 440 nm, emission: 482 nm) was recorded over time using a 2300Enspire spectrofluorometer (Perkin Elmer, Courtaboeuf, Les Ulis, France) and the baseline (buffer solution) was subtracted.

VF-1 Imaging

Images of VF-1 solutions (1 mg/ml) in water, PBS 1x (Life Tech., St-Aubin, France) and X-Vivo20 medium were obtained with a Radiance scanning confocal system (Bio-Rad-Zeiss, Germany) mounted on a Nikon TE 300 microscope (Nikon Instech Co, Japan) with Nikon objectives (CFI S Fluor 40x oil). 2D movies or 3D reconstructions of confocal z-stack images were performed using the Image J software (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://rsbweb.nih.gov, 1997-2016).

Images of VF-1 fibrils (12 μ g/ml) in contact with VSV-G-mCherry-LVs (6x10⁵ TU/ml) were obtained with a scanning microscope LEICA SP8 (Leica Microsystems, Germany). VF-1 (excitation: 488 nm, emission: 500-540 nm) and VSV-G-mCherry-LV emission (excitation: 552 nm, emission: 590-700 nm) were imaged with a 63x PL APO CS2 oil immersion objective 1.40 NA (Leica Microsystems, Germany). A z-stack was created by acquiring images every 0.4 μ m. All images were deconvoluted using Huygens Professional software (Scientific Volume Imaging, The Netherlands) before three-dimensional sample reconstruction. Finally, images were treated with

a contrast enhancement algorithm (histogram equalization) and a 3-pixel radius median filter for background subtraction.

Emission spectra (ex. 488 nm) of VF-1 fibrils were acquired using a multimodal plate reader spectrofluorometer (2300Enspire) and the turbidity of the VF-1 solutions was evaluated by measuring the absorbance at 600 nm with a KC4 spectrophotometer (BioTek Instruments, St Quentin-en-Yvelines, France).

Atomic Force Microscopy (AFM)

Vectofusin-1 (1 mg/mL) was incubated at room temperature in DMEM culture medium. After incubation times ranging from 3 minutes to 1 day, the solution was diluted in DMEM culture medium to obtain a final VF-1 concentration of 10 μ g/mL. A 10 μ L droplet was deposited on a freshly cleaved mica surface and left to interact for 30 sec. The mica surface was then rinsed with 0.02 % uranyl acetate solution and dried with filter paper. AFM images recorded in air were acquired with a Nanoscope V Multimode 8 microscope (Bruker, Santa Barbara, CA, USA) in PeakForce Tapping mode using Scanasyst-Air-HR probes (Bruker). Images were recorded at 1024 x 1024 pixels at a line rate of 3 Hz for Figure 3A, B, C; and at 3072 x 3072 pixels at 1.5 Hz for Figure 3D. The "particle analysis" tool on the Nanoscope Analysis software (version 1.50) was used to determine the diameter of 60 to 80 annular structures (Figure 3B), for each incubation time and from at least 3 independent samples [28]. The "section" tool on the same software was used to determine the height and periodicity along the fibril axis.

Transmission Electron Microscopy

For transmission electron microscopy, a solution of 5 mg/ml (1.6 mM) vectofusin-1 in 10 mM sodium phosphate at pH 4 or pH 8 was deposited on a carbon grid. After 2 minutes the excess sample was removed with filter paper and a solution of filtered (0.22μ m) ammonium molybdate (1% w/v) at pH 4 or pH 8 was added and left to interact for 2 minutes prior to the removal of excess solution with filter paper. TEM images were recorded with an AMT Hamamatsu digital camera (Advanced Microscopy Techniques, Woburn, MA, USA) on a Hitachi (Krefeld, Germany) H-7500 electron microscope at 80 kV.

Circular Dichroism (CD) Spectroscopy

A stock solution of 1 mg/ml (0.3 mM) in 10 mM sodium phosphate at pH 4.3 was prepared and diluted 10 times with 10 mM sodium phosphate. Throughout the manuscript we use the term "phosphate" to cover both the H₂PO₄- and the HPO₄²⁻ ions. With a phosphate pKa of 7.2, the ionisation state can be deduced from the context. From a stock solution of 2-3 µl, 0.5 M NaOH was added to increase the pH in a stepwise manner and a CD spectrum was recorded using a quartz cuvette with a path length of 1 mm on a Jasco J-810 spectrometer (Jasco, Tokyo, Japan) at 25°C, with wavelengths between 260 and 190 nm in steps of 1 nm with a stepping speed of 50 nm/min. Baselines of samples without peptide were subtracted and except for summing the 10 scans acquired for each spectrum and conversion from machine units to mean residual ellipticity (deg cm² dmol⁻¹), no spectral processing was carried out.

Attenuated Total Reflection Fourier Transformed Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy

ATR-FTIR analyses were performed on a Bruker Vertex 70 FTIR spectrometer (Karlsruhe Germany) equipped with a Harrick-Diamond ATR. 3 μ L of a solution of 20 mg/ml (6.6 mM) vectofusin-1 in D₂O (Sigma-Aldrich, 99,9% purity) or 20 mM sodium phosphate in D₂O at pH 4 or pH 8 were deposited on the diamond plate and dried under an argon flow. Infrared spectra were recorded in the 4000-700 cm⁻¹ spectral range with a resolution of 4 cm⁻¹ and 256 scans co-added.

Results

Vectofusin-1 Forms Peptide Aggregates that Sediment Viral Particles

Vectofusin-1 stock solutions are soluble in water (pH < 6) at concentrations around 1 to 5 mg/ml, but the solution becomes turbid when suspended in phosphate buffered saline (PBS). In X-vivo20 culture medium, used in clinical settings for viral transduction of hematopoietic stem cells, macroscopic aggregates are formed (Figure 1A-B). Interestingly, these VF-1 aggregates can be observed because of their photoluminescence (Figure 1C), with an emission peak around 518 nm (Figure 1D). A dense network of small aggregates is observed in PBS and large aggregates in X-vivo20 medium (Figure 1C and supplemental video). To characterise the network of vectofusin-1 fibrils formed in stock solution (5 mg/ml), electron microscopy images were acquired in phosphate at pH 4 and pH 8 (below and above the pKa of histidine). At pH 4, no supramolecular aggregate formation was observed (not shown), while at pH 8 a dense network of fibrils is visible (Figure 1E).



Figure 1: Vectofusin-1 forms aggregates in phosphate buffer and in culture medium. (A) A VF-1 solution (1 mg/ml) 30 minutes after suspension in X-Vivo20 medium (the arrow is pointing at the interface of sedimented VF-1 fibrils). (B) Optical density (600-nm) of VF-1 solutions, where the error bars represent the standard deviation of three independent experiments. (C) Confocal microscopy of VF-1 (1 mg/ml) suspended in H20, PBS1x or X-Vivo20 medium (Scale bar, 1µm). Images in H₂0 and PBS 1x were taken to cross-section the air/water interface of the VF-1 solution droplet. (D) Emission spectra (ex. 488 nm) of the VF-1 solutions/suspensions observed in C. (E) Negatively stained transmission electron microscopy image (80 kV, 50000x magnification) of VF-1 peptides (5 mg/ml) in 10 mM phosphate buffer at pH 8.

Numerous known viral transduction enhancers self-assemble in supramolecular structures capable of trapping viral particles [10]. This feature can be evaluated using a viral pull-down assay, as described previously for the EF-C or SEVI peptides [14, 29]. As shown in Figure 2A, VF-1 promotes the sedimentation of nearly 100% of viral particles and is as efficient as EF-C at concentrations typically used in biological settings (12 - 24 μ g/ml corresponding to 4.3 – 8.6

 μ M). To observe the complex between VF-1 peptide aggregates and lentiviral particles, the latter were labelled with mCherry fluorescent proteins (VSV-G-mCherry-LVs), incubated with VF-1 aggregates, and sedimented by centrifugation. Images of the resulting fibril-virion complexes obtained by deconvoluted confocal microscopy are shown in Figure 2B, and confirm the association of viral particles with a network of vectofusin-1 aggregates.



Figure 2: Vectofusin-1 fibrils co-localise with viral particles. (A) VSV-G-LVs were mixed with EF-C or VF-1 peptides at indicated concentrations. After a low speed centrifugation, the HIV-1 p24 antigen content in the pellet was evaluated by an ELISA assay and represented as percentage of viral pull-down normalized to the viral input \pm SEM (n=5). (B) Confocal microscopy of VF-1 fibrils in contact with VSV-G-mCherry-LVs (scale bar, $3\mu m$).

Vectofusin-1 Peptides Self-Assemble as Nanofibrils.

To study the nature of the vectofusin-1 aggregates in further detail, they were visualized using atomic force microscopy at the concentration optimal for viral transduction (10 μ g/ml). Images show isolated as well as clustered nanostructures with a spherical appearance (Figure 3).

Interestingly, those spherical structures associate over time in annular and linear arrangements (Figure 3A-C) with a periodicity of 10 nm (Figure 3D). The diameters of the annular structures increase upon the first minutes of incubation (Figure 3B). Their height profiles is dominated by a 3 nm population with a smaller fraction measuring 4.5 nm (Figure 3C) and some scatter at 5-12 nm. At later time points, extended linear structures are observed. A variant of vectofusin-1 that lacks two critical histidine residues (LAH2-A4), does not promote lentiviral transduction [25]. No supramolecular structures were observed for this inactive peptide (Figure 4), suggesting that larger molecular peptide assemblies are required for transduction enhancement.



Figure 3: AFM shows vectofusin-1 self-assembly as annular and linear structures. (A) Vectofusin-1 peptides were incubated in DMEM culture medium for the indicated times and annular and linear structures were detected on the mica surface (2 x 2 μ m2, Z-scale 8 nm). (B) AFM image (left panel) of an annular structure describing how diameters (here 65 nm, red circle) were measured, and histogram with percentages of small, medium and large annular structures (60 < n < 80 per time point). The global average diameters at each time point are indicated on top of the histogram ± SD (in nm). Filamentous structures, aggregates or structures of which the contours could not be determined were excluded from this analysis. (C) On the right panel, height profiles of two annular structures corresponding to the AFM image on the left. (D) High resolution observations (upper panel) indicate a periodicity of approximately 10 nm along the fibril axis (white line), shown in the lower panel (n=30).



Figure 4: Schiffer-Edmundson helical wheel diagrams of Vectofusin-1 (A) and of LAH2-A4 (B). Amino acid residues 4-22 are shown. Atomic Force Microscopy after 60 min of incubation shows fibril formation by vectofusin-1 (C) but not by LAH2-A4 (D) (frame: $2 \times 2 \mu m2$, Z-scale 8 nm as in Fig 3).

The vectofusin-1 nanofibrils have α -helical structure.

To further investigate the structure of these nanofibrils and their pH dependence, a pH titration by circular dichroism (CD) spectroscopy was carried out. Figure 5A shows that vectofusin-1 is unstructured at low pH and adopts an α -helical structure above pH 6.1. An isodichroic point at 205 nm is observed, confirming a two-state transition from unstructured to α -helical. So far, the observed behaviour is similar to many other cationic amphipathic peptides such as LAH [30], LAK, LAO [31], and LADap peptides [32] that are used for nucleic acid delivery or as antimicrobials. Notably, for VF-1, the ratio of molar ellipticities at 222nm and 208 nm (θ_{222} / θ_{208}) is > 1.0, indicating the formation of oligomeric coiled-coil structures [33]. The helix formation precedes the formation of larger self-associated complexes: above pH 6.1 the spectra no longer pass through the isodichroic point at 205 nm, but a new isodichroic point at 200 nm appears. Figure 5B shows the ellipticity per residue as function of pH at each of the isodichroic points. Curve fitting estimates the pKc values of these conformational transitions at 5.5 and 6.7. Although the titration shown here was started at low pH, the reverse titration gives the same results and thus indicates that the peptide self-association is reversible.

Interactions of bivalent ions have been found important for the assembly of some β -amyloids [34], cationic polymers [35] or the packing of peptide oligomers [36]. In order to define the role of phosphates for the VF-1 supramolecular structures, the peptide in water was titrated with increasing phosphate concentrations at pH 4.6 and 7.4 (Supplementary Figures 1 and 2). At pH 4.6, VF-1 remains unstructured after addition of 5.3 mM phosphate (160 phosphate ions per peptide), even after 10 days at room temperature. At pH 7.4, no change in the α -helical structure was detected up to phosphate concentrations of 2 mM (60 phosphates per peptide), but at 3.3 mM (100 per peptide) a phosphate-induced increase in coiled-coil structure was observed.



Figure 5: Secondary structure analysis of VF-1 suspensions by circular dichroism spectroscopy. (A) pH titration of VF-1 in 10mM phosphate (B) The two steps of fibril assembly as viewed by CD spectroscopy. The mean ellipticity per amino acid residue is plotted at the wavelengths of the two isodichroic points observed in panel A and fitted with sigmoidal curves to determine the characteristic pKc values of the structural transitions: 5.5 and 6.7.



Figure 6: ATR FT-IR and Thioflavin-T fluorescence show no evidence for the presence of β -sheet structures. (A) The amide I region of ATR-FTIR spectra of vectofusin-1 recorded in D₂O only (solid lines) or D₂O in presence of 20 mM phosphate (dotted lines), at pH 4 (grey) or pH 8 (black). Depending on the pH, the term "phosphate" in the legend refers to either predominantly H₂PO₄- or HPO₄²-. (B) A thioflavin T stock solution was diluted either in water (black) or in X-vivo20 medium (white) and incubated with vectofusin-1 (circles)

or EF-C peptide (squares) for the indicated amount of time. The fluorescence intensity (ex. 440 nm, em. 482nm) was recorded and background without peptide subtracted. Data are representative of three different experiments performed in triplicate ± SD.

To the best of our knowledge, all the short peptides with viral transduction enhancing activities form amyloid β -sheets [10]. In contrast, our structural investigations by CD spectroscopy show that VF-1 occurs either as an unstructured peptide at low pH or as an α -helix under biological conditions. Since circular dichroism is known to be more sensitive to α -helical structures, attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) was used as a complementary technique, known to be more prone to reveal β -sheets. Spectra were recorded in D₂O in absence or presence of 20 mM phosphate. At pH 4.0, a non-viscous solution was obtained, but at pH 8.0 a transparent, viscous gel formed in the tube. This gel was deposited on the crystal. The amide I region of the processed spectrum is shown in Figure 6A. In all conditions tested, the spectral profile of vectofusin-1 is clearly different from the designed amyloid peptides [37] and transduction enhancing EF-C β -sheet nanofibrils [14]. The typical features at 1695-1672 cm⁻¹ and 1638-1615 cm⁻¹ associated with β -sheets are below detection [38]. These spectroscopic data are further confirmed by the absence of thioflavin T fluorescence in presence of VF-1 (Figure 6B), an assay thought to specifically label β-amyloids [39] such as EF-C. Although CD spectroscopy suggests the presence of unstructured peptide at low pH, no random coil signal at 1670 cm-1 is detected: the higher concentration and the drying of the peptide on the crystal induce the self-association even at low pH. Taken together, the IR peak position near 1650 cm⁻¹, the lineshape of the circular dichroism spectra and the lack of thioflavin-T fluorescence indicate that vectofusin-1 forms α -helical coiled-coil fibrils at physiological pH.

Discussion

Vectofusin-1 has been described as a strong enhancer of viral transduction, acting on the adhesion and fusion steps of lentiviruses developed for gene therapy [7, 24, 25]. In this manuscript, we show that this peptide forms supramolecular assemblies that co-localize with lentiviral particles (Figure 2), leading to sedimentation and thus increasing local virus concentrations along the cellular surface of target cells. It may also be expected that virus-cell adhesion is increased because the positively charged peptides reduce the electrostatic repulsion between negatively charged membranes without compromising the viral envelope and cellular membrane integrity [3]. Notably, fibre formation is absent for LAH2-A4, a closely related VF-1 derivative lacking transduction enhancement activities, suggesting that fibril formation and the resulting co-localization of lentiviruses with such VF-1 supramolecular assemblies are important for this activity [10].

Using atomic force microscopy we have demonstrated at the nanoscale level that VF-1 selfassociates into spherical supramolecular complexes that further assemble into fibrils with an annular or a spiral turn appearance (Figure 3). Within hours these convert into longer fibrils. The formation of annular protofibrils and fibril elongations has been extensively described in preparations of different amyloidogenic proteins and peptides [40-43]. Interestingly, most of the short peptides with viral transduction enhancing activities form amyloid β -sheets [10].

To better understand the molecular interactions that lead to such supramolecular assemblies, comparison with previously described helical coiled-coil fibrils from natural sources or by design is helpful. Helical coiled-coils are abundant in proteins [44, 45] and some fibrils derived from α -helical coiled-coil motifs have been described in native biological systems [46]. The design of α -helical peptides for creating synthetic biomaterials, a relatively recent topic, has initially proven to be complex but has taken up speed [47, 48]. In a first step, much effort went into the design of coiled-coil building blocks of defined oligomeric size where hydrophobic interactions, electrostatic repulsion and attraction are carefully tuned [49]. In a next step, order along the long axis of the fiber was introduced which usually involved much longer peptides. For

example, contacts in the longitudinal direction were based on a staggered 5-heptat repeat where pH dependence arises from arginine and glutamate residues [50, 51]. Alternatively, 'sticky ends' were created by overhanging coiled-coil dimers from two different peptides with complementary charge [52], as well as blunt end [53] or lock-washer interfaces which associate by charge complementarity [49]. Furthermore, repulsive electrostatic forces at the polar faces of the coiled-coil ensured that lateral aggregation does not interfere with longitudinal order [49]. Based on such features, α -helical coiled-coil sequences were designed *de novo* that, in a pH-dependent manner, form either fibrils or spherical particles [51]. In contrast, vectofusin-1 does not contain negative charges: an amidated C-terminus and the presence of four lysine residues give it a net charge of +5 at neutral pH, and four histidine residues increase this to +9 at a pH below 6. Considerable ingenuity was required to design α -helical peptide sequences that self-assemble into fibrous structures [47, 48]. Therefore, the question arises how VF-1 self-associates into extended fibrils and meshes. The amino acid sequence and comparison to previously published principles, some discussed above, provide some clues for speculation.

While the supramolecular arrangement within VF-1 fibrils remains unknown, a height of about 3.5 - 4.5 nm and a periodicity along the fibril axis of ~ 10 nm (Figure 3) suggest the involvement of multiple peptides. Dimensions of a coiled-coiled dimer are 2 nm [54] and increase only slowly when more helices bundle up [49-51]. The presence of multiple leucine residues in the hydrophobic core and their localization on one face of the α -helix (Figure 4) agrees with the formation of a building block based on leucine-zipper-like interactions [25], where the knobsinto-holes complementarity allows for lateral packing [44, 45]. Hydrophobic residues not involved in the zipper could promote longitudinal self-association. The opposite polar face of VF-1 consists of alanine and histidine residues, where the inactive LAH2-A4 [25] has its first two histidine residues replaced with alanine (Figure 4; sequences given in the Methods section). The fact that the latter does not form fibrils indicates that those histidine residues are essential for the fibril formation and thus play an important role in intermolecular interactions. Our structural investigations show that VF-1 is highly soluble and unstructured at acidic pH while it rapidly adopts an α -helical conformation above pH 6 and assembles further into coiled-coil structures at the neutral pH used during viral transduction (Figures 5 and 6). This strengthens the hypothesis of the involvement of histidine (pKa \sim 6), and further suggests that the imidazole side chains need to be in their deprotonated, uncharged state for fibril formation to occur. Replacement of histidine with alanine prevents the association into large supramolecular structures (Figure 4D), indicating that the removal of repulsive Coulombic interactions alone is not sufficient for fibril formation at neutral pH. A deprotonated histidine sidechain is a hydrogen bond acceptor and can participate in π - π stacking or cation- π interactions. Previous studies have indeed shown that His-His interactions are stronger when histidine is deprotonated [55], and that such interactions are quite common in proteins [56]. However, based on the current data, we cannot exclude that interactions between histidine and either lysine, the terminal carboxyamide or the amino-terminus are involved in the self-association.

To make matters even more complex, phosphate buffer was found to promote self-association of α -helical VF-1 even at low ionic strength (supplementary Figures 1 and 2). The pH-dependent structural transition of VF-1 shows pKc values of 5.5 and 6.7 (Figure 5). With the typical histidine pKa being 6.2 in solution and phosphate having a theoretical pKa of 7.2, the pKc of 5.5 seems linked to the (de)protonation of the histidine side chains and the pKc of 6.7 is suggestive that the equilibrium between H₂PO₄- and H₂PO₄²⁻ from the buffer is involved in the structural transition of VF-1. It is well possible that the histidine pKa is reduced, favouring the uncharged state, by conformational changes that increase Coulombic interactions with nearby positive charges [57] and/or insertion in a more hydrophobic environment [58], for example due to the observed peptide self-association. An important role of phosphates has been reported due to the electrostatic interactions of bivalent phosphate and the cationic lysine side chains [35] and

phosphate ions have been found important in the packing of a homodimer antimicrobial peptide [36], suggesting that phosphate or other anions have a structural role during the VF-1 association process. Clearly, additional structural investigations are required to better define the molecular interactions involved in the self-assembly of VF-1.

Conclusion

The viral transduction enhancing peptide vector vector vector is a novel class of α -helical fibrilforming transduction enhancers and has not shown any propensity for amyloid formation in our experiments. To the best of our knowledge, that makes VF-1 the first transduction enhancing peptide that forms α -helical coiled-coil fibrils instead of amyloid β -sheets [10]. It is of interest that some β -sheet nanofibers or their precursors are associated with pathologies [59], whereas the use of coiled-coil α -helical materials has so far not been a concern. The VF-1 assembles into long fibrils composed of multiple spherical particles with a diameter around 10 nm. They form fibrils that appear to close back on themselves giving them an annular appearance, which is lost during the elongation that takes place on a timescale of hours under the conditions used for gene therapy transduction protocols. The pH dependence and reversibility of this fibril formation bears considerable advantages in handling the peptide under conditions well-adapted to Good Manufacturing Practices and scalable gene therapy protocols using lentiviral vectors in which, at present, the cumbersome retronectin additive is typically used. VF-1 peptides can be stored and dosed precisely from a stock solution at low pH and/or the absence of phosphate and subsequently diluted in culture medium at physiological pH to ensure fibril formation in presence of lentiviral vectors and before addition to the cell suspension. In conclusion, the family of histidine-rich LAH4 peptides bears considerable promise for LV transduction, in particular in clinical settings where the rational design of pH-sensitive self-associating α -helical peptides can contribute to further improvements of gene therapy treatments.

Authorship

DF and BB designed and coordinated the study; LSV, MS and SM performed the experiments; LSV, DF and BB wrote the manuscript; JC and DS contributed to the confocal microscopy experiments; LH and DP contributed to the atomic force microscopy experiments; AS and PH contributed to the ATR-FITR spectroscopy experiments; LH, DP, DS, NH, AG edited the manuscript. All co-authors contributed to the manuscript.

Acknowledgments

The authors thank Christopher Aisenbrey and Delphine Hatey for their help with peptide synthesis, Valérie Demais, Cathy Royer and Frank Pfrieger for the electron microscopy, and Genethon collaborators, especially Ababacar Seye and Antoine Gachet for technical assistance. We also acknowledge Hugues de Rocquigny for the kind gift of pmCherry-Vpr plasmid.

This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) [grant number DCM2012-1225742], awarded to AG, BB and DF, as well as the Association Française contre les Myopathies (AFM), the FRR award from the University of Evry awarded to DF. Additionally, the financial contributions to BB's team of the Agence Nationale de la Recherche [TRANSPEP 07-PCV-0018 and LabEx Chemistry of Complex Systems 10-LABX-0026_CSC] are gratefully acknowledged, as well as financial contributions from the University of Strasbourg, CNRS, Région Grand-Est (Alsace) and the RTRA International Center of Frontier Research in Chemistry. DP and LH gratefully acknowledge the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the Genopole Evry for constant support of the laboratory.

References

[1] L. Naldini. Gene therapy returns to centre stage. Nature. 2015;526:351-60.

[2] K. Toyoshima, P.K. Vogt. Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions. Virology. 1969;38:414-26.

[3] H.E. Davis, M. Rosinski, J.R. Morgan, M.L. Yarmush. Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. Biophys J. 2004;86:1234-42.

[4] T. Moritz, V.P. Patel, D.A. Williams. Bone marrow extracellular matrix molecules improve gene transfer into human hematopoietic cells via retroviral vectors. J Clin Invest. 1994;93:1451-7.

[5] T. Moritz, P. Dutt, X. Xiao, D. Carstanjen, T. Vik, H. Hanenberg, et al. Fibronectin improves transduction of reconstituting hematopoietic stem cells by retroviral vectors: evidence of direct viral binding to chymotryptic carboxy-terminal fragments. Blood. 1996;88:855-62.

[6] H. Hanenberg, X.L. Xiao, D. Dilloo, K. Hashino, I. Kato, D.A. Williams. Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. Nat Med. 1996;2:876-82.

[7] D. Ingrao, S. Majdoul, A.K. Seye, A. Galy, D. Fenard. Concurrent Measures of Fusion and Transduction Efficiency of Primary CD34+ Cells with Human Immunodeficiency Virus 1-Based Lentiviral Vectors Reveal Different Effects of Transduction Enhancers. Hum Gene Ther Methods. 2014;25:48-56.

[8] D.L. Haas, S.S. Case, G.M. Crooks, D.B. Kohn. Critical factors influencing stable transduction of human CD34(+) cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. Mol Ther. 2000;2:71-80.

[9] V. Sandrin, B. Boson, P. Salmon, W. Gay, D. Negre, R. Le Grand, et al. Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. Blood. 2002;100:823-32.

[10] C. Meier, T. Weil, F. Kirchhoff, J. Munch. Peptide nanofibrils as enhancers of retroviral gene transfer. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2014;6:438-51.

[11] F. Arnold, J. Schnell, O. Zirafi, C. Sturzel, C. Meier, T. Weil, et al. Naturally occurring fragments from two distinct regions of the prostatic acid phosphatase form amyloidogenic enhancers of HIV infection. J Virol. 2012;86:1244-9.

[12] J. Munch, E. Rucker, L. Standker, K. Adermann, C. Goffinet, M. Schindler, et al. Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. Cell. 2007;131:1059-71.

[13] N.R. Roan, J.A. Muller, H. Liu, S. Chu, F. Arnold, C.M. Sturzel, et al. Peptides released by physiological cleavage of semen coagulum proteins form amyloids that enhance HIV infection. Cell Host Microbe. 2011;10:541-50.

[14] M. Yolamanova, C. Meier, A.K. Shaytan, V. Vas, C.W. Bertoncini, F. Arnold, et al. Peptide
 nanofibrils boost retroviral gene transfer and provide a rapid means for concentrating viruses.
 Nat Nanotechnol. 2013;8:130-6.

[15] L. Zhang, C. Jiang, H. Zhang, X. Gong, L. Yang, L. Miao, et al. A novel modified peptide derived
 from membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 envelope
 significantly enhances retrovirus infection. J Pept Sci. 2014;20:46-54.

[16] A. Kichler, C. Leborgne, J. Marz, O. Danos, B. Bechinger. Histidine-rich amphipathic peptide
 antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA.
 2003;100:1564-8.

[17] B. Bechinger, V. Vidovic, P. Bertani, A. Kichler. A new family of peptide-nucleic acid
 nanostructures with potent transfection activities. J Pept Sci. 2011;17:88-93.

[18] A.J. Mason, C. Gasnier, A. Kichler, G. Prevost, D. Aunis, M.H. Metz-Boutigue, et al. Enhanced
 membrane disruption and antibiotic action against pathogenic bacteria by designed histidine rich peptides at acidic pH. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:3305-11.

- [19] A.J. Mason, A. Martinez, C. Glaubitz, O. Danos, A. Kichler, B. Bechinger. The antibiotic and DNA-transfecting peptide LAH4 selectively associates with, and disorders, anionic lipids in mixed membranes. FASEB J. 2006;20:320-2.
- [20] A. Marquette, A.J. Mason, B. Bechinger. Aggregation and membrane permeabilizing properties of designed histidine-containing cationic linear peptide antibiotics. J Pept Sci. 2008;14:488-95.
- [21] A.J. Mason, W. Moussaoui, T. Abdelrahman, A. Boukhari, P. Bertani, A. Marquette, et al. Structural determinants of antimicrobial and antiplasmodial activity and selectivity in histidinerich amphipathic cationic peptides. J Biol Chem. 2009;284:119-33.
- [22] B. Langlet-Bertin, C. Leborgne, D. Scherman, B. Bechinger, A.J. Mason, A. Kichler. Design and evaluation of histidine-rich amphipathic peptides for siRNA delivery. Pharm Res. 2010;27:1426-36.
- [23] D. Fenard, S. Genries, D. Scherman, A. Galy, S. Martin, A. Kichler. Infectivity enhancement of different HIV-1-based lentiviral pseudotypes in presence of the cationic amphipathic peptide LAH4-L1. J Virol Methods. 2013;189:375-8.
- [24] D. Fenard, D. Ingrao, A. Seye, J. Buisset, S. Genries, S. Martin, et al. Vectofusin-1, a new viral entry enhancer, strongly promotes lentiviral transduction of human hematopoietic stem cells. Mol Ther Nucleic Acids. 2013;2:e90.
- [25] S. Majdoul, A.K. Seye, A. Kichler, N. Holic, A. Galy, B. Bechinger, et al. Molecular Determinants of Vectofusin-1 and Its Derivatives for the Enhancement of Lentivirally Mediated Gene Transfer into Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. J Biol Chem. 2016;291:2161-9.
- [26] J.V. Fritz, P. Didier, J.P. Clamme, E. Schaub, D. Muriaux, C. Cabanne, et al. Direct Vpr-Vpr
 interaction in cells monitored by two photon fluorescence correlation spectroscopy and
 fluorescence lifetime imaging. Retrovirology. 2008;5:87.
- [27] O.W. Merten, S. Charrier, N. Laroudie, S. Fauchille, C. Dugue, C. Jenny, et al. Large-scale
 manufacture and characterization of a lentiviral vector produced for clinical ex vivo gene
 therapy application. Hum Gene Ther. 2011;22:343-56.
- [28] M.V. Sukhanova, S. Abrakhi, V. Joshi, D. Pastre, M.M. Kutuzov, R.O. Anarbaev, et al. Single
 molecule detection of PARP1 and PARP2 interaction with DNA strand breaks and their
 poly(ADP-ribosyl)ation using high-resolution AFM imaging. Nucleic Acids Res. 2016;44:e60.
- [29] N.R. Roan, J. Munch, N. Arhel, W. Mothes, J. Neidleman, A. Kobayashi, et al. The cationic
 properties of SEVI underlie its ability to enhance human immunodeficiency virus infection. J
 Virol. 2009;83:73-80.
- [30] V. Iacobucci, F. Di Giuseppe, T.T. Bui, L.S. Vermeer, J. Patel, D. Scherman, et al. Control of pH
 responsive peptide self-association during endocytosis is required for effective gene transfer.
 Biochim Biophys Acta. 2012;1818:1332-41.
- [31] Y. Lan, B. Langlet-Bertin, V. Abbate, L.S. Vermeer, X.L. Kong, K.E. Sullivan, et al.
 Incorporation of 2,3-Diaminopropionic Acid into Linear Cationic Amphipathic Peptides Produces
 pH-Sensitive Vectors. ChemBioChem. 2010;11:1266-72.
- [32] V. Abbate, W. Liang, J. Patel, Y. Lan, L. Capriotti, V. Iacobucci, et al. Manipulating the pH
 response of 2,3-diaminopropionic acid rich peptides to mediate highly effective gene silencing
 with low-toxicity. J Control Release. 2013;172:929-38.
- 47
 48
 [33] N.E. Zhou, C.M. Kay, R.S. Hodges. Synthetic model proteins: the relative contribution of
 49
 49
 40
 41
 42
 43
 44
 44
 45
 45
 46
 47
 47
 48
 49
 49
 40
 40
 41
 41
 42
 42
 43
 44
 44
 44
 45
 46
 47
 47
 48
 49
 49
 40
 41
 41
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 43
 44
 44
 44
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 49
 40
 41
 41
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 42
 43
 44
 44
 45
 44
 44
 45
 46
 47
 47
 48
 49
 49
 49
 40
 41
 41
 42
 42
 44
 44
 44
 44
 44
 45
 46</li
- [34] N. Nespovitaya, J. Gath, K. Barylyuk, C. Seuring, B.H. Meier, R. Riek. Dynamic Assembly and
 Disassembly of Functional beta-Endorphin Amyloid Fibrils. J Am Chem Soc. 2016;138:846-56.
 [35] X.Y. Jin, L. Leclerca, N. Sisayath, H. Cottet, Investigating the Influence of Phosphate Ions on
 - [35] X.Y. Jin, L. Leclercq, N. Sisavath, H. Cottet. Investigating the Influence of Phosphate Ions on Poly(L-lysine) Conformations by Taylor Dispersion Analysis. Macromolecules. 2014;47:5320-7.
 - [36] R.M. Verly, J.M. Resende, E.F.C. Junior, M.T.Q. de Magalhães, C.F.C.R. Guimarães, V.H.O. Munhoz, et al. Structure and membrane interactions of the homodimeric antibiotic peptide homotarsinin. Sci Rep (In Press). 2016.

[37] F. Chiti, P. Webster, N. Taddei, A. Clark, M. Stefani, G. Ramponi, et al. Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. Proc Natl Acad Sci USA. 1 1999;96:3590-4. 2 3 [38] A. Barth. Infrared spectroscopy of proteins. Biochim Biophys Acta. 2007;1767:1073-101. 4 [39] R. Khurana, C. Coleman, C. Ionescu-Zanetti, S.A. Carter, V. Krishna, R.K. Grover, et al. 5 Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. J Struct Biol. 2005;151:229-38. 6 [40] K.A. Burke, E.A. Yates, J. Legleiter. Biophysical insights into how surfaces, including lipid 7 membranes, modulate protein aggregation related to neurodegeneration. Front Neurol. 8 2013;4:17. 9 [41] R. Kayed, A. Pensalfini, L. Margol, Y. Sokolov, F. Sarsoza, E. Head, et al. Annular protofibrils 10 11 are a structurally and functionally distinct type of amyloid oligomer. J Biol Chem. 12 2009;284:4230-7. 13 [42] H.A. Lashuel, D. Hartley, B.M. Petre, T. Walz, P.T. Lansbury, Jr. Neurodegenerative disease: 14 amyloid pores from pathogenic mutations. Nature. 2002;418:291. 15 [43] M. Zhu, S. Han, F. Zhou, S.A. Carter, A.L. Fink. Annular oligomeric amyloid intermediates 16 observed by in situ atomic force microscopy. J Biol Chem. 2004;279:24452-9. 17 [44] B. Apostolovic, M. Danial, H.A. Klok. Coiled coils: attractive protein folding motifs for the 18 19 fabrication of self-assembled, responsive and bioactive materials. Chem Soc Rev. 2010;39:3541-20 75. 21 [45] J.M. Mason, K.M. Arndt. Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. 22 ChemBioChem. 2004;5:170-6. 23 [46] K. Beck, B. Brodsky. Supercoiled protein motifs: the collagen triple-helix and the alpha-24 helical coiled coil. J Struct Biol. 1998;122:17-29. 25 [47] S. Mondal, E. Gazit. The Self-Assembly of Helical Peptide Building Blocks. ChemNanoMat. 26 27 2016;2:323-32. 28 [48] Y. Wu, J.H. Collier. alpha-Helical coiled-coil peptide materials for biomedical applications. 29 Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2016. 30 [49] C. Xu, R. Liu, A.K. Mehta, R.C. Guerrero-Ferreira, E.R. Wright, S. Dunin-Horkawicz, et al. 31 Rational design of helical nanotubes from self-assembly of coiled-coil lock washers. J Am Chem 32 Soc. 2013;135:15565-78. 33 [50] S. Kojima, Y. Kuriki, T. Yoshida, K. Yazaki, K. Miura. Fibril formation by an amphipathic 34 alpha-helix-forming polypeptide produced by gene engineering. Proc Jpn Acad Ser B-Phys Biol 35 36 Sci. 1997;73:7-11. 37 [51] S.A. Potekhin, T.N. Melnik, V. Popov, N.F. Lanina, A.A. Vazina, P. Rigler, et al. De novo design 38 of fibrils made of short alpha-helical coiled coil peptides. Chem Biol. 2001;8:1025-32. 39 [52] M.J. Pandya, G.M. Spooner, M. Sunde, J.R. Thorpe, A. Rodger, D.N. Woolfson. Sticky-end 40 assembly of a designed peptide fiber provides insight into protein fibrillogenesis. Biochemistry. 41 2000;39:8728-34. 42 [53] H. Dong, S.E. Paramonov, J.D. Hartgerink. Self-assembly of alpha-helical coiled coil 43 44 nanofibers. J Am Chem Soc. 2008;130:13691-5. 45 [54] E.F. Banwell, E.S. Abelardo, D.J. Adams, M.A. Birchall, A. Corrigan, A.M. Donald, et al. Rational 46 design and application of responsive alpha-helical peptide hydrogels. Nat Mater. 2009;8:596-47 600. 48 [55] J. Heyda, P.E. Mason, P. Jungwirth. Attractive interactions between side chains of histidine-49 histidine and histidine-arginine-based cationic dipeptides in water. J Phys Chem B. 50 2010;114:8744-9. 51 [56] S.M. Liao, Q.S. Du, J.Z. Meng, Z.W. Pang, R.B. Huang. The multiple roles of histidine in protein 52 53 interactions. Chem Cent J. 2013;7:44. 54 [57] L.S. Vermeer, Y. Lan, V. Abbate, E. Ruh, T.T. Bui, L.J. Wilkinson, et al. Conformational 55 flexibility determines selectivity and antibacterial, antiplasmodial, and anticancer potency of 56 cationic alpha-helical peptides. J Biol Chem. 2012;287:34120-33. 57 [58] J. Georgescu, V.H. Munhoz, B. Bechinger. NMR structures of the histidine-rich peptide LAH4 58 in micellar environments: membrane insertion, pH-dependent mode of antimicrobial action, and 59 60 DNA transfection. Biophys J. 2010;99:2507-15. 61 62 63

[59] T.P. Knowles, M. Vendruscolo, C.M. Dobson. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014;15:384-96.

Supplementary Information

Confocal Microscopy: movie 1, 2 3 and 4 (available from the journal website).

Intrinsic photolumenescence of VF-1 aggregates. Serial 0.5 μ m sections of x-y images along the z-axis were obtained with the confocal microscope and subsequently analysed with Image J to obtain 2D movies of VF-1 peptides suspended in water (Movie 1, 15 frames), in PBS1x (Movie 2, 15 frames) or in X-Vivo20 medium (Movie 3, 150 frames). A 3-D reconstruction (Movie 4) of the 150 frames of movie 3 (condition VF-1 / X-Vivo20) was obtained using the Image J software.

Vectofusin-1 Titration with Phosphate by Circular Dichroism

A solution of 0.81 mM vectofusin-1 (0.5 mg/ml) in MilliQ water (40 μ l) was mixed with several microliters of a concentrated stock solution of phosphate at the appropriate pH and filled up to 200 μ l with MilliQ water to obtain a final peptide concentration of 0.1 mg/ml (33 μ M) with a phosphate/peptide ratio between 0 and 512 (0-17 mM). After vortexing, CD spectra of the samples in a quartz cuvette with a path length of 1 mm were acquired on a Jasco J-810 spectrometer at 25°C with wavelengths between 260 and 190 nm in steps of 1 nm with a stepping speed of 50 nm/min. Separate samples were prepared from the same stock solution for each pH and phosphate concentration, and measurements were repeated after 3 days to identify possible time dependent structural changes such as slow fibril formation. Baselines of samples without peptide were subtracted and except for summing the 10 scans acquired for each spectrum and conversion from machine units to mean residual ellipticity (deg cm2 dmol-1), no spectral processing was carried out.



Figure S1: Titration of VF-1 with phosphate at pH 4.6.



Figure S2: Titration of VF-1 with phosphate at pH 7.4.

ARTICLE 4

"Influence of mildly acidic pH conditions on the production of lentiviral and retroviral vectors"

N. Holic, A.K. Seye, S. Majdoul, S. Martin, O. W. Merten A. Galy and D. Fenard

Human Gene Therapy Clinical Development 25:178-185 (2014) Doi: 10.1089/humc.2014.027

_____ **(** 121 **)**_____

Influence of Mildly Acidic pH Conditions on the Production of Lentiviral and Retroviral Vectors

Nathalie Holic,^{1–3,*} Ababacar K. Seye,^{1,2,*} Saliha Majdoul,^{1–3} Samia Martin,¹ Otto W. Merten,¹ Anne Galy,^{1–3} and David Fenard^{1–3}

Abstract

Human immunodeficiency virus type 1-derived lentiviral vectors (LVs) are becoming major tools for gene transfer approaches. Several gene therapy clinical studies involving LVs are currently ongoing. Industrial production of clinical-grade LVs is therefore an important challenge. Some improvements in LV production protocols have already been possible by acting on multiple steps of the production process like transfection, cell culture, or media optimizations. Yet, the effects of physicochemical parameters such as pH remain poorly studied. Mammalian cell cultures are generally performed at neutral pH, which may not be the optimal condition to produce high quantities of LVs with optimal infectious properties. In this study, we showed that lentiviral transient production in HEK293T cells is inversely dependent on the pH value of the harvesting medium. Infectious and physical titers of LVs pseudotyped with GALVTR or VSV-G glycoproteins are enhanced by two- to threefold at pH 6 compared with neutral conditions. pH 6-produced LVs are highly infectious on cell lines but also on relevant primary target cells like hCD34+ hematopoietic stem/progenitor cells. GALVTR-LV particles produced at pH 6 are highly stable at 37°C and resistant to multiple freeze-thaw cycles. Higher levels of expression of intracellular pr55gag polyproteins are observed within HEK293T producer cells cultured at pH 6. The positive effect of pH 6 conditions is also observed for moloney-derived retroviral vectors produced from NIH-3T3 fibroblasts, arguing that the mildly acidic pH effect is not limited to the lentivirus genus and is reproducible in various producer cell lines. This observation may help us in the design of more effective LV production protocols for clinical applications.

Introduction

PRODUCTION OF CLINICAL-GRADE lentiviral vector (LV) remains a challenging operation, and limited yields of vector may eventually hamper therapeutic use and industrial development. Some improvements in LV production protocols have been possible by acting on multiple steps of the production process: transfection optimizations (i.e., transfection reagents, cell density, and plasmid ratio), cell culture conditions (i.e., adherent cells vs. cell suspensions in bioreactor), and media optimizations (e.g., addition of lipids, cholesterol, chloroquine, and sodium butyrate) (Ansorge *et al.*, 2010; Schweizer and Merten, 2010). One widely used parameter in mammalian cell culture is the use of neutral pH conditions. However, it is tempting to speculate that neutral pH may not be the optimal pH to produce high quantities of

In this study, we show that LV transient production in HEK293T cells is inversely dependent on the pH value of the harvesting medium. The production of LVs, pseudotyped with VSV-G or GALVTR [modified gibbon ape leukemia

LVs with optimal infectious properties. Indeed, some primary strains or laboratory adapted strains of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) showed enhanced levels of infectivity at acidic pH compared with neutral pH (Fackler and Peterlin, 2000; Connor, 2006; Maurin *et al.*, 2007). However, HIV-1-derived LVs pseudotyped with the vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein (VSV-G-LVs) are reportedly unstable in a pH 6 solution of phosphate buffer (Higashikawa and Chang, 2001). It is thus unclear whether mildly acidic pH would be a beneficial or deleterious parameter for LVs and whether or not this depends on the use of envelope pseudotypes.

¹Généthon, Evry F-91002, France.

²INSERM, UMR_S951, Evry F-91002, France.

³Université Evry Val d'Essonne, Evry F-91002, France.

^{*}These authors contributed equally to this work.

virus envelope glycoproteins (Sandrin *et al.*, 2002)], in pH 6 medium improved the level of LV production by two- to threefold. LVs produced at pH 6 are highly infectious on cell lines but also on relevant primary target cells like hCD34 + hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs). Immunoblotting experiments have shown that the p55gag precursor was more expressed in HEK293T producer cells cultured at pH 6. GALVTR-LV particles produced at pH 6 were highly stable at 37°C and after exposure to multiple freeze–thaw cycles. Interestingly, this positive effect of pH 6 on LVs is reproducible on moloney-derived retroviral vectors pseudotyped with GALV glycoproteins (GALV-MLV), produced from a stable murine packaging cell line.

Materials and Methods

Peptide and reagents

The vectofusin-1 transduction enhancer was produced by standard fluorenylmethyloxycarbonyl chloride solid-phase peptide synthesis, purified by preparative reverse-phase highperformance liquid chromatography (HPLC), and analyzed by HPLC and mass spectrometry (Genecust, Dudelange, Luxembourg). Peptide purity was >99%; 7-amino-actinomycin D (7-AAD) and Trypan blue were obtained from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France).

Cell line culture

HCT116 cells derived from a human colorectal carcinoma (CCL-247; ATCC, Manassas, VA), human embryonic kidney HEK293T cells (Merten *et al.*, 2011), and retroviral producer PG13-MFG-GFP cells (Merten, 2004) were cultured at 37°C and 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM+glutamax) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Life Technologies, St-Aubin, France). The DMEM was buffered at indicated pH values using hydrochloric acid or sodium hydroxide and was sterile-filtered ($0.22 \mu m$).

Viral vector production and vector titering

HIV-1-derived LVs were generated by transient calcium phosphate transfection of HEK293T cells with four plasmids (Fenard et al., 2013): the gagpol (pKLgagpol) and rev (pKrev) expression plasmids, the transfer plasmid (pCCLsin .cPPT.hPGK.eGFP.WPRE), and the plasmid encoding the GALVTR (pBA.GALV/Ampho-Kana) or VSV-G (pMDG) envelope glycoproteins. About 16-20 hr posttransfection, HEK293T cells were washed and incubated in DMEM/FCS (2–10%) buffered at the indicated pH value ranging from 6 to 8. After 24 hr of production, raw viral supernatants were harvested, filtered (0.45 μ m), and frozen at -80° C. Physical particle titers were determined by measuring HIV-1 p24 capsid contents using a commercial ELISA kit (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Infectious titers were determined on HCT116 cells using the detection of the green fluorescent protein (GFP) by flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) (Fenard et al., 2013). Infectious titers were expressed as transducing units per milliliter (TU/ml).

Human CD34+ cells culture and transduction

Umbilical cord blood (UCB) samples were obtained after uncomplicated births and in accordance with international ethics principles and French national law under declaration No. DC-201-1655 to the French Ministry of Research and Higher Studies. Human CD34+ cells were isolated by immunomagnetic selection (Miltenyi Biotec, Paris, France) from the mononuclear cell fraction of UCB samples and were stored at -80° C. After thawing, the survival rate of hCD34 + cells was evaluated using the Trypan blue exclusion method (Fenard et al., 2013). Next, the preactivation of hCD34+ cells was performed overnight as previously described (Ingrao et al., 2014). Preactivated cells were plated in 96-well plates $(8.3 \times 10^3 \text{ cells/50 } \mu\text{l})$. Transduction was initiated by adding 50 μ l of medium containing the desired amount of LV particles mixed with or without the vectofusin-1 transduction enhancer (final concentration of $12 \,\mu \text{g/ml}$). At 6 hr posttransduction, reactions were diluted by adding 0.3 ml of differentiation medium in each well. After 4-6 days, cellular mortality and transduction efficiency were evaluated, respectively, by 7-AAD labeling and measurement of GFP expression using flow cytometry (FACSCalibur: BD Biosciences). LV stocks used in this experiment were titered on HCT116 cells. Infectious titers for pH 7.2versus pH 6-produced GALVTR-LVs presented a 2.4-fold difference $(6.3 \times 10^6 \text{ vs. } 15 \times 10^6 \text{ TU/ml})$ and 1.5-fold difference for VSV-G-LVs $(1.3 \times 10^8 \text{ vs. } 2 \times 10^8 \text{ TU/ml})$, respectively.

Viral vector exposure to 37°C temperature and multiple freeze-thaw cycles

Frozen vials of pH 7.2- and pH 6-produced GALVTR-LV and VSV-G-LV supernatants were incubated for the indicated time at 37°C, without opening the vials (closed environment) or incubated at 37°C in culture plate wells under 5% CO₂ and 95% humidity (open environment). Next, vials were frozen back at -80°C and titrations on HCT116 cells were performed simultaneously for all the conditions to avoid interexperiment variability.

For the freeze-thaw stability experiment, one frozen vial of GALVTR-LV pH 7.2 and one of pH 6 supernatants were thawed during 30 min at room temperature and frozen back immediately. The next day, the vials were thawed again (freeze-thaw cycle 2), and simultaneously, two vials of GALVTR-LV pH 7.2 or pH 6 supernatants of the same lot were thawed (freeze-thaw cycle 1). It allowed us to concomitantly determine the different GALVTR-LV infectious titers to avoid interexperiment variability.

Western blot experiments and analysis

Producer cells were washed and lysed in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.5% sodium deoxycholate, 10% glycerol, 1 mM EDTA, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) supplemented with complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Meylan, France). Protein concentrations were determined using the Bio-Rad DC Protein Assay Kit I (Bio-Rad, Marnesla-Coquette, France). Proteins (30 μ g/lane) were separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose Hybond ECL membrane (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France), and immunoblotted with a combination of goat anti-p24 (Abd Serotec, Oxford, UK) and mouse anti-actin (AC-15 clone) (Sigma-Aldrich). IRDye 800-conjugated donkey anti-goat and IRDye 680conjugated donkey anti-mouse were used as secondary antibodies (Eurobio, Courtaboeuf, France). Immunoreactive bands were detected with the Odyssey infrared scanner and quantified using Odyssey 3.0 analytical software (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE).

Statistical analysis

In every data set, *p*-values were determined by nonparametric tests using GraphPad Prism 5. *p*-Values ≤ 0.05 were considered significant.

Results and Discussion

Mildly acidic pH conditions improve the production of GALVTR-LV and VSV-G-LV pseudotypes

LVs pseudotyped with GALVTR envelope glycoproteins are highly efficient for human HSPCs targeting (Sandrin *et al.*, 2002; Jacome *et al.*, 2009). Yet, production and purification of GALVTR-LVs remain a challenge and protocols have not been reported yet. The absence of reported information on the optimal pH value for such LV production prompted us to directly measure the efficacy of HEK293T cells to produce GALVTR-LVs in various culture media with a pH range from 6 to 8 (Fig. 1A). The window of pH was maintained between pH 6 and pH 8 and could not be extended further either way because of the buffering effect of DMEM, a culture medium typically used for clinicalgrade production of LVs (Merten et al., 2011). As shown in Fig. 1B, infectious titers of GALVTR-LVs produced in pH 8 medium were strongly impaired in comparison with the typical pH 7.2 condition. On the contrary, infectious titers of GALVTR-LVs produced in pH 6 medium were significantly higher (average of 2.3-fold) than the one obtained at pH 7.2 (Fig. 1B and C). Interestingly, a concomitant increase was observed in the p24 contents of GALVTR-LVs produced at pH 6 (Fig. 1B and D). This positive correlation led to a stable infectivity value of GALVTR-LVs produced either at neutral or mildly acidic pH (Fig. 1B and E), while this parameter was strongly decreased at pH 8 (Fig. 1B). Hence, the use of mildly acidic pH medium seems to be optimal to produce high amounts of GALVTR-LVs.

To assess if mildly acidic conditions also apply to the broadly used VSV-G lentiviral pseudotypes, pH 7.2- or pH 6-buffered DMEM was used to produce VSV-G-LV supernatants. The pH 6 condition significantly increased the production of infectious (Fig. 2A) and physical (Fig. 2B)



FIG. 1. Production of GALVTR-LVs under various pH conditions. (A) DMEM culture media were buffered at indicated pH values using hydrochloric acid or sodium hydroxide. The pH indicator (phenol red) is harboring a color from yellow (pH 6) to purple (pH 8). (B) GALVTR-LV particles were produced from HEK293T cells cultured at the indicated pH value. Infectious titers (TU/ml, black line) were determined on HCT116 cells using the detection of GFP by flow cytometry analysis. Physical particle contents (gray histograms) of GALVTR-LV supernatants were quantified using a commercial HIV-1 p24 ELISA kit. The infectivity value corresponding to the ratio between the infectious titers and the quantity of physical particles (TU/ng of p24) is represented under the histograms. Results are represented as the average of two independent experiments \pm standard deviation (SD). Seven batches of GALVTR-LVs were produced in pH 7.2 or pH 6 culture medium and titered for infectious (C) or physical (D) particles as in (B). (E) The infectivity value (TU/ng of p24) of each GALVTR-LV supernatant is represented. Bars indicate the mean value of the distributions. *p*-Values were determined using Wilcoxon matched pairs tests. DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; GFP, green fluorescent protein; LV, lentiviral vector.



FIG. 2. Production of VSV-G-LVs in neutral or mildly acidic pH conditions. (A) Seven VSV-G-LV batches were produced from HEK293T cells cultured in a medium harboring the indicated pH value. Infectious titers were determined as in Fig. 1B. (B) The quantity of physical particles was determined using a commercial HIV-1 p24 ELISA kit. (C) The infectivity value for each VSV-G-LV batch was calculated. Bars indicate the mean value of the distributions. *p*-Values were determined using Wilcoxon matched pairs tests.

VSV-G-LV particles (average of 1.5-fold), leading to a stable infectivity value (Fig. 2C). While confirming the effect observed with GALVTR-LV, the effect on VSV-G-LV is more modest. The efficacy of the mildly acidic pH condition may be partially pseudotype dependent, and the level of viral particles produced in the supernatant is dependent on the intracellular trafficking efficiency and the expression level of a given envelope glycoprotein (Frecha *et al.*, 2008).

Concerning the cell culture conditions, the microscopic observation of HEK293T producer cells did not reveal any obvious cytotoxic effect of the pH 6 DMEM during the 24 hr period of production. HEK293T cells were still adherent and confluent (data not shown).

Effect of mildly acidic pH conditions on the production of moloney-derived retroviral vectors

To ascertain whether or not the increase in production of viral particles is directly related to the producer cell type (i.e., HEK293T) or to the lentivirus genus, the effect of the pH 6 medium was evaluated on PG13-MFG-GFP murine cells (Merten, 2004), a stable third-generation Moloneyderived retrovirus producer cell line. To produce GALV-MLV particles, PG13-MFG-GFP cells were cultured in either pH 7.2- or pH 6-buffered medium. One to two days later, the content of infectious particles was measured in the cell culture supernatant. As shown in Fig. 3, the production of GALV-MLV particles is significantly enhanced when the production protocol is performed under mildly acidic pH conditions (average of 1.6-fold). This important result shows that the mildly acidic pH effect is not limited to human producer cells and is not strictly dependent on the use of vectors belonging to the lentivirus genus.

Efficient transduction of hCD34+ HSPCs with lentiviral pseudotypes produced at mildly acidic pH

Infectious titers of LVs produced at mildly acidic pH have been evaluated extensively on the highly permissive HCT116 cell line. To ensure that these LV supernatants are also infectious on relevant primary cells, we performed lentiviral transduction of hCD34+ HSPCs isolated from cord blood samples. Preactivated hCD34+ HSPCs transduced

with VSV-G-LVs (Fig. 4A) produced at pH 6 (circles, gray lines) showed greater transduction efficiencies than LV produced at pH 7.2 (circles, black lines), despite the use of identical infectious titers (average of 1.6-fold increase). In the presence of the recently identified vectofusin-1 transduction enhancer (Fenard et al., 2013), transduction efficiencies were highly enhanced (Fig. 4A, squares) and the effect of pH was rapidly saturated, leading to comparable levels of transduction (Fig. 4A). For GALVTR-LVs (Fig. 4B), although transduction of hCD34+ HSPCs is known to be highly inefficient in the absence of transduction enhancers, pH 6-produced GALVTR-LVs were slightly more infectious than pH 7.2-produced GALVTR-LVs at each infectious doses tested, and this observation was reproducible in the presence of vectofusin-1 reaching higher transduction efficiencies, above 70% (Fig. 4B). Although we did not observe any improvement of the infectivity values of LVs produced in mildly acidic pH on HCT116 cells (Figs. 1 and 2), it seems that pH 6-produced LVs are slightly more efficient for the transduction of primary cells like hCD34 + HSPCs, probably because



FIG. 3. Production of GALV-MLVs in neutral or mildly acidic pH conditions. Six GALV-MLV batches were produced from PG13-MFG-GFP cells cultured in a medium harboring the indicated pH value. Infectious titers were determined as in Fig. 1B. Bars indicate the mean value of the distributions. The *p*-Value was determined using Wilcoxon matched pairs test.



FIG. 4. Transduction efficiency of hCD34 + HSPCs with LV supernatants produced at neutral or mildly acidic pH. hCD34+ cells were infected in the absence (circles) or presence (squares) of vectofusin-1 ($12 \mu g/ml$) with increasing concentrations of VSV-G-LVs (A) or GALVTR-LVs (B) produced at mildly acidic pH (gray lines) or neutral pH (black lines). Transduction was measured in the bulk of cultured cells after 4-6 days by following the percentage of GFP+ cells using flow cytometry. Transduction efficiencies (y-axis) are plotted against final infectious titers (x-axis) of pH 7.2- and pH 6-produced LVs. The increasing infectious titers are corresponding to MOI 70, 110, 170, and 280 for VSV-G-LVs and MOI 3, 7, 17, and 42 for GALVTR-LVs. Data are represented as the average of two independent experiments performed in duplicate \pm SEM (*p < 0.05, Mann-Whitney test). MOI, multiplicity of infection.

such primary cells are known to be less permissive than established cell lines (Ingrao *et al.*, 2014).

It is important to note that all the transduction conditions using pH 6-produced LVs were performed at neutral pH. Mildly acidic viral supernatants were rapidly neutralized by the excess of neutral buffered X-Vivo20 medium (the highest viral input of pH6-produced LVs did not exceed 30% of the final transduction volume). This indicates that the beneficial effect of the mildly acidic pH has a direct impact on the quality of the particle, and does not directly affect the transduction steps.

Stability of lentiviral particles following production at mildly acidic pH

Raw supernatants of lentiviral pseudotypes are usually stored at -80° C before use or for subsequent purification

steps. To investigate if production at pH 6 could have a deleterious effect on viral stability during the freezing or the thawing procedure, GALVTR-LV supernatants were subjected to one or two freeze–thaw cycles and infectious titers were determined at each thawing step (Fig. 5A). As shown in Fig. 5B, mildly acidic pH conditions did not affect the infectivity of GALVTR-LV particles after the thawing procedures. The average decrease of infectious titers observed after two versus one freeze–thaw cycle was around 5%, for both pH 7.2 or pH 6 conditions. The infectivity of GALVTR-LVs is therefore not significantly altered when LVs are frozen in mildly acidic pH conditions.

Next, we investigated whether the production of LVs in a mildly acidic pH environment has a deleterious effect on viral particles stability after a long-term exposure to a 37°C temperature. Briefly, frozen vials containing GALVTR-LV supernatants produced at either pH 7.2 or pH 6 were incubated for 0 to 3 days at 37°C (closed environment) and the decrease in infectivity was followed over time. As shown in Fig. 6A, while infectious titers after an exposure at 37°C are strongly reduced, the slope of this decrease is less pronounced for GALVTR-LVs produced at pH 6 in a closed environment. The resulting half-life for pH 6-produced GALVTR-LVs is twice the one observed for pH 7-produced GALVTR-LVs (around 1.9 days vs. 1 day; Fig. 6A, lower panel). Since this experiment was performed in a closed environment, our hypothesis is that the sodium bicarbonate, in the absence of 5% CO₂, is unable to buffer the pH 7-produced GALVTR-LV, leading to some alkalinization of the medium overtime, a deleterious effect for the infectivity (Fig. 1B).

This effect is likely to be counteracted by the excess of hydrogen ions present in the pH 6-produced GALVTR-LVs. Therefore, GALVTR-LV stability experiments have also been performed in an open environment, by incubating viral supernatants at 37°C in a 5% CO₂/95% humidity incubator (Fig. 6A, open). In these conditions, pH 7.2- and pH 6produced GALVTR-LVs harbor the same half-lives, around 1.8 days, suggesting that the absence of CO_2 was certainly the major deleterious effect for pH 7-produced GALVTR-LVs in a closed environment. Interestingly, the widely used VSV-G lentiviral pseudotypes, produced in neutral or mildly acidic pH conditions, have the same stability, either in a closed or in an open environment (Fig. 6B), highlighting the robustness of this envelope glycoprotein. In conclusion, the production of GALVTR-LVs or VSV-G-LVs in mildly acidic pH has no deleterious effect on the stability of the vector over a broad range of temperature.

Of note, this study of viral particle stability has shown that LVs are less sensitive to high temperature as previously thought (Carmo *et al.*, 2009). In an open environment at 37°C and 5% CO₂, raw supernatants of GALVTR-LVs and VSV-G-LVs harbor a half-life around 1.8 days. This discrepancy suggests that other parameters, such as the formulation buffer and purification procedures [i.e., ultracentrifugation (Carmo *et al.*, 2009)], have to be taken into consideration when stability studies of lentiviral particles are performed.

Modulation of the p55gag intracellular expression level in HEK293T producer cells cultured in mildly acidic pH conditions

To investigate why HIV-1 p24 contents in LV supernatants are improved in mildly acidic pH conditions (Fig. 1B



FIG. 5. Study of the stability of infectious GALVTR-LVs after multiple freeze-thaw cycles. (A) Schematic representation of the freezing-thawing protocol. (B) Multiple GALVTR-LV batches, produced at pH 7.2 (black lines) or pH 6 (gray lines), were exposed to one or two freeze-thaw cycles. Infectious titers were concomitantly determined as in Fig. 1B. Data are represented as infectious titers (left panel) or were normalized to the control condition corresponding to one freeze-thaw cycle (right panel).



FIG. 6. Study of the stability of pH 7.2- and pH 6-produced LVs after a long-term exposure to 37° C temperature. Cryotubes containing GALVTR-LV (**A**) or VSV-G-LV (**B**) particles, produced at pH 7.2 (black symbols) or pH 6 (white symbols), were incubated at 37° C for 0–3 days (closed environment). In the same manner, GALVTR-LV or VSV-G-LV particles were incubated at 37° C for 0–3 days in culture plate wells under 95% humidity and 5% CO₂ (open environment). Next, infectious titers were concomitantly determined as in Fig. 1B. Data are represented as the average infectious titers ± SEM normalized to the control condition (viral supernatants not exposed at 37° C) obtained from three to four independent experiments. Mean infectious half-lives (lower panels) have been calculated and represented ± SEM. *p*-Values were determined using Mann–Whitney tests. n.s., not statistical.



FIG. 7. Intracellular expression level of p55gag proteins in producer HEK293T cells cultured in neutral versus mildly acidic pH medium. (A) Western blot analysis of p55gag expression in lysates of HEK293T cells producing GALVTR-LVs and cultured in pH 7.2- or pH 6-buffered medium. The percentages represent the expression level of p55gag normalized to the level of actin. (B) Histograms represent the average quantification of p55gag expression levels normalized to actin expression levels in four independent experiments \pm SD. The *p*-Value was determined using Wilcoxon matched pairs test.

and D), expression levels of the intracellular precursor HIV-1 p55gag in HEK293T producer cells were measured using immunoblotting analysis. As shown in Fig. 7A, intracellular p55gag expression was increased at pH 6 compared with pH 7.2. The average p55gag overexpression level obtained from four independent experiments was around 160% (Fig. 7B). This positive correlation between overexpression of intracellular p55gag and extracellular p24 capsid suggests that the use of mildly acidic pH conditions for producer cells creates a favorable environment for optimal intracellular expression of viral components.

In conclusion, we herein show that the production of lentiviral or gamma-retroviral particles is optimal at pH 6. The use of mildly acidic pH conditions has no deleterious effect on viral stability. Interestingly, a deleterious effect of mildly acidic pH on VSV-G-LV has been reported in a previous study (Higashikawa and Chang, 2001), but the protocol was designed to test the stability of VSV-G-LV particles produced at neutral pH and then transferred to a pH 6-buffered nonionic solution. In our case, VSV-G-LV particles were produced directly in pH 6-buffered culture medium supplemented with FCS, highly enriched in proteins known to stabilize retroviral particles (Carmo *et al.*, 2009), and the particles remained infectious.

Furthermore, we show that LVs produced at pH 6 are highly infectious on established cell lines but also on relevant primary target cells such as hematopoietic progenitor cells. The pH 6 effect seems to act mainly through the establishment of an optimal intracellular environment for the production of particle structural components such as the capsid.

Such beneficial effects on the production process should be exploited to investigate the effect of the pH parameter on the downstream purification steps developed for clinicalgrade LVs, such as the ion exchange chromatography or the tangential flow filtration technology. A better LV-particle stability resulting from production at mildly acidic pH may improve the yield of infectious particles recovery during the purification procedure. This could be of high interest for lentiviral pseudotypes (e.g., GALVTR-LVs) for which current purification procedures are not effective (unpublished results) (Leath and Cornetta, 2012).

Acknowledgments

This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM) and the 7th European Commission Framework Program (FP7) "PERSIST" (agreement 222878). We thank Genethon collaborators, in particular Armelle Viornery, for cord blood processing. We are very grateful to the mothers and staff of the Maternité de l'hôpital Louise Michel, Evry, France, for providing us with umbilical cord blood samples.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Ansorge, S., Henry, O., and Kamen, A. (2010). Recent progress in lentiviral vector mass production. Biochem. Eng. J. 48, 362–377.
- Carmo, M., Alves, A., Rodrigues, A.F., *et al.* (2009). Stabilization of gammaretroviral and lentiviral vectors: from production to gene transfer. J. Gene Med. 11, 670–678.
- Connor, R.I. (2006). Sensitivity of non-clade B primary HIV-1 isolates to mildly acidic pH. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 43, 499–501.
- Fackler, O.T., and Peterlin, B.M. (2000). Endocytic entry of HIV-1. Curr. Biol. 10, 1005–1008.
- Fenard, D., Ingrao, D., Seye, A., et al. (2013). Vectofusin-1, a new viral entry enhancer, strongly promotes lentiviral transduction of human hematopoietic stem cells. Mol. Ther. Nucleic Acids 2, e90.
- Frecha, C., Szecsi, J., Cosset, F.L., et al. (2008). Strategies for targeting lentiviral vectors. Curr. Gene Ther. 8, 449–460.
- Higashikawa, F., and Chang, L. (2001). Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors. Virology 280, 124–131.
- Ingrao, D., Majdoul, S., Seye, A.K., *et al.* (2014). Concurrent measures of fusion and transduction efficiency of primary CD34+ cells with human immunodeficiency virus 1-based lentiviral vectors reveal different effects of transduction enhancers. Hum. Gene Ther. Methods 25, 48–56.
- Jacome, A., Navarro, S., Rio, P., *et al.* (2009). Lentiviral-mediated genetic correction of hematopoietic and mesenchymal progenitor cells from Fanconi anemia patients. Mol. Ther. 17, 1083–1092.

MILDLY ACIDIC PH IMPROVES RETROVIRAL PRODUCTION

- Leath, A., and Cornetta, K. (2012). Developing novel lentiviral vectors into clinical products. Methods Enzymol. 507, 89– 108.
- Maurin, T., Fenard, D., Lambeau, G., *et al.* (2007). An envelope-determined endocytic route of viral entry allows HIV-1 to escape from secreted phospholipase A(2) entry blockade. J. Mol. Biol. 367, 702–714.
- Merten, O.W. (2004). State-of-the-art of the production of retroviral vectors. J. Gene Med. 6 Suppl 1, S105–S124.
- Merten, O.W., Charrier, S., Laroudie, N., *et al.* (2011). Largescale manufacture and characterization of a lentiviral vector produced for clinical *ex vivo* gene therapy application. Hum. Gene Ther. 22, 343–356.
- Sandrin, V., Boson, B., Salmon, P., *et al.* (2002). Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope gly-coprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. Blood 100, 823–832.
- Schweizer, M., and Merten, O.W. (2010). Large-scale production means for the manufacturing of lentiviral vectors. Curr. Gene Ther. 10, 474–486.

Address correspondence to: Dr. David Fenard Généthon/INSERM/UMR_S951 Ibis, rue de l'Internationale BP60 F-91002 Evry Cedex France

E-mail: dfenard@genethon.fr

Dr. Anne Galy Généthon/INSERM/UMR_S951 Ibis, rue de l'Internationale BP60 F-91002 Evry Cedex France

E-mail: galy@genethon.fr

Received for publication March 10, 2014; accepted after revision July 28, 2014.

Published online: July 29, 2014.

BIBLIOGRAPHIE

- N.S. Templeton 2008. Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies. Third Edition
- Adi-Harel, S., S. Erlich, E. Schmukler, S. Cohen-Kedar, O. Segev, L. Mizrachy, J.A. Hirsch, and R. Pinkas-Kramarski. 2010. Beclin 1 self-association is independent of autophagy induction by amino acid deprivation and rapamycin treatment. Journal of cellular biochemistry 110:1262-1271.
- Aiuti, A., L. Biasco, S. Scaramuzza, F. Ferrua, M.P. Cicalese, C. Baricordi, F. Dionisio, A. Calabria, S. Giannelli, M.C. Castiello, M. Bosticardo, C. Evangelio, A. Assanelli, M. Casiraghi, S. Di Nunzio, L. Callegaro, C. Benati, P. Rizzardi, D. Pellin, C. Di Serio, M. Schmidt, C. Von Kalle, J. Gardner, N. Mehta, V. Neduva, D.J. Dow, A. Galy, R. Miniero, A. Finocchi, A. Metin, P.P. Banerjee, J.S. Orange, S. Galimberti, M.G. Valsecchi, A. Biffi, E. Montini, A. Villa, F. Ciceri, M.G. Roncarolo, and L. Naldini. 2013. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. Science 341:1233151.
- Aiuti, A., F. Cattaneo, S. Galimberti, U. Benninghoff, B. Cassani, L. Callegaro, S. Scaramuzza, G. Andolfi, M. Mirolo, I. Brigida, A. Tabucchi, F. Carlucci, M. Eibl, M. Aker, S. Slavin, H. Al-Mousa, A. Al Ghonaium, A. Ferster, A. Duppenthaler, L. Notarangelo, U. Wintergerst, R.H. Buckley, M. Bregni, S. Marktel, M.G. Valsecchi, P. Rossi, F. Ciceri, R. Miniero, C. Bordignon, and M.G. Roncarolo. 2009. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. The New England journal of medicine 360:447-458.
- Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto, and I.L. Weissman. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. Nature 404:193-197.
- Alexaki, A., Y. Liu, and B. Wigdahl. 2008. Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. Current HIV research 6:388-400.
- Amirache, F., C. Levy, C. Costa, P.E. Mangeot, B.E. Torbett, C.X. Wang, D. Negre, F.L. Cosset, and E. Verhoeyen. 2014. Mystery solved: VSV-G-LVs do not allow efficient gene transfer into unstimulated T cells, B cells, and HSCs because they lack the LDL receptor. Blood 123:1422-1424.
- Appelqvist, H., P. Waster, K. Kagedal, and K. Ollinger. 2013. The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. Journal of molecular cell biology 5:214-226.
- Arcasoy, S.M., J.D. Latoche, M. Gondor, B.R. Pitt, and J.M. Pilewski. 1997. Polycations increase the efficiency of adenovirus-mediated gene transfer to epithelial and endothelial cells in vitro. Gene therapy 4:32-38.
- Arhel, N.J., S. Souquere-Besse, S. Munier, P. Souque, S. Guadagnini, S. Rutherford, M.C. Prevost, T.D. Allen, and P. Charneau. 2007. HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. The EMBO journal 26:3025-3037.
- Bachand, F., X.J. Yao, M. Hrimech, N. Rougeau, and E.A. Cohen. 1999. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 gag precursor. The Journal of biological chemistry 274:9083-9091.
- Barde, I., P. Salmon, and D. Trono. 2010. Production and titration of lentiviral vectors. Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N. Crawley ... [et al.] Chapter 4:Unit 4 21.
- Bartosch, B., J. Dubuisson, and F.L. Cosset. 2003. Infectious hepatitis C virus pseudoparticles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. The Journal of experimental medicine 197:633-642.
- Bauckman, K.A., N. Owusu-Boaitey, and I.U. Mysorekar. 2015. Selective autophagy: xenophagy. Methods 75:120-127.
- Bechinger, B. 1996. Towards membrane protein design: pH-sensitive topology of histidinecontaining polypeptides. Journal of molecular biology 263:768-775.

- Bechinger, B., R. Kinder, M. Helmle, T.C. Vogt, U. Harzer, and S. Schinzel. 1999. Peptide structural analysis by solid-state NMR spectroscopy. Biopolymers 51:174-190.
- Bechinger, B., V. Vidovic, P. Bertani, and A. Kichler. 2011. A new family of peptide-nucleic acid nanostructures with potent transfection activities. Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society 17:88-93.
- Benjouad, A., K. Mabrouk, M. Moulard, J.C. Gluckman, H. Rochat, J. Van Rietschoten, and J.M. Sabatier. 1993. Cytotoxic effect on lymphocytes of Tat from human immunodeficiency virus (HIV-1). FEBS letters 319:119-124.
- Berkhout, B., and K.T. Jeang. 1992. Functional roles for the TATA promoter and enhancers in basal and Tat-induced expression of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. Journal of virology 66:139-149.
- Bernales, S., S. Schuck, and P. Walter. 2007. ER-phagy: selective autophagy of the endoplasmic reticulum. Autophagy 3:285-287.
- Bianchi, M., A. Hakkim, V. Brinkmann, U. Siler, R.A. Seger, A. Zychlinsky, and J. Reichenbach. 2009. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. Blood 114:2619-2622.
- Blanchet, F.P., A. Moris, D.S. Nikolic, M. Lehmann, S. Cardinaud, R. Stalder, E. Garcia, C. Dinkins, F. Leuba, L. Wu, O. Schwartz, V. Deretic, and V. Piguet. 2010. Human immunodeficiency virus-1 inhibition of immunoamphisomes in dendritic cells impairs early innate and adaptive immune responses. Immunity 32:654-669.
- Bonini, C., M. Grez, C. Traversari, F. Ciceri, S. Marktel, G. Ferrari, M. Dinauer, M. Sadat, A. Aiuti, S. Deola, M. Radrizzani, A. Hagenbeek, J. Apperley, S. Ebeling, A. Martens, H.J. Kolb, M. Weber, F. Lotti, A. Grande, E. Weissinger, J.A. Bueren, M. Lamana, J.H. Falkenburg, M.H. Heemskerk, T. Austin, S. Kornblau, F. Marini, C. Benati, Z. Magnani, S. Cazzaniga, S. Toma, C. Gallo-Stampino, M. Introna, S. Slavin, P.D. Greenberg, M. Bregni, F. Mavilio, and C. Bordignon. 2003. Safety of retroviral gene marking with a truncated NGF receptor. Nat. Med. 9:367-369.
- Borel, S., V. Robert-Hebmann, J. Alfaisal, A. Jain, M. Faure, L. Espert, L. Chaloin, J.C. Paillart, T. Johansen, and M. Biard-Piechaczyk. 2015. HIV-1 viral infectivity factor interacts with microtubule-associated protein light chain 3 and inhibits autophagy. AIDS 29:275-286.
- Boztug, K., M. Schmidt, A. Schwarzer, P.P. Banerjee, I.A. Diez, R.A. Dewey, M. Bohm, A. Nowrouzi, C.R. Ball, H. Glimm, S. Naundorf, K. Kuhlcke, R. Blasczyk, I. Kondratenko, L. Marodi, J.S. Orange, C. von Kalle, and C. Klein. 2010. Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. The New England journal of medicine 363:1918-1927.
- Brady, J., and F. Kashanchi. 2005. Tat gets the "green" light on transcription initiation. Retrovirology 2:69.
- Brass, A.L., D.M. Dykxhoorn, Y. Benita, N. Yan, A. Engelman, R.J. Xavier, J. Lieberman, and S.J. Elledge. 2008. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. Science 319:921-926.
- Braun, C.J., K. Boztug, A. Paruzynski, M. Witzel, A. Schwarzer, M. Rothe, U. Modlich, R. Beier, G. Gohring, D. Steinemann, R. Fronza, C.R. Ball, R. Haemmerle, S. Naundorf, K. Kuhlcke, M. Rose, C. Fraser, L. Mathias, R. Ferrari, M.R. Abboud, W. Al-Herz, I. Kondratenko, L. Marodi, H. Glimm, B. Schlegelberger, A. Schambach, M.H. Albert, M. Schmidt, C. von Kalle, and C. Klein. 2014. Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome--long-term efficacy and genotoxicity. Science translational medicine 6:227ra233.
- Campbell, E.M., and T.J. Hope. 2015. HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. Nature reviews. Microbiology 13:471-483.

- Campbell, G.R., P. Rawat, R.S. Bruckman, and S.A. Spector. 2015. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Inhibits Autophagy through Transcription Factor EB Sequestration. PLoS pathogens 11:e1005018.
- Campbell, S.M., S.M. Crowe, and J. Mak. 2001. Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. J. Clin. Virol. 22:217-227.
- Cao, Y., A. Zhang, J. Cai, N. Yuan, W. Lin, S. Liu, F. Xu, L. Song, X. Li, Y. Fang, Z. Wang, J. Wang, H. Zhang, W. Zhao, S. Hu, and S. Zhang. 2015. Autophagy regulates the cell cycle of murine HSPCs in a nutrient-dependent manner. Experimental hematology 43:229-242.
- Cartier, N., S. Hacein-Bey-Abina, C.C. Bartholomae, P. Bougneres, M. Schmidt, C.V. Kalle, A. Fischer, M. Cavazzana-Calvo, and P. Aubourg. 2012. Lentiviral hematopoietic cell gene therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. Methods in enzymology 507:187-198.
- Cartier, N., S. Hacein-Bey-Abina, C.C. Bartholomae, G. Veres, M. Schmidt, I. Kutschera, M. Vidaud, U. Abel, L. Dal-Cortivo, L. Caccavelli, N. Mahlaoui, V. Kiermer, D. Mittelstaedt, C. Bellesme, N. Lahlou, F. Lefrere, S. Blanche, M. Audit, E. Payen, P. Leboulch, B. l'Homme, P. Bougneres, C. Von Kalle, A. Fischer, M. Cavazzana-Calvo, and P. Aubourg. 2009. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. Science 326:818-823.
- Cartier, N., S. Hacein-Bey-Abina, C. Von Kalle, P. Bougneres, A. Fischer, M. Cavazzana-Calvo, and P. Aubourg. 2010. [Gene therapy of x-linked adrenoleukodystrophy using hematopoietic stem cells and a lentiviral vector]. Bulletin de l'Academie nationale de medecine 194:255-264; discussion 264-258.
- Castellano, L.M., and J. Shorter. 2012. The Surprising Role of Amyloid Fibrils in HIV Infection. Biology 1:58-80.
- Cavazzana-Calvo, M., S. Hacein-Bey, G. de Saint Basile, F. Gross, E. Yvon, P. Nusbaum, F. Selz, C. Hue, S. Certain, J.L. Casanova, P. Bousso, F.L. Deist, and A. Fischer. 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. Science 288:669-672.
- Cavazzana-Calvo, M., E. Payen, O. Negre, G. Wang, K. Hehir, F. Fusil, J. Down, M. Denaro, T. Brady, K. Westerman, R. Cavallesco, B. Gillet-Legrand, L. Caccavelli, R. Sgarra, L. Maouche-Chretien, F. Bernaudin, R. Girot, R. Dorazio, G.J. Mulder, A. Polack, A. Bank, J. Soulier, J. Larghero, N. Kabbara, B. Dalle, B. Gourmel, G. Socie, S. Chretien, N. Cartier, P. Aubourg, A. Fischer, K. Cornetta, F. Galacteros, Y. Beuzard, E. Gluckman, F. Bushman, S. Hacein-Bey-Abina, and P. Leboulch. 2010. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. Nature 467:318-322.
- Cavrois, M., J. Neidleman, M. Bigos, and W.C. Greene. 2004. Fluorescence resonance energy transfer-based HIV-1 virion fusion assay. Methods Mol. Biol. 263:333-344.
- Charrier, S., L. Dupre, S. Scaramuzza, L. Jeanson-Leh, M.P. Blundell, O. Danos, F. Cattaneo, A. Aiuti, R. Eckenberg, A.J. Thrasher, M.G. Roncarolo, and A. Galy. 2007. Lentiviral vectors targeting WASp expression to hematopoietic cells, efficiently transduce and correct cells from WAS patients. Gene therapy 14:415-428.
- Charrier, S., D. Stockholm, K. Seye, P. Opolon, M. Taveau, D.A. Gross, S. Bucher-Laurent, C. Delenda, W. Vainchenker, O. Danos, and A. Galy. 2005. A lentiviral vector encoding the human Wiskott-Aldrich syndrome protein corrects immune and cytoskeletal defects in WASP knockout mice. Gene therapy 12:597-606.
- Chien, M.P., C.H. Lin, and D.K. Chang. 2009. Recruitment of HIV-1 envelope occurs subsequent to lipid mixing: a fluorescence microscopic evidence. Retrovirology 6:20.
- Chotinantakul, K., and W. Leeanansaksiri. 2012. Hematopoietic stem cell development, niches, and signaling pathways. Bone marrow research 2012:270425.

- Christodoulopoulos, I., and P.M. Cannon. 2001. Sequences in the cytoplasmic tail of the gibbon ape leukemia virus envelope protein that prevent its incorporation into lentivirus vectors. Journal of virology 75:4129-4138.
- Coll, J.M. 1995. The glycoprotein G of rhabdoviruses. Archives of virology 140:827-851.
- Collins, J.F., L. Bai, and F.K. Ghishan. 2004. The SLC20 family of proteins: dual functions as sodium-phosphate cotransporters and viral receptors. Pflugers Arch. 447:647-652.
- Cornetta, K., and W.F. Anderson. 1989. Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated gene-transfer: implications for human gene therapy. Journal of virological methods 23:187-194.
- Das, A.T., A. Harwig, and B. Berkhout. 2011. The HIV-1 Tat protein has a versatile role in activating viral transcription. Journal of virology 85:9506-9516.
- Davis, H.E., M. Rosinski, J.R. Morgan, and M.L. Yarmush. 2004. Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. Biophysical journal 86:1234-1242.
- Delgado, M.A., and V. Deretic. 2009. Toll-like receptors in control of immunological autophagy. Cell death and differentiation 16:976-983.
- Delgado, M.A., R.A. Elmaoued, A.S. Davis, G. Kyei, and V. Deretic. 2008. Toll-like receptors control autophagy. The EMBO journal 27:1110-1121.
- DePolo, N.J., J.D. Reed, P.L. Sheridan, K. Townsend, S.L. Sauter, D.J. Jolly, and T.W. Dubensky, Jr. 2000. VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 2:218-222.
- Deretic, V., and B. Levine. 2009. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. Cell host & microbe 5:527-549.
- Dewaele, M., W. Martinet, N. Rubio, T. Verfaillie, P.A. de Witte, J. Piette, and P. Agostinis. 2011. Autophagy pathways activated in response to PDT contribute to cell resistance against ROS damage. Journal of cellular and molecular medicine 15:1402-1414.
- Di Bartolomeo, S., M. Corazzari, F. Nazio, S. Oliverio, G. Lisi, M. Antonioli, V. Pagliarini, S. Matteoni, C. Fuoco, L. Giunta, M. D'Amelio, R. Nardacci, A. Romagnoli, M. Piacentini, F. Cecconi, and G.M. Fimia. 2010. The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. The Journal of cell biology 191:155-168.
- Diao, J., R. Liu, Y. Rong, M. Zhao, J. Zhang, Y. Lai, Q. Zhou, L.M. Wilz, J. Li, S. Vivona, R.A. Pfuetzner, A.T. Brunger, and Q. Zhong. 2015. ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. Nature 520:563-566.
- Dice, J.F. 2007. Chaperone-mediated autophagy. Autophagy 3:295-299.
- Ding, W.X., and X.M. Yin. 2012. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. Biological chemistry 393:547-564.
- Dinkins, C., M. Pilli, and J.H. Kehrl. 2015. Roles of autophagy in HIV infection. Immunology and cell biology 93:11-17.
- Dishart, K.L., L. Denby, S.J. George, S.A. Nicklin, S. Yendluri, M.J. Tuerk, M.P. Kelley, B.A. Donahue, A.C. Newby, T. Harding, and A.H. Baker. 2003. Third-generation lentivirus vectors efficiently transduce and phenotypically modify vascular cells: implications for gene therapy. Journal of molecular and cellular cardiology 35:739-748.
- Doitsh, G., N.L. Galloway, X. Geng, Z. Yang, K.M. Monroe, O. Zepeda, P.W. Hunt, H. Hatano, S. Sowinski, I. Munoz-Arias, and W.C. Greene. 2014. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. Nature 505:509-514.
- Donello, J.E., J.E. Loeb, and T.J. Hope. 1998. Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. Journal of virology 72:5085-5092.
- Dong, X., and B. Levine. 2013. Autophagy and viruses: adversaries or allies? Journal of innate immunity 5:480-493.

- Dreux, M., and F.V. Chisari. 2010. Viruses and the autophagy machinery. Cell Cycle 9:1295-1307.
- Duisit, G., H. Conrath, S. Saleun, S. Folliot, N. Provost, F.L. Cosset, V. Sandrin, P. Moullier, and F. Rolling. 2002. Five recombinant simian immunodeficiency virus pseudotypes lead to exclusive transduction of retinal pigmented epithelium in rat. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 6:446-454.
- Dull, T., R. Zufferey, M. Kelly, R.J. Mandel, M. Nguyen, D. Trono, and L. Naldini. 1998. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. Journal of virology 72:8463-8471.
- Eberle, H.B., R.L. Serrano, J. Fullekrug, A. Schlosser, W.D. Lehmann, F. Lottspeich, D. Kaloyanova, F.T. Wieland, and J.B. Helms. 2002. Identification and characterization of a novel human plant pathogenesis-related protein that localizes to lipid-enriched microdomains in the Golgi complex. Journal of cell science 115:827-838.
- Eckfeldt, C.E., E.M. Mendenhall, and C.M. Verfaillie. 2005. The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell. Nature reviews. Molecular cell biology 6:726-737.
- Eekels, J.J., S. Sagnier, D. Geerts, R.E. Jeeninga, M. Biard-Piechaczyk, and B. Berkhout. 2012. Inhibition of HIV-1 replication with stable RNAi-mediated knockdown of autophagy factors. Virology journal 9:69.
- English, L., M. Chemali, and M. Desjardins. 2009. Nuclear membrane-derived autophagy, a novel process that participates in the presentation of endogenous viral antigens during HSV-1 infection. Autophagy 5:1026-1029.
- Erlich, S., L. Mizrachy, O. Segev, L. Lindenboim, O. Zmira, S. Adi-Harel, J.A. Hirsch, R. Stein, and R. Pinkas-Kramarski. 2007. Differential interactions between Beclin 1 and Bcl-2 family members. Autophagy 3:561-568.
- Espert, L., P. Codogno, and M. Biard-Piechaczyk. 2007. Involvement of autophagy in viral infections: antiviral function and subversion by viruses. J Mol Med (Berl) 85:811-823.
- Espert, L., M. Denizot, M. Grimaldi, V. Robert-Hebmann, B. Gay, M. Varbanov, P. Codogno, and M. Biard-Piechaczyk. 2006. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. The Journal of clinical investigation 116:2161-2172.
- Espert, L., M. Varbanov, V. Robert-Hebmann, S. Sagnier, I. Robbins, F. Sanchez, V. Lafont, and M. Biard-Piechaczyk. 2009. Differential role of autophagy in CD4 T cells and macrophages during X4 and R5 HIV-1 infection. PloS one 4:e5787.
- Fenard, D., S. Genries, D. Scherman, A. Galy, S. Martin, and A. Kichler. 2013a. Infectivity enhancement of different HIV-1-based lentiviral pseudotypes in presence of the cationic amphipathic peptide LAH4-L1. J. Virol. Methods 189:375-378.
- Fenard, D., S. Genries, D. Scherman, A. Galy, S. Martin, and A. Kichler. 2013b. Infectivity enhancement of different HIV-1-based lentiviral pseudotypes in presence of the cationic amphipathic peptide LAH4-L1. Journal of virological methods 189:375-378.
- Fenard, D., D. Ingrao, A. Seye, J. Buisset, S. Genries, S. Martin, A. Kichler, and A. Galy. 2013c. Vectofusin-1, a new viral entry enhancer, strongly promotes lentiviral transduction of human hematopoietic stem cells. Mol. Ther. Nucleic Acids 2:e90.
- Fenard, D., A. Kichler, and S. Martin. 2013d. Peptides with viral infection enhancing properties and their use. WO2013001041-A1
- Feng, Y., D. He, Z. Yao, and D.J. Klionsky. 2014. The machinery of macroautophagy. Cell research 24:24-41.
- Finkelshtein, D., A. Werman, D. Novick, S. Barak, and M. Rubinstein. 2013. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110:7306-7311.
- Fischer, A. 2004. Human primary immunodeficiency diseases: a perspective. Nature immunology 5:23-30.

- Fogel, A.I., B.J. Dlouhy, C. Wang, S.W. Ryu, A. Neutzner, S.A. Hasson, D.P. Sideris, H. Abeliovich, and R.J. Youle. 2013. Role of membrane association and Atg14dependent phosphorylation in beclin-1-mediated autophagy. Molecular and cellular biology 33:3675-3688.
- Foster, J.L., S.J. Denial, B.R. Temple, and J.V. Garcia. 2011. Mechanisms of HIV-1 Nef function and intracellular signaling. Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology 6:230-246.
- Foster, J.L., and J.V. Garcia. 2008. HIV-1 Nef: at the crossroads. Retrovirology 5:84.
- Frankel, A.D., and C.O. Pabo. 1988. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. Cell 55:1189-1193.
- Frecha, C., C. Costa, C. Levy, D. Negre, S.J. Russell, A. Maisner, G. Salles, K.W. Peng, F.L. Cosset, and E. Verhoeyen. 2009. Efficient and stable transduction of resting B lymphocytes and primary chronic lymphocyte leukemia cells using measles virus gp displaying lentiviral vectors. Blood 114:3173-3180.
- Frecha, C., C. Costa, D. Negre, E. Gauthier, S.J. Russell, F.L. Cosset, and E. Verhoeyen. 2008a. Stable transduction of quiescent T cells without induction of cycle progression by a novel lentiviral vector pseudotyped with measles virus glycoproteins. Blood 112:4843-4852.
- Frecha, C., F. Fusil, F.L. Cosset, and E. Verhoeyen. 2011. In vivo gene delivery into hCD34+ cells in a humanized mouse model. Methods Mol Biol 737:367-390.
- Frecha, C., J. Szecsi, F.L. Cosset, and E. Verhoeyen. 2008b. Strategies for targeting lentiviral vectors. Current gene therapy 8:449-460.
- Freed, E.O. 2015. HIV-1 assembly, release and maturation. Nature reviews. Microbiology 13:484-496.
- Friedmann, T. 1992. A brief history of gene therapy. Nature genetics 2:93-98.
- Fukushi, S., T. Mizutani, M. Saijo, S. Matsuyama, N. Miyajima, F. Taguchi, S. Itamura, I. Kurane, and S. Morikawa. 2005. Vesicular stomatitis virus pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. The Journal of general virology 86:2269-2274.
- Galluzzi, L., and G. Kroemer. 2013. Common and divergent functions of Beclin 1 and Beclin 2. Cell research 23:1341-1342.
- Galy, A., M.G. Roncarolo, and A.J. Thrasher. 2008. Development of lentiviral gene therapy for Wiskott Aldrich syndrome. Expert opinion on biological therapy 8:181-190.
- Galy, A., and A.J. Thrasher. 2011. Gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. Current opinion in allergy and clinical immunology 11:545-550.
- Gama-Norton, L., L. Botezatu, S. Herrmann, M. Schweizer, P.M. Alves, H. Hauser, and D. Wirth. 2011. Lentivirus production is influenced by SV40 large T-antigen and chromosomal integration of the vector in HEK293 cells. Human gene therapy 22:1269-1279.
- Garcia-Prat, L., M. Martinez-Vicente, E. Perdiguero, L. Ortet, J. Rodriguez-Ubreva, E. Rebollo, V. Ruiz-Bonilla, S. Gutarra, E. Ballestar, A.L. Serrano, M. Sandri, and P. Munoz-Canoves. 2016. Autophagy maintains stemness by preventing senescence. Nature 529:37-42.
- Gatti, R.A., H.J. Meuwissen, H.D. Allen, R. Hong, and R.A. Good. 1968. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. Lancet 2:1366-1369.
- Geraerts, M., S. Willems, V. Baekelandt, Z. Debyser, and R. Gijsbers. 2006. Comparison of lentiviral vector titration methods. BMC biotechnology 6:34.
- Ghosh, S., A.J. Thrasher, and H.B. Gaspar. 2015. Gene therapy for monogenic disorders of the bone marrow. British journal of haematology

- Gibbs, G.M., K. Roelants, and M.K. O'Bryan. 2008. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense. Endocrine reviews 29:865-897.
- Girard-Gagnepain, A., F. Amirache, C. Costa, C. Levy, C. Frecha, F. Fusil, D. Negre, D. Lavillette, F.L. Cosset, and E. Verhoeyen. 2014. Baboon envelope pseudotyped LVs outperform VSV-G-LVs for gene transfer into early-cytokine-stimulated and resting HSCs. Blood 124:1221-1231.
- Glickman, M.H., and A. Ciechanover. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. Physiological reviews 82:373-428.
- Gomez-Puerto, M.C., H. Folkerts, A.T. Wierenga, K. Schepers, J.J. Schuringa, P.J. Coffer, and E. Vellenga. 2016a. Autophagy proteins ATG5 and ATG7 are essential for the maintenance of human CD34 hematopoietic stem-progenitor cells. Stem Cells
- Gomez-Puerto, M.C., H. Folkerts, A.T. Wierenga, K. Schepers, J.J. Schuringa, P.J. Coffer, and E. Vellenga. 2016b. Autophagy Proteins ATG5 and ATG7 Are Essential for the Maintenance of Human CD34(+) Hematopoietic Stem-Progenitor Cells. Stem Cells 34:1651-1663.
- Gonzalez, M.E. 2015. Vpu Protein: The Viroporin Encoded by HIV-1. Viruses 7:4352-4368.
- Hacein-Bey-Abina, S., A. Garrigue, G.P. Wang, J. Soulier, A. Lim, E. Morillon, E. Clappier, L. Caccavelli, E. Delabesse, K. Beldjord, V. Asnafi, E. MacIntyre, L. Dal Cortivo, I. Radford, N. Brousse, F. Sigaux, D. Moshous, J. Hauer, A. Borkhardt, B.H. Belohradsky, U. Wintergerst, M.C. Velez, L. Leiva, R. Sorensen, N. Wulffraat, S. Blanche, F.D. Bushman, A. Fischer, and M. Cavazzana-Calvo. 2008. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. The Journal of clinical investigation 118:3132-3142.
- Hacein-Bey-Abina, S., J. Hauer, A. Lim, C. Picard, G.P. Wang, C.C. Berry, C. Martinache, F. Rieux-Laucat, S. Latour, B.H. Belohradsky, L. Leiva, R. Sorensen, M. Debre, J.L. Casanova, S. Blanche, A. Durandy, F.D. Bushman, A. Fischer, and M. Cavazzana-Calvo. 2010. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. The New England journal of medicine 363:355-364.
- Hacein-Bey Abina, S., H.B. Gaspar, J. Blondeau, L. Caccavelli, S. Charrier, K. Buckland, C. Picard, E. Six, N. Himoudi, K. Gilmour, A.M. McNicol, H. Hara, J. Xu-Bayford, C. Rivat, F. Touzot, F. Mavilio, A. Lim, J.M. Treluyer, S. Heritier, F. Lefrere, J. Magalon, I. Pengue-Koyi, G. Honnet, S. Blanche, E.A. Sherman, F. Male, C. Berry, N. Malani, F.D. Bushman, A. Fischer, A.J. Thrasher, A. Galy, and M. Cavazzana. 2015. Outcomes following gene therapy in patients with severe Wiskott-Aldrich syndrome. Jama 313:1550-1563.
- Hailey, D.W., A.S. Rambold, P. Satpute-Krishnan, K. Mitra, R. Sougrat, P.K. Kim, and J. Lippincott-Schwartz. 2010. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. Cell 141:656-667.
- Hanenberg, H., X.L. Xiao, D. Dilloo, K. Hashino, I. Kato, and D.A. Williams. 1996. Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. Nature medicine 2:876-882.
- Hannig, J., D. Zhang, D.J. Canaday, M.A. Beckett, R.D. Astumian, R.R. Weichselbaum, and R.C. Lee. 2000. Surfactant sealing of membranes permeabilized by ionizing radiation. Radiation research 154:171-177.
- Hansen, T.E., and T. Johansen. 2011. Following autophagy step by step. BMC biology 9:39.
- Harrich, D., G. Mavankal, A. Mette-Snider, and R.B. Gaynor. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 TAR element revertant viruses define RNA structures required for efficient viral gene expression and replication. Journal of virology 69:4906-4913.

- Hayashi-Nishino, M., N. Fujita, T. Noda, A. Yamaguchi, T. Yoshimori, and A. Yamamoto. 2009. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. Nature cell biology 11:1433-1437.
- He, C., and B. Levine. 2010. The Beclin 1 interactome. Current opinion in cell biology 22:140-149.
- He, C., Y. Wei, K. Sun, B. Li, X. Dong, Z. Zou, Y. Liu, L.N. Kinch, S. Khan, S. Sinha, R.J. Xavier, N.V. Grishin, G. Xiao, E.L. Eskelinen, P.E. Scherer, J.L. Whistler, and B. Levine. 2013. Beclin 2 functions in autophagy, degradation of G protein-coupled receptors, and metabolism. Cell 154:1085-1099.
- Hodgson, C.P., and F. Solaiman. 1996. Virosomes: cationic liposomes enhance retroviral transduction. Nature biotechnology 14:339-342.
- Holic, N., and D. Fenard. 2016. Production of Retrovirus-Based Vectors in Mildly Acidic pH Conditions. Methods Mol. Biol. 1448:41-48.
- Hosokawa, N., T. Hara, T. Kaizuka, C. Kishi, A. Takamura, Y. Miura, S. Iemura, T. Natsume, K. Takehana, N. Yamada, J.L. Guan, N. Oshiro, and N. Mizushima. 2009. Nutrientdependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. Molecular biology of the cell 20:1981-1991.
- Hu, D., J. Zhang, H. Wang, S. Liu, L. Yu, L. Sun, and Y. Qu. 2014. Chikungunya virus glycoproteins pseudotype with lentiviral vectors and reveal a broad spectrum of cellular tropism. PloS one 9:e110893.
- Huang, W., W. Choi, W. Hu, N. Mi, Q. Guo, M. Ma, M. Liu, Y. Tian, P. Lu, F.L. Wang, H. Deng, L. Liu, N. Gao, L. Yu, and Y. Shi. 2012. Crystal structure and biochemical analyses reveal Beclin 1 as a novel membrane binding protein. Cell research 22:473-489.
- Hughes, T., and T.E. Rusten. 2007. Origin and evolution of self-consumption: autophagy. Advances in experimental medicine and biology 607:111-118.
- Ingrao, D., S. Majdoul, A.K. Seye, A. Galy, and D. Fenard. 2014. Concurrent measures of fusion and transduction efficiency of primary CD34+ cells with human immunodeficiency virus 1-based lentiviral vectors reveal different effects of transduction enhancers. Human gene therapy methods 25:48-56.
- Innes, C.L., P.B. Smith, R. Langenbach, K.R. Tindall, and L.R. Boone. 1990. Cationic liposomes (Lipofectin) mediate retroviral infection in the absence of specific receptors. J. Virol. 64:957-961.
- Itakura, E., C. Kishi, K. Inoue, and N. Mizushima. 2008. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. Molecular biology of the cell 19:5360-5372.
- Itakura, E., and N. Mizushima. 2009. Atg14 and UVRAG: mutually exclusive subunits of mammalian Beclin 1-PI3K complexes. Autophagy 5:534-536.
- Ito, M., H. Hiramatsu, K. Kobayashi, K. Suzue, M. Kawahata, K. Hioki, Y. Ueyama, Y. Koyanagi, K. Sugamura, K. Tsuji, T. Heike, and T. Nakahata. 2002. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. Blood 100:3175-3182.
- Itoh, T., N. Fujita, E. Kanno, A. Yamamoto, T. Yoshimori, and M. Fukuda. 2008. Golgiresident small GTPase Rab33B interacts with Atg16L and modulates autophagosome formation. Molecular biology of the cell 19:2916-2925.
- Iwakuma, T., Y. Cui, and L.J. Chang. 1999. Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modifications. Virology 261:120-132.
- Jackson, W.T., T.H. Giddings, Jr., M.P. Taylor, S. Mulinyawe, M. Rabinovitch, R.R. Kopito, and K. Kirkegaard. 2005. Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. PLoS biology 3:e156.
- Jern, P., and J.M. Coffin. 2008. Effects of retroviruses on host genome function. Annual review of genetics 42:709-732.

- Jordan, T.X., and G. Randall. 2012. Manipulation or capitulation: virus interactions with autophagy. Microbes and infection / Institut Pasteur 14:126-139.
- Jubeli, E., W.P. Goldring, and M.D. Pungente. 2016. Cationic Lipid-Based Nucleic Acid Vectors. Methods Mol Biol 1445:19-32.
- Kabeya, Y., N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. The EMBO journal 19:5720-5728.
- Kang, H.J., C.C. Bartholomae, A. Paruzynski, A. Arens, S. Kim, S.S. Yu, Y. Hong, C.W. Joo, N.K. Yoon, J.W. Rhim, J.G. Kim, C. Von Kalle, M. Schmidt, and H.S. Ahn. 2011. Retroviral gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease: results from phase I/II trial. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 19:2092-2101.
- Kang, Y., C.S. Stein, J.A. Heth, P.L. Sinn, A.K. Penisten, P.D. Staber, K.L. Ratliff, H. Shen, C.K. Barker, I. Martins, C.M. Sharkey, D.A. Sanders, P.B. McCray, Jr., and B.L. Davidson. 2002. In vivo gene transfer using a nonprimate lentiviral vector pseudotyped with Ross River Virus glycoproteins. Journal of virology 76:9378-9388.
- Kang, Y., L. Xie, D.T. Tran, C.S. Stein, M. Hickey, B.L. Davidson, and P.B. McCray, Jr. 2005. Persistent expression of factor VIII in vivo following nonprimate lentiviral gene transfer. Blood 106:1552-1558.
- Kataoka, S., J. Satoh, H. Fujiya, T. Toyota, R. Suzuki, K. Itoh, and K. Kumagai. 1983. Immunologic aspects of the nonobese diabetic (NOD) mouse. Abnormalities of cellular immunity. Diabetes 32:247-253.
- Kato, S., and K. Kobayashi. 2014. Improved transduction efficiency of a lentiviral vector for neuron-specific retrograde gene transfer by optimizing the junction of fusion envelope glycoprotein. Journal of neuroscience methods 227:151-158.
- Kaufmann, K.B., H. Buning, A. Galy, A. Schambach, and M. Grez. 2013. Gene therapy on the move. EMBO molecular medicine 5:1642-1661.
- Kichler, A., C. Leborgne, J. Marz, O. Danos, and B. Bechinger. 2003. Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100:1564-1568.
- Kichler, A., A.J. Mason, and B. Bechinger. 2006. Cationic amphipathic histidine-rich peptides for gene delivery. Biochimica et biophysica acta 1758:301-307.
- Kichler, A., J.C. Pages, C. Leborgne, S. Druillennec, C. Lenoir, D. Coulaud, E. Delain, E. Le Cam, B.P. Roques, and O. Danos. 2000. Efficient DNA transfection mediated by the C-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 viral protein R. Journal of virology 74:5424-5431.
- Kihara, A., Y. Kabeya, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori. 2001. Beclin-phosphatidylinositol 3kinase complex functions at the trans-Golgi network. EMBO reports 2:330-335.
- Kirkegaard, K., and W.T. Jackson. 2005. Topology of double-membraned vesicles and the opportunity for non-lytic release of cytoplasm. Autophagy 1:182-184.
- Kmiec, D., S.S. Iyer, C.M. Sturzel, D. Sauter, B.H. Hahn, and F. Kirchhoff. 2016. Vpu-Mediated Counteraction of Tetherin Is a Major Determinant of HIV-1 Interferon Resistance. mBio 7:
- Kobayashi, S., Y. Orba, H. Yamaguchi, K. Takahashi, M. Sasaki, R. Hasebe, T. Kimura, and H. Sawa. 2014. Autophagy inhibits viral genome replication and gene expression stages in West Nile virus infection. Virus research 191:83-91.
- Kobinger, G.P., M.P. Limberis, S. Somanathan, G. Schumer, P. Bell, and J.M. Wilson. 2007. Human immunodeficiency viral vector pseudotyped with the spike envelope of severe acute respiratory syndrome coronavirus transduces human airway epithelial cells and dendritic cells. Human gene therapy 18:413-422.

- Kondo, E., F. Mammano, E.A. Cohen, and H.G. Gottlinger. 1995. The p6gag domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles. J. Virol. 69:2759-2764.
- Kowolik, C.M., and J.K. Yee. 2002. Preferential transduction of human hepatocytes with lentiviral vectors pseudotyped by Sendai virus F protein. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 5:762-769.
- Kraft, C., A. Deplazes, M. Sohrmann, and M. Peter. 2008. Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. Nature cell biology 10:602-610.
- Kroemer, G., G. Marino, and B. Levine. 2010. Autophagy and the integrated stress response. Molecular cell 40:280-293.
- Ku, B., J.S. Woo, C. Liang, K.H. Lee, J.U. Jung, and B.H. Oh. 2008. An insight into the mechanistic role of Beclin 1 and its inhibition by prosurvival Bcl-2 family proteins. Autophagy 4:519-520.
- Kubo, Y., C. Tominaga, H. Yoshii, H. Kamiyama, C. Mitani, H. Amanuma, and N. Yamamoto. 2007. Characterization of R peptide of murine leukemia virus envelope glycoproteins in syncytium formation and entry. Archives of virology 152:2169-2182.
- Kutner, R.H., X.Y. Zhang, and J. Reiser. 2009. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. Nature protocols 4:495-505.
- Kyei, G.B., C. Dinkins, A.S. Davis, E. Roberts, S.B. Singh, C. Dong, L. Wu, E. Kominami, T. Ueno, A. Yamamoto, M. Federico, A. Panganiban, I. Vergne, and V. Deretic. 2009. Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. The Journal of cell biology 186:255-268.
- Langlet-Bertin, B., C. Leborgne, D. Scherman, B. Bechinger, A.J. Mason, and A. Kichler. 2010. Design and evaluation of histidine-rich amphipathic peptides for siRNA delivery. Pharm. Res. 27:1426-1436.
- Le Blanc, I., P.P. Luyet, V. Pons, C. Ferguson, N. Emans, A. Petiot, N. Mayran, N. Demaurex, J. Faure, R. Sadoul, R.G. Parton, and J. Gruenberg. 2005. Endosome-tocytosol transport of viral nucleocapsids. Nature cell biology 7:653-664.
- Le Rouzic, E., and S. Benichou. 2005. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. Retrovirology 2:11.
- Lee, G., C. Liang, G. Park, C. Jang, J.U. Jung, and J. Chung. 2011. UVRAG is required for organ rotation by regulating Notch endocytosis in Drosophila. Developmental biology 356:588-597.
- Lee, J.S., Q. Li, J.Y. Lee, S.H. Lee, J.H. Jeong, H.R. Lee, H. Chang, F.C. Zhou, S.J. Gao, C. Liang, and J.U. Jung. 2009. FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. Nature cell biology 11:1355-1362.
- Lee, R.C., L.P. River, F.S. Pan, L. Ji, and R.L. Wollmann. 1992. Surfactant-induced sealing of electropermeabilized skeletal muscle membranes in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89:4524-4528.
- Letchworth, G.J., L.L. Rodriguez, and J. Del cbarrera. 1999. Vesicular stomatitis. Vet J 157:239-260.
- Letko, M., T. Booiman, N. Kootstra, V. Simon, and M. Ooms. 2015. Identification of the HIV-1 Vif and Human APOBEC3G Protein Interface. Cell reports 13:1789-1799.
- Levine, B., and D.J. Klionsky. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. Developmental cell 6:463-477.
- Levine, B., and G. Kroemer. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. Cell 132:27-42.
- Levine, B., R. Liu, X. Dong, and Q. Zhong. 2015. Beclin orthologs: integrative hubs of cell signaling, membrane trafficking, and physiology. Trends in cell biology 25:533-544.
- Levine, B., N. Mizushima, and H.W. Virgin. 2011. Autophagy in immunity and inflammation. Nature 469:323-335.

- Li, W.W., J. Li, and J.K. Bao. 2012. Microautophagy: lesser-known self-eating. Cellular and molecular life sciences : CMLS 69:1125-1136.
- Liang, C., J.S. Lee, K.S. Inn, M.U. Gack, Q. Li, E.A. Roberts, I. Vergne, V. Deretic, P. Feng, C. Akazawa, and J.U. Jung. 2008. Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. Nature cell biology 10:776-787.
- Liang, M., K. Morizono, N. Pariente, M. Kamata, B. Lee, and I.S. Chen. 2009. Targeted transduction via CD4 by a lentiviral vector uses a clathrin-mediated entry pathway. J. Virol. 83:13026-13031.
- Liang, X.H., L.K. Kleeman, H.H. Jiang, G. Gordon, J.E. Goldman, G. Berry, B. Herman, and B. Levine. 1998. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. Journal of virology 72:8586-8596.
- Lilienbaum, A. 2013. Relationship between the proteasomal system and autophagy. International journal of biochemistry and molecular biology 4:1-26.
- Liu, B., C. Liu, X. Zhao, W. Shen, L. Qian, Y. Wei, and X. Kong. 2014. Establishment of a cell line with stable expression of mCherry-EGFP tandem fluorescent-tagged LC3B for studying the impact of HIV-1 infection on autophagic flux. Journal of virological methods 209:95-102.
- Liu, K., and M.J. Czaja. 2013. Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. Cell death and differentiation 20:3-11.
- Liu, Y., and B. Levine. 2015. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. Cell death and differentiation 22:367-376.
- Liu, Y., S. Shoji-Kawata, R.M. Sumpter, Jr., Y. Wei, V. Ginet, L. Zhang, B. Posner, K.A. Tran, D.R. Green, R.J. Xavier, S.Y. Shaw, P.G. Clarke, J. Puyal, and B. Levine. 2013. Autosis is a Na+,K+-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagyinducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110:20364-20371.
- Logan, A.C., D.L. Haas, T. Kafri, and D.B. Kohn. 2004. Integrated self-inactivating lentiviral vectors produce full-length genomic transcripts competent for encapsidation and integration. Journal of virology 78:8421-8436.
- Lu, H., Z. Li, Y. Xue, and Q. Zhou. 2013. Viral-host interactions that control HIV-1 transcriptional elongation. Chemical reviews 113:8567-8582.
- Lu, K., X. Heng, and M.F. Summers. 2011. Structural determinants and mechanism of HIV-1 genome packaging. Journal of molecular biology 410:609-633.
- Majdoul, S., and D. Fenard. 2015. Titre du brevet "Compositions and methods for improving viral vector efficiency".
- Malech, H.L. 1999. Progress in gene therapy for chronic granulomatous disease. The Journal of infectious diseases 179 Suppl 2:S318-325.
- Malech, H.L., P.B. Maples, N. Whiting-Theobald, G.F. Linton, S. Sekhsaria, S.J. Vowells, F. Li, J.A. Miller, E. DeCarlo, S.M. Holland, S.F. Leitman, C.S. Carter, R.E. Butz, E.J. Read, T.A. Fleisher, R.D. Schneiderman, D.E. Van Epps, S.K. Spratt, C.A. Maack, J.A. Rokovich, L.K. Cohen, and J.I. Gallin. 1997. Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94:12133-12138.
- Malik, P. 2016. Gene Therapy for Hemoglobinopathies: Tremendous Successes and Remaining Caveats. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 24:668-670.
- Malim, M.H., and M. Emerman. 2008. HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. Cell host & microbe 3:388-398.
- Manches, O., D. Frleta, and N. Bhardwaj. 2014. Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection. Trends in immunology 35:114-122.

- Manel, N., F.J. Kim, S. Kinet, N. Taylor, M. Sitbon, and J.L. Battini. 2003. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. Cell 115:449-459.
- Manjithaya, R., T.Y. Nazarko, J.C. Farre, and S. Subramani. 2010. Molecular mechanism and physiological role of pexophagy. FEBS letters 584:1367-1373.
- Mansky, L.M., S. Preveral, L. Selig, R. Benarous, and S. Benichou. 2000. The interaction of vpr with uracil DNA glycosylase modulates the human immunodeficiency virus type 1 In vivo mutation rate. Journal of virology 74:7039-7047.
- Marangoni, F., M. Bosticardo, S. Charrier, E. Draghici, M. Locci, S. Scaramuzza, C. Panaroni, M. Ponzoni, F. Sanvito, C. Doglioni, M. Liabeuf, B. Gjata, M. Montus, K. Siminovitch, A. Aiuti, L. Naldini, L. Dupre, M.G. Roncarolo, A. Galy, and A. Villa. 2009. Evidence for long-term efficacy and safety of gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome in preclinical models. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 17:1073-1082.
- Mason, A.J., C. Gasnier, A. Kichler, G. Prevost, D. Aunis, M.H. Metz-Boutigue, and B. Bechinger. 2006a. Enhanced membrane disruption and antibiotic action against pathogenic bacteria by designed histidine-rich peptides at acidic pH. Antimicrobial agents and chemotherapy 50:3305-3311.
- Mason, A.J., A. Martinez, C. Glaubitz, O. Danos, A. Kichler, and B. Bechinger. 2006b. The antibiotic and DNA-transfecting peptide LAH4 selectively associates with, and disorders, anionic lipids in mixed membranes. FASEB J. 20:320-322.
- Matrai, J., M.K. Chuah, and T. VandenDriessche. 2010. Recent advances in lentiviral vector development and applications. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 18:477-490.
- Matsunaga, K., E. Morita, T. Saitoh, S. Akira, N.T. Ktistakis, T. Izumi, T. Noda, and T. Yoshimori. 2010. Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. The Journal of cell biology 190:511-521.
- McCune, J.M., R. Namikawa, H. Kaneshima, L.D. Shultz, M. Lieberman, and I.L. Weissman. 1988. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. Science 241:1632-1639.
- Meier, C., T. Weil, F. Kirchhoff, and J. Munch. 2014. Peptide nanofibrils as enhancers of retroviral gene transfer. Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology 6:438-451.
- Meijer, A.J., and P. Codogno. 2009. Autophagy: regulation and role in disease. Critical reviews in clinical laboratory sciences 46:210-240.
- Merten, O.W., S. Charrier, N. Laroudie, S. Fauchille, C. Dugue, C. Jenny, M. Audit, M.A. Zanta-Boussif, H. Chautard, M. Radrizzani, G. Vallanti, L. Naldini, P. Noguiez-Hellin, and A. Galy. 2011. Large-scale manufacture and characterization of a lentiviral vector produced for clinical ex vivo gene therapy application. Human gene therapy 22:343-356.
- Merten, O.W., M. Hebben, and C. Bovolenta. 2016. Production of lentiviral vectors. Molecular therapy. Methods & clinical development 3:16017.
- Meyerrose, T.E., P. Herrbrich, D.A. Hess, and J.A. Nolta. 2003. Immune-deficient mouse models for analysis of human stem cells. BioTechniques 35:1262-1272.
- Mishra, A., G.H. Lai, N.W. Schmidt, V.Z. Sun, A.R. Rodriguez, R. Tong, L. Tang, J. Cheng, T.J. Deming, D.T. Kamei, and G.C. Wong. 2011. Translocation of HIV TAT peptide and analogues induced by multiplexed membrane and cytoskeletal interactions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108:16883-16888.
- Miyoshi, H., U. Blomer, M. Takahashi, F.H. Gage, and I.M. Verma. 1998. Development of a self-inactivating lentivirus vector. Journal of virology 72:8150-8157.

- Mizushima, N., T. Yoshimori, and Y. Ohsumi. 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. Annual review of cell and developmental biology 27:107-132.
- Modlich, U., S. Navarro, D. Zychlinski, T. Maetzig, S. Knoess, M.H. Brugman, A. Schambach, S. Charrier, A. Galy, A.J. Thrasher, J. Bueren, and C. Baum. 2009. Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 17:1919-1928.
- Moir, S., and A.S. Fauci. 2014. B-cell exhaustion in HIV infection: the role of immune activation. Current opinion in HIV and AIDS 9:472-477.
- Montini, E., D. Cesana, M. Schmidt, F. Sanvito, C.C. Bartholomae, M. Ranzani, F. Benedicenti, L.S. Sergi, A. Ambrosi, M. Ponzoni, C. Doglioni, C. Di Serio, C. von Kalle, and L. Naldini. 2009. The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. The Journal of clinical investigation 119:964-975.
- Morris, D.H., C.K. Yip, Y. Shi, B.T. Chait, and Q.J. Wang. 2015. Beclin 1-Vps34 Complex Architecture: Understanding the Nuts and Bolts of Therapeutic Targets. Frontiers in biology 10:398-426.
- Mortensen, M., E.J. Soilleux, G. Djordjevic, R. Tripp, M. Lutteropp, E. Sadighi-Akha, A.J. Stranks, J. Glanville, S. Knight, S.E. Jacobsen, K.R. Kranc, and A.K. Simon. 2011. The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. The Journal of experimental medicine 208:455-467.
- Munch, J., E. Rucker, L. Standker, K. Adermann, C. Goffinet, M. Schindler, S. Wildum, R. Chinnadurai, D. Rajan, A. Specht, G. Gimenez-Gallego, P.C. Sanchez, D.M. Fowler, A. Koulov, J.W. Kelly, W. Mothes, J.C. Grivel, L. Margolis, O.T. Keppler, W.G. Forssmann, and F. Kirchhoff. 2007. Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. Cell 131:1059-1071.
- Naldini, L., U. Blomer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F.H. Gage, I.M. Verma, and D. Trono. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science 272:263-267.
- Nayerossadat, N., T. Maedeh, and P.A. Ali. 2012. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. Advanced biomedical research 1:27.
- Niidome, T., K. Takaji, M. Urakawa, N. Ohmori, A. Wada, T. Hirayama, and H. Aoyagi. 1999. Chain length of cationic alpha-helical peptide sufficient for gene delivery into cells. Bioconjugate chemistry 10:773-780.
- Notta, F., S. Doulatov, E. Laurenti, A. Poeppl, I. Jurisica, and J.E. Dick. 2011. Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. Science 333:218-221.
- Oberstein, A., P.D. Jeffrey, and Y. Shi. 2007. Crystal structure of the Bcl-XL-Beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein. The Journal of biological chemistry 282:13123-13132.
- Ohsumi, Y., and N. Mizushima. 2004. Two ubiquitin-like conjugation systems essential for autophagy. Seminars in cell & developmental biology 15:231-236.
- Orvedahl, A., S. MacPherson, R. Sumpter, Jr., Z. Talloczy, Z. Zou, and B. Levine. 2010. Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. Cell host & microbe 7:115-127.
- Ott, M.G., M. Schmidt, K. Schwarzwaelder, S. Stein, U. Siler, U. Koehl, H. Glimm, K. Kuhlcke, A. Schilz, H. Kunkel, S. Naundorf, A. Brinkmann, A. Deichmann, M. Fischer, C. Ball, I. Pilz, C. Dunbar, Y. Du, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, U. Luthi, M. Hassan, A.J. Thrasher, D. Hoelzer, C. von Kalle, R. Seger, and M. Grez. 2006. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by

insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. Nature medicine 12:401-409.

- Palomares, K., F. Vigant, B. Van Handel, O. Pernet, K. Chikere, P. Hong, S.P. Sherman, M. Patterson, D.S. An, W.E. Lowry, H.K. Mikkola, K. Morizono, A.D. Pyle, and B. Lee. 2013. Nipah virus envelope-pseudotyped lentiviruses efficiently target ephrinB2-positive stem cell populations in vitro and bypass the liver sink when administered in vivo. Journal of virology 87:2094-2108.
- Pattingre, S., L. Espert, M. Biard-Piechaczyk, and P. Codogno. 2008. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. Biochimie 90:313-323.
- Payen, E., and P. Leboulch. 2012. Advances in stem cell transplantation and gene therapy in the beta-hemoglobinopathies. Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program 2012:276-283.
- Pear, W.S., G.P. Nolan, M.L. Scott, and D. Baltimore. 1993. Production of high-titer helperfree retroviruses by transient transfection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90:8392-8396.
- Pereira, C., E. Clarke, and J. Damen. 2007. Hematopoietic colony-forming cell assays. Methods Mol Biol 407:177-208.
- Pham, P.L., A. Kamen, and Y. Durocher. 2006. Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein. Molecular biotechnology 34:225-237.
- Philpott, S.M. 2003. HIV-1 coreceptor usage, transmission, and disease progression. Current HIV research 1:217-227.
- Picard, C., W. Al-Herz, A. Bousfiha, J.L. Casanova, T. Chatila, M.E. Conley, C. Cunningham-Rundles, A. Etzioni, S.M. Holland, C. Klein, S. Nonoyama, H.D. Ochs, E. Oksenhendler, J.M. Puck, K.E. Sullivan, M.L. Tang, J.L. Franco, and H.B. Gaspar. 2015. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. Journal of clinical immunology 35:696-726.
- Pirooz, S.D., S. He, T. Zhang, X. Zhang, Z. Zhao, S. Oh, D. O'Connell, P. Khalilzadeh, S. Amini-Bavil-Olyaee, M. Farzan, and C. Liang. 2014. UVRAG is required for virus entry through combinatorial interaction with the class C-Vps complex and SNAREs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111:2716-2721.
- Planelles, V., and S. Benichou. 2009. Vpr and its interactions with cellular proteins. Current topics in microbiology and immunology 339:177-200.
- Pollard, V.W., and M.H. Malim. 1998. The HIV-1 Rev protein. Annual review of microbiology 52:491-532.
- Pollok, K.E., and D.A. Williams. 1999. Facilitation of retrovirus-mediated gene transfer into hematopoietic stem and progenitor cells and peripheral blood T-lymphocytes utilizing recombinant fibronectin fragments. Current opinion in molecular therapeutics 1:595-604.
- Poluri, A., R. Ainsworth, S.C. Weaver, and R.E. Sutton. 2008. Functional pseudotyping of human immunodeficiency virus type 1 vectors by Western equine encephalitis virus envelope glycoprotein. Journal of virology 82:12580-12584.
- Porter, C.D., K.V. Lukacs, G. Box, Y. Takeuchi, and M.K. Collins. 1998. Cationic liposomes enhance the rate of transduction by a recombinant retroviral vector in vitro and in vivo. Journal of virology 72:4832-4840.
- Pouzolles, M., L. Oburoglu, N. Taylor, and V.S. Zimmermann. 2016. Hematopoietic stem cell lineage specification. Current opinion in hematology
- Prochazka, M., H.R. Gaskins, L.D. Shultz, and E.H. Leiter. 1992. The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89:3290-3294.

- Ramamoorth, M., and A. Narvekar. 2015. Non viral vectors in gene therapy- an overview. Journal of clinical and diagnostic research : JCDR 9:GE01-06.
- Randow, F., and C. Munz. 2012. Autophagy in the regulation of pathogen replication and adaptive immunity. Trends in immunology 33:475-487.
- Ravikumar, B., K. Moreau, L. Jahreiss, C. Puri, and D.C. Rubinsztein. 2010. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. Nature cell biology 12:747-757.
- J.M. Coffin, Hughes, S.H., Varmus, H.E 1997. Retroviruses.Cold Spring Harbor (NY)
- Rittner, K., A. Benavente, A. Bompard-Sorlet, F. Heitz, G. Divita, R. Brasseur, and E. Jacobs. 2002. New basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 5:104-114.
- Roan, N.R., J.A. Muller, H. Liu, S. Chu, F. Arnold, C.M. Sturzel, P. Walther, M. Dong, H.E. Witkowska, F. Kirchhoff, J. Munch, and W.C. Greene. 2011. Peptides released by physiological cleavage of semen coagulum proteins form amyloids that enhance HIV infection. Cell host & microbe 10:541-550.
- Roan, N.R., J. Munch, N. Arhel, W. Mothes, J. Neidleman, A. Kobayashi, K. Smith-McCune, F. Kirchhoff, and W.C. Greene. 2009. The cationic properties of SEVI underlie its ability to enhance human immunodeficiency virus infection. Journal of virology 83:73-80.
- Roan, N.R., S. Sowinski, J. Munch, F. Kirchhoff, and W.C. Greene. 2010. Aminoquinoline surfen inhibits the action of SEVI (semen-derived enhancer of viral infection). The Journal of biological chemistry 285:1861-1869.
- Roemer, K., and T. Friedmann. 1992. Concepts and strategies for human gene therapy. European journal of biochemistry / FEBS 208:211-225.
- Rogers, S., and P. Pfuderer. 1968. Use of viruses as carriers of added genetic information. Nature 219:749-751.
- Roos, D. 1994. The genetic basis of chronic granulomatous disease. Immunological reviews 138:121-157.
- Rubinsztein, D.C., P. Codogno, and B. Levine. 2012. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. Nature reviews. Drug discovery 11:709-730.
- Russell, R.C., Y. Tian, H. Yuan, H.W. Park, Y.Y. Chang, J. Kim, H. Kim, T.P. Neufeld, A. Dillin, and K.L. Guan. 2013. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. Nature cell biology 15:741-750.
- Sagnier, S., C.F. Daussy, S. Borel, V. Robert-Hebmann, M. Faure, F.P. Blanchet, B. Beaumelle, M. Biard-Piechaczyk, and L. Espert. 2015. Autophagy restricts HIV-1 infection by selectively degrading Tat in CD4+ T lymphocytes. Journal of virology 89:615-625.
- Sakuma, T., M.A. Barry, and Y. Ikeda. 2012. Lentiviral vectors: basic to translational. The Biochemical journal 443:603-618.
- Salvador, B., Y. Zhou, A. Michault, M.O. Muench, and G. Simmons. 2009. Characterization of Chikungunya pseudotyped viruses: Identification of refractory cell lines and demonstration of cellular tropism differences mediated by mutations in E1 glycoprotein. Virology 393:33-41.
- Sandrin, V., B. Boson, P. Salmon, W. Gay, D. Negre, R. Le Grand, D. Trono, and F.L. Cosset. 2002. Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. Blood 100:823-832.

- Sanjuan, M.A., C.P. Dillon, S.W. Tait, S. Moshiach, F. Dorsey, S. Connell, M. Komatsu, K. Tanaka, J.L. Cleveland, S. Withoff, and D.R. Green. 2007. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. Nature 450:1253-1257.
- Sarma, N.J., A. Takeda, and N.R. Yaseen. 2010. Colony forming cell (CFC) assay for human hematopoietic cells. Journal of visualized experiments : JoVE
- Schambach, A., D. Zychlinski, B. Ehrnstroem, and C. Baum. 2013. Biosafety features of lentiviral vectors. Human gene therapy 24:132-142.
- Scott, C.T., and L. DeFrancesco. 2016. Gene therapy's out-of-body experience. Nature biotechnology 34:600-607.
- Segall, H.I., E. Yoo, and R.E. Sutton. 2003. Characterization and detection of artificial replication-competent lentivirus of altered host range. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 8:118-129.
- Sheehy, A.M., N.C. Gaddis, and M.H. Malim. 2003. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. Nature medicine 9:1404-1407.
- Shi, J., and H. Luo. 2012. Interplay between the cellular autophagy machinery and positivestranded RNA viruses. Acta biochimica et biophysica Sinica 44:375-384.
- Shoji-Kawata, S., R. Sumpter, M. Leveno, G.R. Campbell, Z. Zou, L. Kinch, A.D. Wilkins, Q. Sun, K. Pallauf, D. MacDuff, C. Huerta, H.W. Virgin, J.B. Helms, R. Eerland, S.A. Tooze, R. Xavier, D.J. Lenschow, A. Yamamoto, D. King, O. Lichtarge, N.V. Grishin, S.A. Spector, D.V. Kaloyanova, and B. Levine. 2013. Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. Nature 494:201-206.
- Shultz, L.D., P.A. Schweitzer, S.W. Christianson, B. Gott, I.B. Schweitzer, B. Tennent, S. McKenna, L. Mobraaten, T.V. Rajan, D.L. Greiner, and et al. 1995. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. J Immunol 154:180-191.
- Silvertown, J.D., J.S. Walia, A.J. Summerlee, and J.A. Medin. 2006. Functional expression of mouse relaxin and mouse relaxin-3 in the lung from an Ebola virus glycoprotein-pseudotyped lentivirus via tracheal delivery. Endocrinology 147:3797-3808.
- Skripkin, E., J.C. Paillart, R. Marquet, B. Ehresmann, and C. Ehresmann. 1994. Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91:4945-4949.
- Smith, J.D., and E. de Harven. 1978. Herpes simplex virus and human cytomegalovirus replication in WI-38 cells. III. Cytochemical localization of lysosomal enzymes in infected cells. Journal of virology 26:102-109.
- Srour, E.F., E.D. Zanjani, J.E. Brandt, T. Leemhuis, R.A. Briddell, N.A. Heerema, and R. Hoffman. 1992. Sustained human hematopoiesis in sheep transplanted in utero during early gestation with fractionated adult human bone marrow cells. Blood 79:1404-1412.
- Stein, C.S., I. Martins, and B.L. Davidson. 2005. The lymphocytic choriomeningitis virus envelope glycoprotein targets lentiviral gene transfer vector to neural progenitors in the murine brain. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 11:382-389.
- Strebel, K. 2014. HIV-1 Vpu an ion channel in search of a job. Biochimica et biophysica acta 1838:1074-1081.
- Sun, X., and N. Zhang. 2010. Cationic polymer optimization for efficient gene delivery. Mini reviews in medicinal chemistry 10:108-125.
- Svicher, V., F. Ceccherini-Silberstein, A. Antinori, S. Aquaro, and C.F. Perno. 2014. Understanding HIV compartments and reservoirs. Current HIV/AIDS reports 11:186-194.

- Takahashi, Y., D. Coppola, N. Matsushita, H.D. Cualing, M. Sun, Y. Sato, C. Liang, J.U. Jung, J.Q. Cheng, J.J. Mule, W.J. Pledger, and H.G. Wang. 2007. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. Nature cell biology 9:1142-1151.
- Talloczy, Z., H.W.t. Virgin, and B. Levine. 2006. PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1. Autophagy 2:24-29.
- Tang, S.W., A. Ducroux, K.T. Jeang, and C. Neuveut. 2012. Impact of cellular autophagy on viruses: Insights from hepatitis B virus and human retroviruses. Journal of biomedical science 19:92.
- Tanida, I. 2011. Autophagy basics. Microbiology and immunology 55:1-11.
- Taylor, M.P., and K. Kirkegaard. 2007. Modification of cellular autophagy protein LC3 by poliovirus. Journal of virology 81:12543-12553.
- Thomas, E.D., H.L. Lochte, Jr., W.C. Lu, and J.W. Ferrebee. 1957. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. The New England journal of medicine 257:491-496.
- Thrasher, A.J., and S.O. Burns. 2010. WASP: a key immunological multitasker. Nature reviews. Immunology 10:182-192.
- Touzot, F., S. Hacein-Bey-Abina, A. Fischer, and M. Cavazzana. 2014. Gene therapy for inherited immunodeficiency. Expert opinion on biological therapy 14:789-798.
- Toyoshima, K., and P.K. Vogt. 1969. Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions. Virology 38:414-426.
- Tsukada, M., and Y. Ohsumi. 1993. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of Saccharomyces cerevisiae. FEBS letters 333:169-174.
- Usami, Y., Y. Wu, and H.G. Gottlinger. 2015. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. Nature 526:218-223.
- Vogt, T.C., and B. Bechinger. 1999. The interactions of histidine-containing amphipathic helical peptide antibiotics with lipid bilayers. The effects of charges and pH. The Journal of biological chemistry 274:29115-29121.
- Wang, C.W., and D.J. Klionsky. 2003. The molecular mechanism of autophagy. Mol Med 9:65-76.
- Wang, W., E.N. Butler, V. Veguilla, R. Vassell, J.T. Thomas, M. Moos, Jr., Z. Ye, K. Hancock, and C.D. Weiss. 2008. Establishment of retroviral pseudotypes with influenza hemagglutinins from H1, H3, and H5 subtypes for sensitive and specific detection of neutralizing antibodies. Journal of virological methods 153:111-119.
- Warr, M.R., M. Binnewies, J. Flach, D. Reynaud, T. Garg, R. Malhotra, J. Debnath, and E. Passegue. 2013. FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells. Nature 494:323-327.
- Watts, J.M., K.K. Dang, R.J. Gorelick, C.W. Leonard, J.W. Bess, Jr., R. Swanstrom, C.L. Burch, and K.M. Weeks. 2009. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. Nature 460:711-716.
- Wileman, T. 2013. Autophagy as a defence against intracellular pathogens. Essays in biochemistry 55:153-163.
- Wirawan, E., S. Lippens, T. Vanden Berghe, A. Romagnoli, G.M. Fimia, M. Piacentini, and P. Vandenabeele. 2012. Beclin1: a role in membrane dynamics and beyond. Autophagy 8:6-17.
- Wirth, T., N. Parker, and S. Yla-Herttuala. 2013. History of gene therapy. Gene 525:162-169.
- Witting, S.R., P. Vallanda, and A.L. Gamble. 2013. Characterization of a third generation lentiviral vector pseudotyped with Nipah virus envelope proteins for endothelial cell transduction. Gene therapy 20:997-1005.
- Wong, L.F., L. Goodhead, C. Prat, K.A. Mitrophanous, S.M. Kingsman, and N.D. Mazarakis. 2006. Lentivirus-mediated gene transfer to the central nervous system: therapeutic and research applications. Human gene therapy 17:1-9.

- Wu, X., Y. Li, B. Crise, and S.M. Burgess. 2003. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. Science 300:1749-1751.
- Wurm, M., A. Schambach, D. Lindemann, H. Hanenberg, L. Standker, W.G. Forssmann, R. Blasczyk, and P.A. Horn. 2010. The influence of semen-derived enhancer of virus infection on the efficiency of retroviral gene transfer. The journal of gene medicine 12:137-146.
- Wyman, T.B., F. Nicol, O. Zelphati, P.V. Scaria, C. Plank, and F.C. Szoka, Jr. 1997. Design, synthesis, and characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes bilayers. Biochemistry 36:3008-3017.
- Xie, Y., T. Yin, W. Wiegraebe, X.C. He, D. Miller, D. Stark, K. Perko, R. Alexander, J. Schwartz, J.C. Grindley, J. Park, J.S. Haug, J.P. Wunderlich, H. Li, S. Zhang, T. Johnson, R.A. Feldman, and L. Li. 2009. Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. Nature 457:97-101.
- Yee, J.K., T. Friedmann, and J.C. Burns. 1994. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. Methods in cell biology 43 Pt A:99-112.
- Yoder, M.C., and D.A. Williams. 1995. Matrix molecule interactions with hematopoietic stem cells. Experimental hematology 23:961-967.
- Yolamanova, M., C. Meier, A.K. Shaytan, V. Vas, C.W. Bertoncini, F. Arnold, O. Zirafi, S.M. Usmani, J.A. Muller, D. Sauter, C. Goffinet, D. Palesch, P. Walther, N.R. Roan, H. Geiger, O. Lunov, T. Simmet, J. Bohne, H. Schrezenmeier, K. Schwarz, L. Standker, W.G. Forssmann, X. Salvatella, P.G. Khalatur, A.R. Khokhlov, T.P. Knowles, T. Weil, F. Kirchhoff, and J. Munch. 2013. Peptide nanofibrils boost retroviral gene transfer and provide a rapid means for concentrating viruses. Nature nanotechnology 8:130-136.
- Yordy, B., and A. Iwasaki. 2011. Autophagy in the control and pathogenesis of viral infection. Current opinion in virology 1:196-203.
- Yorimitsu, T., and D.J. Klionsky. 2005. Autophagy: molecular machinery for self-eating. Cell death and differentiation 12 Suppl 2:1542-1552.
- Yue, Z., S. Jin, C. Yang, A.J. Levine, and N. Heintz. 2003. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100:15077-15082.
- Zabner, J., A.J. Fasbender, T. Moninger, K.A. Poellinger, and M.J. Welsh. 1995. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. The Journal of biological chemistry 270:18997-19007.
- Zanjani, E.D., G. Almeida-Porada, and A.W. Flake. 1996. The human/sheep xenograft model: a large animal model of human hematopoiesis. International journal of hematology 63:179-192.
- Zennou, V., C. Petit, D. Guetard, U. Nerhbass, L. Montagnier, and P. Charneau. 2000. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. Cell 101:173-185.
- Zhang, C., B. Hu, L. Xiao, Y. Liu, and P. Wang. 2014a. Pseudotyping lentiviral vectors with lymphocytic choriomeningitis virus glycoproteins for transduction of dendritic cells and in vivo immunization. Human gene therapy methods 25:328-338.
- Zhang, L., C. Jiang, H. Zhang, X. Gong, L. Yang, L. Miao, Y. Shi, Y. Zhang, W. Kong, C. Zhang, and Y. Shan. 2014b. A novel modified peptide derived from membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 envelope significantly enhances retrovirus infection. Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society 20:46-54.
- Zhang, X.Y., V.F. La Russa, and J. Reiser. 2004. Transduction of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by using lentivirus vectors pseudotyped with modified RD114 envelope glycoproteins. Journal of virology 78:1219-1229.

- Zhou, D., and S.A. Spector. 2008. Human immunodeficiency virus type-1 infection inhibits autophagy. AIDS 22:695-699.
- Zufferey, R., J.E. Donello, D. Trono, and T.J. Hope. 1999. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. Journal of virology 73:2886-2892.
- Zufferey, R., T. Dull, R.J. Mandel, A. Bukovsky, D. Quiroz, L. Naldini, and D. Trono. 1998. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. Journal of virology 72:9873-9880.

Title: Study and development of new culture additives capable to promote the entry of lentiviral vectors for gene therapy on target cells

Keywords: Lentiviral Vector, Hematopoietic Stem Cells, Gene Therapy, Culture Additives, Post-entry Mechanism.

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-derived Lentiviral vectors (LVs) are used for various gene transfer applications, notably hematopoietic gene therapy. Culture additives are necessary to promote an efficient entry of LVs into hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs). This work highlights two culture additives: Vectofusin-1 and Tat-Beclin1. First, we studied the structurefunction of the new family of culture additives derived from LAH4: Vectofusins. We designed Vectofusin-1 isomers and showed that Vectofusin-1 remains the lead peptide for HSPCs transduction enhancement with LVs pseudotyped with VSV-G and GALVTR envelope glycoproteins. By comparing the efficiency of numerous Vectofusin-1 mutants, it appeared the importance of (i) lysine residues on the N-terminal extremity of Vectofusin-1, (ii) a hydrophilic angle of 140° formed by histidine residues in the Schiffer-Edmundson helical wheel representation, and (iii) hydrophobic residues consisting of leucine are all essential and help to define a minimal active sequence leading to an optimal activity of the Vectofusin-1 peptide. This work also allowed the discovery of a new culture additive called Tat-Beclin1, previously described as an autophagy-inducer peptide and a powerful viral replication inhibitor, especially on HIV-1. In this study, we showed that the use of low doses of Tat-Beclin1 peptide strongly promotes the transduction of cell lines or HSPCs with LVs pseudotyped with various envelope glycoproteins. The use of low doses of Tat-Beclin1 peptide is compatible with a gene therapy application since these experiments showed no cytotoxic effect either ex vivo or in vivo using a humanized mice model of HSPCs engraftment. The Tat-Beclin1 peptide is acting on the viral entry, specifically on the adhesion and fusion steps, but without inducing any aggregation of the viral particles. Studies of the autophagic flux showed that Tat-Beclin1 is not inducing this pathway at the low doses tested. Therefore, Tat-Beclin1 is acting on LVs through signaling pathways that are still to be defined. In conclusion, Tat-Beclin1 and Vectofusin-1 peptides are performant and safe transduction enhancers for retrovirus-based vectors dedicated to gene therapy.



Titre : Etude et développement de nouveaux additifs peptidiques capables de promouvoir l'entrée des vecteurs lentiviraux de thérapie génique dans les cellules cibles

Mots clés : Vecteur Lentiviral, Cellule Souche Hématopoïétique, Thérapie Génique, Additifs de Culture, Autophagie.

Les vecteurs lentiviraux (LVs) dérivés du virus de l'immunodéficience humaine de type I (VIH-1) sont des outils efficaces de transfert de gène, largement utilisés en thérapie génique, en particulier pour la transduction ex vivo de cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (CSPHs). Cette thèse porte sur la caractérisation de deux nouveaux additifs de culture permettant de promouvoir l'entrée des LVs dans les cellules cibles : Vectofusin-1 et Tat-Beclin1. Dans un premier temps, mon travail a consisté à caractériser la structure-fonction de la nouvelle famille de Vectofusins, dérivés du peptide LAH4. Dans cette étude, Nous avons comparé l'efficacité de transduction des CSPHs en présence de différents mutants peptidiques de la Vectofusin-1. Nous avons montré que la Vectofusin-1 est le peptide le plus performant parmi tous les isomères de Vectofusin pour la transduction des CSPHs avec les pseudotypes VSV-G-LV et GALVTR-LV. Nos résultats montrent l'importance de (i) l'angle polaire à 140° formé par les résidus histidine dans la représentation de Schiffer-Edmundson, (ii) la présence de résidus lysine à l'extrémité N-terminale, et (iii) l'utilisation de leucines comme résidus hydrophobes. Ces paramètres cruciaux pour la fonction biologique des peptides de la famille Vectofusin nous permettent de mieux comprendre leur mécanisme d'action. Cette thèse porte également sur l'étude du nouvel additif de culture Tat-Beclin1, décrit dans la littérature comme étant un inducteur d'autophagie et un inhibiteur puissant de la réplication virale, en particulier du VIH-1. De façon surprenante, nous avons observé que l'utilisation de faibles doses de Tat-Beclin1 augmente fortement les niveaux de transduction de lignées cellulaires et de CSPHs en présence de divers pseudotypes LVs. Au sein de cette étude nous avons montré que ce peptide Tat-Beclin1 est compatible avec une application en thérapie génique grâce à l'absence de cytotoxicité que ce soit ex vivo ou in vivo lors de l'utilisation de modèle murin humanisé NSG pour la greffe de CSPHs. Le peptide Tat-Beclin1 agit au niveau de l'étape d'entrée, en potentialisant l'adhésion et la fusion virale, sans induire l'agrégation des particules virales. Des études du flux autophagique montrent que Tat-Beclin1 n'induit pas d'autophagie aux faibles doses utilisées. Ceci suggère que ce nouvel additif de culture agit à travers des voies moléculaires encore inconnues impliquant probablement des voies de signalisation intracellulaire indépendantes de l'autophagie. En conclusion, ce travail de thèse permet de décrire Tat-Beclin1 et Vectofusin-1 comme des nouveaux additifs de culture performants pour promouvoir la transduction de cellules cibles avec des LVs de thérapie génique.