UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE

Ecole Doctorale n°423 Des Génomes Aux Organismes

Laboratoire d'Immunologie Moléculaire et Biothérapies Innovantes- INSERM UMR_S951

THESE

présentée en vue de l'obtention du diplôme :

DOCTORAT BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

par

INGRAO Dina

ETUDE DE L'ETAPE D'ENTREE DES VECTEURS LENTIVIRAUX DERIVES DU VIH-1 DANS LES CELLULES HEMATOPOÏETIQUES HUMAINES

Soutenue le 29 novembre 2013 à 14h devant le jury composé de

Pr. Bernard MIGNOTTE	**Président**
Dr. Els VERHOEYEN	**Rapporteur**
Dr. Alain DOGLIO	**Rapporteur**
Dr. Mathilde GIRARD	**Examinateur**
Dr. Otto MERTEN	**Examinateur**
Dr. David FENARD	**Directeur de Thèse**

A ma famille,

Je remercie tous les membres du jury pour le temps qu'ils ont consacré à ce travail. Je remercie le professeur **Bernard MIGNOTTE** d'avoir accepté et de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Je remercie le Docteur **Els VERHOEYEN** et le Docteur **Alain DOGLIO** pour avoir accepté et pris le temps d'évaluer ce manuscrit, et de me faire part de leurs commentaires. Je remercie également le Docteur **Mathilde GIRARD** et le professeur **Otto MERTEN** d'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/U951 à Généthon et pour avoir fait tout son possible pour répondre à mon souhait de devenir doctorante dans son unité. Je la remercie également pour ses bons conseils et ses suggestions sur mes travaux de thèse. Anne, j'ai particulièrement apprécié ton enthousiasme dans nos projets de recherche et ton encouragement pour la participation des thésards lors des congrès internationaux. Je te remercie aussi spécialement pour toutes tes petites attentions au retour de congrès, pour Noël ou juste pour faire plaisir aux membres de ton équipe.

Je remercie le Professeur **Javier PEREA** pour m'avoir si bien préparée et entrainée pour le concours de l'école Doctorale des Génomes aux organismes et cela en un temps très bref. Cette bonne préparation et tous tes précieux conseils m'ont permis de me positionner à la première place du classement. J'ai ainsi commencé ma thèse avec comme projet de thèse l'utilisation d'un INTRON de groupe II comme vecteur de thérapie génique pour une intégration ciblée.

Je remercie très chaleureusement le Docteur **Nathalie HOLIC** pour son rôle de co-encadrante pendant ma première année de thèse et pour son accompagnement dans mes premiers pas de monitrice à l'université d'Evry.

Je remercie tout particulièrement le Docteur **David FENARD** pour m'avoir accordé sa confiance et pour avoir donné un second départ à ma thèse dans son groupe rHIV général. David, je te remercie pour ta grande disponibilité, ta bienveillance, ta gentillesse, ton soutien et pour m'avoir fait partager ton savoir et ton expérience. Ce fut un véritable plaisir de travailler ensemble et d'échanger nos idées autour de nos travaux de recherche. Je te remercie spécialement pour avoir mis en valeur mes résultats dans nos deux publications ensemble. Un grand merci également pour ton accompagnement dans l'écriture de mon manuscrit de thèse et pour la préparation de la soutenance orale.

Un énorme merci tout spécialement pour l'équipe IMBI anciennement ITG lors de mes débuts en tant que stagiaire de M1. Vous m'avez tout de suite adoptée et votre sympathie naturelle m'ont permis de me sentir bien parmi vous.

Un énorme merci au Docteur **Laurence JEANSON-LEH**, ma maître de stage extraordinaire. **Laurence**, je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu m'as fait partager tant professionnellement que personnellement. Dès notre premier entretien, le courant est de suite passé entre nous et une belle amitié s'en est suivie.

Sophie, merci pour ta grande générosité et pour ton soutien qui m'a été indispensable. Tu as toujours été présente, à mon écoute et tu as toujours trouvé les mots justes et cela dans toutes les situations. J'ai toujours pu compter sur toi pour me dépanner quand j'en avais besoin. Merci aussi pour toutes tes petits fiches pratiques au labo et que j'étais super contente de pouvoir consulter.

Roseline, Armelle, Ludivine, **Maëva, Julien B,** je vous remercie pour votre bonne humeur et votre amitié. Vos petites attentions me vont droit au cœur. **Roseline**, tu es une collègue vraiment formidable, une « wonder woman » qui trouve une solution à tous les problèmes. Un grand merci à **Armelle** qui a été d'une aide précieuse lorsque j'avais besoin de CD34+. Tu as toujours été très compréhensive en particulier quand ma demande était urgente et tu mettais tout en œuvre pour me trouver le cordon ou l'ampoule qui répondait à mes attentes. Aussi, je te remercie chaleureusement de toujours penser à mettre des petites affaires de côté pour faire plaisir à mon petit Pierre.

Sylvie, Sandrine, Maxime, nous avons vécu la plus belle des aventures ensemble. A quelques mois d'écart, nous sommes devenus parents pour la première fois. Quel plaisir de pouvoir partager les mêmes émotions et de pouvoir échanger nos petites anecdotes. Merci aussi pour vos conseils techniques (Cytométrie ou lenti), et le 7-AAD… .

Khalil, je te remercie de tout cœur pour ta grande disponibilité, pour m'avoir enseigné tout ton savoir et ton savoir-faire. Tu as été d'une aide indispensable et tu as toujours été là pour me donner un coup de main. Quand je pense à toutes ces prod et titrations! Ce fut très agréable de travailler avec toi. Merci beaucoup pour tes remarques très pertinentes sur mes résultats et mon projet en général. J'ai apprécié tous tes efforts pour maîtriser l'essai entrant et dompter le LSRII en un temps record !

Sabine, je te remercie pour ton soutien, tous tes conseils et tes interventions lors de mes présentations de labo. Un grand merci aussi pour m'avoir donné la piste pour la demande de financement de la SFH.

Thi My Anh, je te remercie pour ta grande gentillesse. Tu as toujours été disponible et j'ai pu trouver auprès de toi du réconfort dès que j'en avais besoin.

Maguy, un grand merci pour ta gentillesse. Merci pour cette si bonne organisation lors des réservations des hôtels et des billets de train. Tu penses au côté pratique et tu trouves toujours le meilleur pour notre confort. Ce fut également avec plaisir de me proposer comme serre-file lors des visites de Généthon et comme volontaire pour apporter mon aide lors de la fête de la science.

Séverine, je te remercie pour ton amitié. Nous nous sommes toujours serrées les coudes et nous nous comprenions en tant que thésarde. Aussi, je sais que je peux parler de tout avec toi et c'est réciproque. Nos conversations téléphoniques interminables en disent longs sur nos confidences et je pense que Free nous maudit ;-) Merci aussi pour les animations organisées au labo, pour les délicieuses pâtisseries et ces belles soirées organisées entre amis chez toi.

Céline, Grégory, Guillaume et Jérémy R, nous avons passé de chouettes soirées ensemble : poker, bowling, apéro. **Céline,** merci beaucoup pour ton aide au labo, ton soutien et ta sympathie. **Guillaume,** je te remercie pour ta disponibilité et tes précieux conseils en particulier pour les stats, le traitement d'image, … les soucis de mise en page pour l'insertion de mes figures de thèse ;-) Merci aussi pour ton écoute et ta sympathie. **Grégory,** un grand merci de m'avoir donné de la doc sur les lenti, je les ai beaucoup consultés en cas de doute et pour l'écriture de l'intro de ma thèse. Merci aussi pour t'être porté chauffeur volontaire lors des tempêtes de neige. **Jérémy R**, je te remercie pour ta grande gentillesse et pour ta grande patience pour m'apprendre à jouer au poker.

Karine P, merci pour ta sympathie et pour tes cours de danse sur Shakira !

Merci **Luu, Emeline, JB, Jérémie et Driss** pour votre gentillesse et votre soutien. Nous nous sommes tenus compagnie pendant toutes ces heures passées ensemble dans la pièce lenti !

Merci aussi à **Agnès et Karine C** pour leur amitié et leur soutien. Même sans vous le dire, vous avez détecté les moments difficiles et vous m'avez apporté vos conseils et vos encouragements.

Merci à **Samia** et **Frédéric** pour leur sympathie et aussi à tous les membres de leur équipe respective, pour leur efficacité à répondre au plus vite à mes besoins.

Peggy, je te remercie pour tes précieux conseils en cytométrie. Ta formation est très didactique et c'est très agréable de travailler sur des appareils bien entretenus.

Un merci tout particulier à tous les thésards et anciens thésards : **Mado, Marina, François**. **Mado,** merci pour tes conseils, ton amitié et ta gentillesse. Tu as toujours trouvé du temps, pourtant si précieux, pour répondre à une question ou pour me montrer comment faire une manip ou m'expliquer une fonction sur Vector NTi. **Marina,** je me souviendrai toujours de ces fameux cours d'anglais ! **François,** merci pour ton humour et d'être passé de temps en temps dans mon bureau pour prendre des nouvelles.

Merci à tous les stagiaires **Sharon, Hélène, Aurore, Jérémy B**. **Aurore**, je te remercie pour ton enthousiasme et ton énergie. Tu m'as beaucoup amusée et c'était avec grand plaisir de passer les temps d'incubation ensemble. Que de rigolades, je me souviendrai toujours de la nuit de la danse au dernier Téléthon ! **Jérémy,** au départ très discret, tu t'es révélé être un bon pote et un grand fêtard. La soirée que nous avons passée pour fêter la bourse de thèse de Saliha est mémorable.

Un énorme merci à **Saliha** pour son sérieux et son implication pour les révisions du papier. J'aurais aimé pouvoir t'encadrer d'avantage sur l'essai entrant. Avec l'aide de Khalil, nous y sommes quand même arrivés. Ce fut un véritable travail d'équipe. Je suis contente de te passer le flambeau et je suis fière que mon travail ait un avenir à travers toi. Je te souhaite beaucoup de succès pour la suite.

Merci **Mamouna** ! Tu as toujours pris des nouvelles et même depuis le Sénégal. Ce fut un plaisir de discuter quelques minutes ensemble tous les soirs lors de ton passage à l'étage.

Un grand merci à l'ensemble de mes collègues. Vos petites attentions, vos encouragements, votre bonne humeur m'ont fait très plaisir. Aussi, les activités, dans le cadre de la préparation et pendant les 30h du Téléthon, pendant ces 3 années, ont renforcé notre lien et resteront des souvenirs indélébiles.

Merci infiniment à mes anciennes copines de la fac de Versailles **Souad, Angé, Carine.** Vous êtes devenues de véritables amies et même plus. Comme des membres de la même famille, nous sommes présentes à tous les évènements exceptionnels de la vie de chacune : soutenance de thèse, mariage, baptême. Pour le meilleur ou pour le pire, nous sommes toujours là l'une pour l'autre.

De tout cœur, je remercie toute ma belle-famille pour tout leur amour. En particulier mes beaux-parents, **Jean-Pierre** et **Françoise**. J'ai toujours pu compter sur vous quand j'en avais besoin. Merci d'être vous tout simplement.

Merci à **mes parents et à mes frères.** Vous m'avez toujours choyée, soutenue dans mes décisions et encouragée dans les moments difficiles. **Papa**, je te remercie de toujours être à la recherche de mon bien-être, de mon bonheur et de veiller à ce que je ne manque de rien. **Maman,** tu me donnes tout l'amour qu'une mère peut donner à son enfant. Tu es toujours là pour m'écouter, m'encourager et me dorloter à chaque visite à la maison.

Un immense merci à ma moitié, **Cédric**. Tu m'as toujours soutenue dans tous mes projets. Merci d'avoir été si compréhensif pendant ces années de thèse. J'ai trouvé auprès de toi un véritable équilibre. Tu es un mari et un père exemplaire.

Merci à mon fils **Pierre**. Ta présence et ton sourire sont une véritable source de bonheur. Tu es ma force, mon moteur, ma raison de vivre. Il n'y a rien de mieux qu'un de tes câlins pour me remonter le moral et me redonner du courage.

Table des matières

ABREVIATIONS.....- 4 -

PREAMBULE ..... - 7 -

INTRODUCTION ..... - 7 -

CHAPITRE 1 : La thérapie génique et les vecteurs rétroviraux

I- La thérapie génique ..... - 9 -

I.A- Les approches de thérapie génique non-virales .....- 10 -

I.B- Les approches de thérapie génique virales.....- 12 -

II- Les vecteurs rétroviraux de transfert de gène.....- 16 -

II.A - Les vecteurs rétroviraux dérivés des γ-rétrovirus .....- 16 -

II.B- Les vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1.....- 22 -

II.B.1- Structure du génome du VIH-1 .....- 22 -

II.B.2- Structure de la particule du VIH-1.....- 24 -

II.B.3- Cycle de réplication du VIH-1.....- 26 -

II.B.4- Production de vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1.....- 29 -

II.B.4.1- Historique .....- 29 -

II.B.4.2- Vecteurs lentiviraux de 3ème génération .....- 31 -

II.B.4.3- Pseudotypage des vecteurs lentiviraux avec des glycoprotéines d'enveloppe hétérologues .....- 32 -

II.B.4.3.1- Les glycoprotéines d'enveloppe et leur tropisme .....- 33 -

II.B.4.3.1.1- Utilisation des GP modifiées GALVTR et RD114TR pour pseudotyper les vecteurs lentiviraux.....- 35 -

II.B.4.3.1.2- Utilisation de la VSV-G pour pseudotyper les vecteurs lentiviraux .....- 36 -

II.B.5- Techniques de production et de titration des vecteurs lentiviraux .....- 37 -

II.B.5.1 Techniques de production des vecteurs lentiviraux .....- 37 -

II.B.5.1.1 Les lignées cellulaires utilisées pour la production des vecteurs lentiviraux .....- 37 -

II.B.5.1.2 Production des vecteurs lentiviraux de 3éme génération par transfection transitoire .....- 37 -

II.B.5.1.3- Production des vecteurs lentiviraux à partir de lignées stables- 38 -

II.B.5.1.4- Purification et concentration des vecteurs lentiviraux.....- 39 -
II.B.5.2 Techniques de titration des vecteurs lentiviraux.....- 40 -
II.B.5.2.1 Méthode de titration des vecteurs lentiviraux en particules physiques .....- 40 -
II.B.5.2.2 Méthode de titration des vecteurs lentiviraux en particules infectieuses.....- 41 -
II.C- Autres vecteurs rétroviraux et lentiviraux de transfert de gène.....- 41 -
III- Les essais cliniques mettant en jeu des vecteurs rétroviraux/lentiviraux .....- 43 -
III.A- Les essais cliniques.....- 43 -
III.A.1- La thérapie génique hématopoïétique.....- 43 -
III.A.1.1- Les cellules souches hématopoïétiques humaines et la thérapie génique.....- 43 -
III.A.1.2- Exemples d'essais cliniques de thérapie génique des cellules souches hématopoïétiques.....- 44 -
III.B- Les problèmes de génotoxicité liés à l'utilisation de vecteurs intégratifs .- 48 -
CHAPITRE 2 : Description et étude des mécanismes d'adhésion et de fusion des rétrovirus et vecteurs rétroviraux
I- Adhésion et fusion de la particule virale avec la membrane cellulaire.....- 50 -
I.A- Adsorption et adhésion des rétrovirus à la surface cellulaire .....- 50 -
I.B- Fusion de la membrane virale et cellulaire.....- 50 -
I.C- Processus général de la formation et de l'élargissement du pore de fusion - 52 -
I.D- Les protéines de fusion virales de classe I, II et III.....- 53 -
I.D.1- La gp160 du VIH-1 : Généralités sur l'adhésion et la fusion .....- 55 -
I.D.2- La VSV-G : Généralités sur l'adhésion et la fusion .....- 55 -
II-Méthodes d'étude de l'étape d'adhésion et de l'étape de fusion des membranes virales et cellulaires .....- 57 -
II.A- Etude de l'adhésion des vecteurs rétroviraux avec la cellule cible .....- 57 -
II.B- Essai permettant l'étude de la fusion entre la membrane virale et la membrane cellulaire .....- 57 -
II.B.1- Système cellulaire basé sur l'expression de l'enveloppe virale pour l'étude de la fusion .....- 57 -
II.B.2-Utilisation de sondes fluorescentes pour l'étude la fusion .....- 58 -
II.B.3-Utilisation de la β-lactamase et de Vpr pour l'étude de la fusion .....- 59 -

CHAPITRE 3 : Utilisation d'additifs de culture pour promouvoir l'entrée des vecteurs rétroviraux dans les cellules cibles

I-Problématique .....- 61 -

II-Les additifs de cultures .....- 61 -

II.A-Les Polymères cationiques et les lipides cationiques.....- 61 -

II.B- Les peptides et protéines cationiques.....- 62 -

II .B.1- La protamine sulfate .....- 62 -

II .B.2- La gélatine cationique .....- 63 -

II.B .3- Le peptide SEVI (Semen Enhancer of Viral Infection) .....- 63 -

II.B.4- Les nanofibrilles de peptide EF-C (Enhancing Factor C).....- 64 -

II.B.5 - Le fragment de fibronectin CH-296 (Retronectin®) .....- 64 -

II.B.6 - Le peptide LAH4-L1.....- 67 -

PRESENTATION ET DISCUSSION DES RESULTATS

I- But du travail.....- 68 -

II- Résultats.....- 69 -

II.A- Mise en évidence de l'effet de la Vectofusin-1 sur l'entrée des vecteurs lentiviraux dans les cellules souches hématopoïétiques.....- 69 -

II.B- Etude des effets des additifs de culture sur la fusion et la transduction de cellules primaires CD34+ avec des vecteurs lentiviraux .....- 71 -

II.C- Résultats préliminaires.....- 72 -

II.C.- Etude Structure/Fonction des peptides de la famille LAH4-L1, les Vectofusin® : Test de l'agrégation des particules virales .....- 72 -

II.C.2 Etude de l'effet des cytokines dans le milieu de culture sur l'entrée des vecteurs lentiviraux dans les cellules hématopoïétiques humaines.....- 73 -

III- Conclusions/Perspectives .....- 77 -

ANNEXE…….- 80-

BIBLIOGRAPHIE……-83-

ABREVIATIONS

6HB	:	Six-helix bundle
AAV	:	Adeno-associated virus
ADA	:	Adénosine désaminase
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ADNc	:	ADN complémentaire
ALD	:	Adrénoleucodystrophie
ARN	:	Acide ribonucléique
ARNm	:	ARN messager
ARNt	:	ARN de transfert
BHK	:	Baby hamster kidney
BIV	:	Bovine immunodeficiency virus
BLAM	:	beta-lactamase
BPF	:	Bonnes pratiques de fabrication
CA	:	Capside
CBD	:	Cell Binding Domain
CCR	:	CC-chemokine receptor
CGD	:	Chronic granulomatous disease
CMV	:	Cytomégalovirus
CPI	:	Complexe de pré-intégration
cPPT	:	central polypurine tract
CS	:	Connecting segment
CSH	:	Cellules souches hématopoïétique
CSM	:	Cellules souches mésenchymateuses
CTE	:	constitutive transport element
CXCR	:	CXC-chemokine receptor
DBS	:	Double Strand Break (cassure double brin)
DICS	:	Déficit immunitaire combiné sévère
DiO	:	3,3-dioctadecyloxacarbocyanine
EF-C	:	Enhancing factor C
EIAV	:	Equine infectious anemia virus

ELISA	:	Enzyme-linked immunosorbent assay
env	:	enveloppe
FIV	:	Feline immunodeficiency virus
FRET	:	Fluorescence resonance energy transfer
FV	:	Foamy virus
gag	:	groupe antigène
GALV	:	Gibbon ape leukemia virus
GP	:	Glycoprotéine
GvHD	:	Graft-versus-host-disease
HCT	:	Human Colorectal Carcinoma (carcinome humain colorectal)
HEK		Human Embryonic Kidney (rein embryonnaire humain)
HS	:	Héparan sulfate
HSV	:	Herpes simplex virus
IEP	:	Intron-Encoded Protein (protéine codée par l'intron)
IN	:	Intégrase
kDa	:	Kilo Dalton
LCP	:	Lignée cellulaire productrice
LTR	:	Long terminal repeat
LV	:	Lentiviral vector (Vecteur lentiviral)
MA	:	Matrice
MLV	:	Murine leukemia virus
MLV-A	:	MLV amphotropique
MTI	:	Médicament de thérapie innovante
NADPH-oxydase	:	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase
NC	:	Nucléocapside
PAP	:	Phosphatase acide prostatique
PBS	:	Primer binding site
PCE	:	post-transcriptional element
PCR	:	Polymerase chain reaction
PEI	:	Polyéthylénéimine
PIC	:	Complexe de pré-intégration
pol	:	polymérase

polyA	:	polyadénylation
PR	:	Protéase
RCL	:	Replication-competent lentiviral vector
RRE	:	Rev response element
RSV	:	Respiratory Syncitial Virus
RT	:	Reverse transcriptase
RTC	:	Reverse transcription complex
RV	:	Rabies virus
SEVI	:	Semen-derived enhancer of viral infection
SFV	:	Semliki Forest virus
SIDA	:	Syndrome d'immunodéficience acquise
SIN	:	Self-inactivating
SLAM	:	Signaling lymphocytic activation molecule receptor
SU	:	Surface glycoprotein
SV40	:	simian virus
SVF	:	Sérum de veau fétal
TBEV	:	Tick borne encephalitis virus
TM	:	Transmembrane protein
UBER	:	Uracil Base Excision Repair
UNG	:	Uracil DNA glycosylase
VIH	:	Virus de l'immunodéficience humaine
VIS	:	Virus de l'immunodéficience simienne
VSV	:	Virus de la stomatite vésiculeuse
WAS	:	Wiskott-Aldrich syndrome
WPRE	:	Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulary element
XPB	:	Xeroderma Pigmentosum B
XPD	:	Xeroderma Pigmentosum D
γ-RV	:	Gamma-rétrovirus

PREAMBULE

L'identification des gènes responsables de pathologies héréditaires ou non-héréditaires et le développement de vecteurs capables d'introduire de l'acide désoxyribonucléique (ADN) à l'intérieur des cellules ont permis l'élaboration d'un traitement innovant appelé la thérapie génique. Suite à ces avancées scientifiques et technologiques, les premiers protocoles de thérapie génique ont fait leur apparition au début des années 1990 (Anderson 1992; Miller 1992a). La thérapie génique est une technique qui consiste donc à introduire du matériel génétique à l'intérieur d'une cellule dans un but thérapeutique. Cette nouvelle approche médicale a été utilisée dans de nombreux essais cliniques dont les résultats ont montré son efficacité curative depuis une dizaine d'années (Cavazzana-Calvo *et al.* 2000; Aiuti *et al.* 2002; Gaspar *et al.* 2004; Ott *et al.* 2006).

Le premier essai clinique de thérapie génique a été réalisé en 1989 aux Etats-Unis. Des patients atteints d'un cancer à un stade avancé ont été traités par l'administration de lymphocytes T autologues modifiés avec un vecteur rétroviral pour infiltrer la tumeur. Cette étude a montré le succès du transfert d'un gène de résistance à la Néomycine avec un vecteur rétroviral (Rosenberg *et al.* 1990).

En 2013, parmi les 1902 essais cliniques de thérapie génique initiés dans le monde, 64,2% des études sont menées pour combattre le cancer, 8,9% concernent les maladies mono-géniques, 8,1% les maladies cardiovasculaires et 8,2% les maladies infectieuses (The Journal of Gene Medicine, http://www.willey.co.uk/genmed/clinical) (Figure 1).

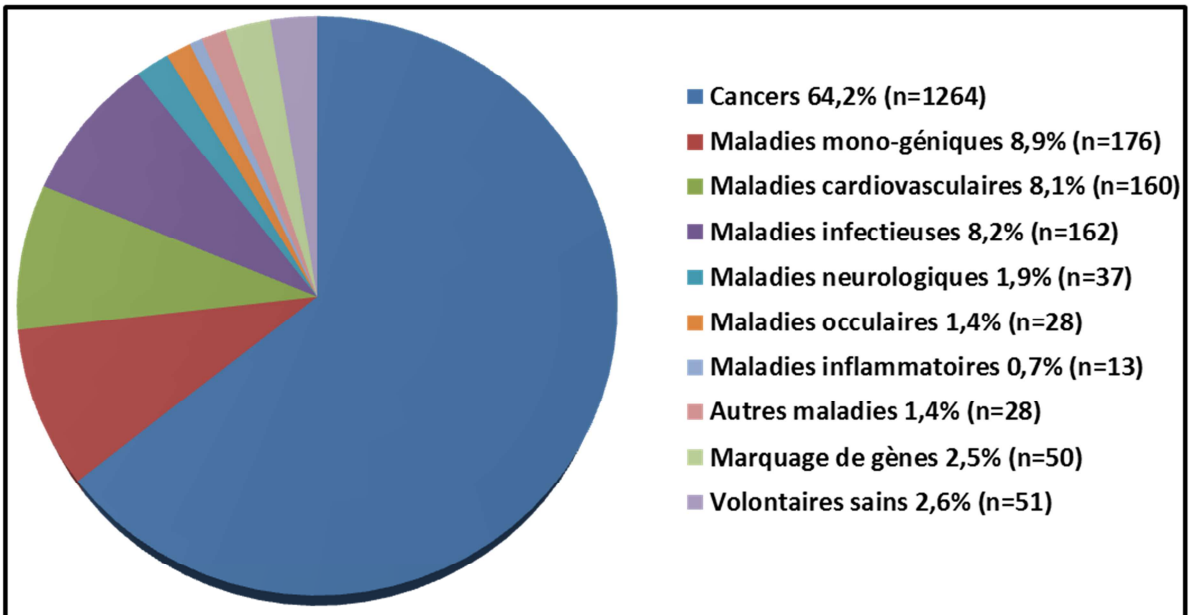


Figure 1 . Indications des essais de thérapie génique depuis 1989. Mise à jour : Juillet 2013 (D'après The Journal of Gene Medicine, http://www.willey.co.uk/genmed/clinical)

Dans le but d'améliorer l'approche virale de transfert de gènes, la compréhension du mécanisme d'entrée de ces vecteurs dans les cellules cibles est nécessaire pour obtenir un transfert de gènes efficace et une bonne expression du transgène. Cette introduction sera consacrée à la thérapie génique et plus particulièrement aux outils de transfert de gènes dérivés des rétrovirus ainsi qu'à l'utilisation additifs de culture permettant une meilleure efficacité de transduction des cellules d'intérêt. Une attention particulière sera donnée aux vecteurs lentiviraux dérivés du Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1), qui sont les vecteurs étudiés dans ce projet de thèse. L'essentiel de cette thèse a été consacré à la mise en place d'un essai (BLAM-LV) permettant l'étude de la fusion virale, basée sur la technique du transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes (FRET), initialement développé pour l'étude de l'entrée du VIH-1 (Cavrois *et al.* 2002) et maintenant adapté à l'étude des vecteurs lentiviraux (LV). Cet outil a été utilisé pour l'étude concomitante de l'adhésion, de la fusion et de la transduction des LV pseudotypés avec la glycoprotéine d'enveloppe du Virus de la Stomatite Vésiculeuse (VSV-G-BLAM-LV) dans des lignées et des cellules primaires en présence ou en absence d'additifs de culture. Cet essai a également permis l'étude du mécanisme d'action des Vectofusin®, en particulier la Vectofusin-1, une nouvelle classe d'additifs de culture capables de promouvoir l'entrée de pseudotypes lentiviraux et γ-rétroviraux (Fenard *et al.* 2013a).

INTRODUCTION

CHAPITRE 1

La thérapie génique et les vecteurs rétroviraux

I- La thérapie génique

La thérapie génique est le transfert d'acides nucléiques dans les cellules d'un patient dans le but d'obtenir un effet thérapeutique. Il existe deux types de thérapie génique selon que les cellules traitées soient somatiques ou de la lignée germinale. La différence majeure entre ces deux approches étant l'absence de transmission ou la transmission de la modification génétique à la descendance. Cette dernière approche soulève des problèmes d'un point de vue éthique et sociologique (Sade and Khushf 1998; Szebik and Glass 2001; Gansbacher 2002).

Chaque pays a sa propre réglementation concernant l'usage des médicaments de thérapie innovante (MTI) de thérapie génique. En France, la thérapie génique est soumise à la fois à la législation européenne et française. Dans les textes de la directive 2001/83/CE du parlement européen, à l'annexe I, un MTI de thérapie génique est défini comme suit :

« Par médicament de thérapie génique, on entend un médicament biologique qui a les caractéristiques suivantes:

- il contient une substance active qui contient ou constitue un acide nucléique recombinant administré à des personnes en vue de réguler, de réparer, de remplacer, d'ajouter ou de supprimer une séquence génétique;
- 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. »

L'objet le plus important et le plus difficile en thérapie génique est de trouver une méthode de transfert de gène efficace et sans danger. Des outils appelés vecteurs de thérapie génique ont donc été développés pour relever ce défi. L'introduction des acides nucléiques à l'intérieur des cellules n'est pas un phénomène spontané. Les acides nucléiques, chargés négativement, sont naturellement repoussés par la charge également négative de la membrane plasmique. De plus, le vecteur devra surmonter les obstacles extracellulaires (éviter les mécanismes immunitaires d'élimination des particules, cibler spécifiquement les cellules ou les tissus, protéger les acides nucléiques de la dégradation) et les barrières intracellulaires (franchir la membrane plasmique ou endosomale, traverser le cytoplasme, et enfin entrer dans

le noyau pour permettre l'expression du transgène) qui menacent le succès du transfert de gène (Zhang *et al.* 2012).

Il existe différentes méthodes pour transférer un médicament de thérapie génique dans les cellules. Les deux approches principales sont i) les approches de thérapie génique non-virales utilisant de l'ADN nu ou des complexes ADN et ii) les approches de thérapie génique virales utilisant des virus recombinants, appelés vecteurs viraux ; l'objectif commun de ces deux approches étant de proposer une variété de vecteurs de thérapie génique afin de choisir parmi ceux-ci le vecteur idéal qui serait à la fois efficace, spécifique et d'une parfaite innocuité pour une application précise et dans un contexte donné.

I.A- Les approches de thérapie génique non-virales

Les approches de thérapies géniques non-virales peuvent-être classées en trois catégories : les particules inorganiques (*e.g.* le phosphate de calcium), les particules synthétiques ou naturelles biodégradables (*ex.* : les liposomes cationiques) et les méthodes physiques (*ex.* : l'électroporation) (Tableau 1).

Catégories	Exemples	
Particules Inorganiques	Phosphate de Calcium	
	Silice	
	Or	
Particules synthétiques ou naturelles biodégradables	Polyéthylene Imine (PEI)	Polyméthacrylates
	Polylactic-co-glycolic acid (PLGA)	Liposomes cationiques
	Poly lactic acid (PLA)	Emulsions cationiques
	Chitosan	Nanoparticules lipides solides
	Dendrimères	Poly-L-lysine
Méthodes physiques	Injection à la seringue	Photoporation
	Electroporation	Magnétofection
	Sonoporation	Hydroporation
	Gene gun	

Tableau 1 . Approches non-virales de thérapie génique. (D'après le livre Gene Therapy - Tools and Potential Applications, chapitre 1 de Rodriguez Gascon *et al.*,2013)

L'utilisation des liposomes est l'une des approches non-virales les plus étudiées. Ce sont des vésicules sphériques composées de phospholipides et sont utilisées pour délivrer des drogues ou des gènes. L'utilisation des liposomes comme vecteur de transfert de gènes présente plusieurs avantages au point de vue économique, pratique et sécurité d'utilisation. De plus, les liposomes peuvent se complexer avec une molécule d'ADN de grande taille et la protège de la dégradation principalement causée par les nucléases (Kamimura *et al.* 2011). Il a également été montré que les liposomes peuvent délivrer efficacement des molécules d'ADN ou d'ARN (Acide ribonucléique) dans des types cellulaires variés et dans de nombreuses applications telles que le ciblage de tumeurs, les cellules épithéliales des voies respiratoires, les hépatocytes ou encore les cellules musculaires par injection directe ou en intraveineuse (Xu *et al.* 2002; Durcan *et al.* 2008; Kamimura *et al.* 2011). Les vecteurs de thérapie génique basés sur l'utilisation des liposomes ont atteint les études cliniques, par exemple pour le traitement de cancers (Stopeck *et al.* 1997; Stopeck *et al.* 2001) et pour traiter des patients atteints de mucoviscidose (Caplen *et al.* 1995; Gill *et al.* 1997; Porteous *et al.* 1997; Zabner *et al.* 1997).

L'électroporation consiste à appliquer un courant électrique afin de perméabiliser les cellules. Cette technique est utilisée après l'injection d'ADN nu *in vivo* pour favoriser son entrée dans les cellules (Somiari *et al.* 2000). La peau, le muscle et le foie sont de bons candidats pour l'électroporation (Heller *et al.* 2000; Drabick *et al.* 2001; Hanna *et al.* 2001; Li *et al.* 2001; Maruyama *et al.* 2001; Liu and Huang 2002a). Des améliorations ont été apportées en remplaçant les électrodes traditionnelles par des électrodes ressemblant à des seringues (Liu and Huang 2002b). L'injection de l'ADN et l'électrotransfert se font alors simultanément et les dommages causés aux tissus par l'électroporation sont minimisés (Liu and Huang 2002b).

La méthode appelée « Gene Gun » permet d'introduire directement l'ADN dans les tissus ou dans les cellules. L'ADN est fixé sur des particules d'or qui sont tirées sur la cellule ou sur le tissu d'intérêt. Le complexe ADN/particule traverse alors directement la membrane cellulaire vers le cytoplasme et même dans le noyau sans passer par la voie endosomale.(Lin 2000)

La transfection au phosphate de calcium repose sur la formation de petits précipités de phosphate de calcium couplés à de l'ADN. Ceux-ci sont obtenus en mélangeant un tampon salin contenant des ions phosphate avec une solution contenant du chlorure de calcium et l'ADN. Ce complexe est ajouté sur les cellules à transfecter (Bacchetti and Graham 1977).

D’autres types d’approches non-virales comme ceux utilisant le polyéthylenéimine (PEI),la poly-L-lysine ou les peptides cationiques amphipathiques de la famille du LAH4, ont aussi été étudiés pour leur capacité à faire du transfert de gènes (Kollen *et al.* 1999; Bragonzi *et al.* 2000; Ward *et al.* 2001; Kichler *et al.* 2003; Lungwitz *et al.* 2005; Mason *et al.* 2006b; Bechinger *et al.* 2010) .

L’utilisation des vecteurs non-viraux est une alternative à l’utilisation des vecteurs viraux et permet ainsi d’élargir les approches. Les vecteurs non-viraux ont l’avantage d’être moins onéreux, et permettent de délivrer de grande séquence d’ADN contrairement aux vecteurs viraux qui ont une capacité limitée. Cependant, les méthodes non-virales ne permettent pas une entrée efficace de l’ADN à l’intérieur du noyau et cela est particulièrement problématique pour les cellules qui ne se divisent pas ou peu.

I.B- Les approches de thérapie génique virales

Comme le montre la figure 2, les vecteurs viraux de thérapie génique sont très largement utilisés dans les essais de thérapies géniques. Les vecteurs viraux sont des outils efficaces de transfert de gènes dans les cellules de mammifères. Mais leur utilisation peut poser des problèmes d’immunogénicité, d’oncogénicité et la taille de l’ADN pouvant être incorporée dans les virions est limitée (Tani 2011) (Tableau 2). Historiquement, les vecteurs dérivés du virus de la vaccine et des baculovirus ont été les premiers vecteurs développés dans des approches virales de transfert de gènes (Carbonell *et al.* 1985; Lee *et al.* 1994; Hofmann *et al.* 1995). Parmi les autres virus utilisés comme vecteur de thérapie génique, les virus adéno-associés (AAV) sont devenus très attractifs car ils sont simples du point de vue génétique et ils sont non-pathogènes chez l’homme et majoritairement non-intégratifs (une très faible fréquence d’intégration peut être observée dans le site *AAVS1* sur le chromosome 19). C’est pourquoi, leur utilisation en clinique semble sans danger et leur efficacité thérapeutique a été montrée dans plusieurs études (Grieger and Samulski 2011). Cependant, les AAVs présentent quelques inconvénients puisqu’ils ne peuvent contenir que de petites molécules d’ADN (5 kb) en comparaison avec d’autres vecteurs viraux tels que les gamma-rétrovirus et les lentivirus (8kb) et qu’il faut tenir compte de la pré-immunité chez l’homme. Aussi, leur capacité d’intégration n’est pas prise en considération et leur risque de génotoxicité est peu connu.

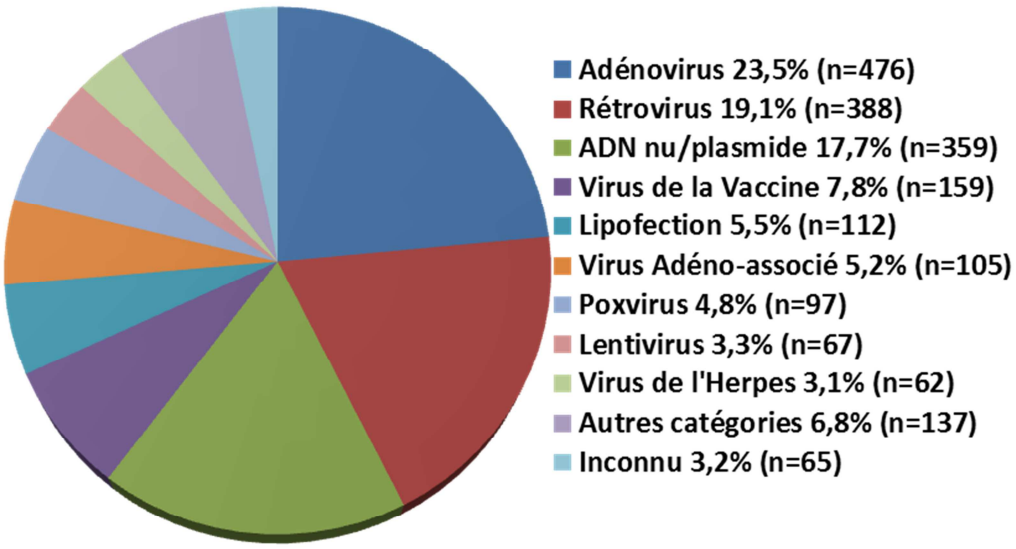


Figure 2 . Indications des vecteurs utilisés dans les essais de thérapie génique. Mise à jour : Juillet 2013 (D'après The Journal of Gene Medicine, http://www.willey.co.uk/genmed/clinical)

Virus	Matériel génétique	Taille maximum de l'insert	Intégratif	Propriétés
Rétrovirus	ARN	8 kb	oui	- Infection des cellules en division uniquement - Expression génique stable
Virus adéno-associé	ADN simple brin	5 kb	non	- Capacité d'incorporer un ADN de petite taille
Lentivirus	ARN	8kb	oui	- Infection des cellules en division et quiescentes - Expression génique stable

Tableau 2 : Caractéristiques des Rétrovirus, Virus Adéno-Associé et Lentivirus (D'après Tani *et al.*, 2011)

Les vecteurs dérivés du virus de l'herpes (HSV : Herpes simplex virus) ont été utilisés pour infecter des types cellulaires variés comme les neurones (Lowenstein *et al.* 1999), les cellules musculaires (Huard *et al.* 1995), les cellules de tumeurs du cerveau (Boviatsis *et al.* 1994), les cellules hépatiques (Miyanohara *et al.* 1992), les cellules du pancréas (Liu *et al.* 1996) et les cellules de l'hypophyse (Goya *et al.* 1998). En plus des vecteurs plus traditionnels, des vecteurs ont aussi été dérivés à partir d'autres virus pour leurs avantages dans certains contextes d'applications de thérapie génique. Par exemple l'utilisation de vecteurs viraux réplicatifs tel que l'adénovirus ONYVX-15 se répliquant uniquement dans les cellules tumorales déficientes pour la protéine p53 (Bischoff *et al.* 1996), ont été proposé pour la thérapie génique anti-cancéreuse (voir (Kirn and McCormick 1996) pour revue). Les vecteurs viraux dérivés du virus de la vaccine ont aussi été proposés pour une application comme vecteur de thérapie génique contre le cancer pour ses capacités de réplication clonale et d'infection pour une large variété de tumeurs (voir (Peplinski *et al.* 1998) pour revue). Aussi, d'autres vecteurs ont été dérivés des alphavirus Sindbis et Semliki Forest (Polo *et al.* 1999), du virus Sendai (Nakanishi *et al.* 1999) et du virus Epstein-Barr (EBV) (Robertson *et al.* 1996). Les vecteurs rétroviraux et plus particulièrement les vecteurs lentiviraux seront développés dans la partie II.

II- Les vecteurs rétroviraux de transfert de gène

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 (voir Editorial du journal Nature (Nature 2009)). Les premiers vecteurs rétroviraux sont des γ-rétrovirus (γ-RV) dérivés du virus leucémogène murin (MLV). Puis d'autres vecteurs rétroviraux ont été développés à partir des lentivirus comme le VIH-1 (Naldini *et al.* 1996). Les vecteurs dérivés du MLV ou du VIH-1 sont les vecteurs rétroviraux de thérapie génique les plus communément utilisés. Les caractéristiques des vecteurs rétroviraux et les modifications apportées à ces vecteurs pour optimiser leur capacité de transfert de gène seront détaillées dans ce chapitre.

II.A - Les vecteurs rétroviraux dérivés des γ-rétrovirus

Au début des années 80, les rétrovirus MLV ont été utilisés pour développer de nouveaux outils de transfert de gène. L'utilisation de ces vecteurs a permis de transférer avec succès et de manière stable, un gène rapporteur dans le génome des cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans des modèles murins. (Williams *et al.* 1984; Dick *et al.* 1985). La famille des retroviridae est composée de 7 genres : les alpharétrovirus, les betarétrovirus, les gammarétrovirus, les deltarétrovirus, les epsilonrétrovirus, les lentivirus et les spumavirus (Pringle 1999) (Tableau 3)(D'après The universal virus Database, Index of Viruses-Retroviridae (2006)). Les rétrovirus sont des virus enveloppés dont le génome est constitué de deux ARNs identiques de polarité positive. Avant de pourvoir s'intégrer stablement dans le génôme de la cellule hôte, le génome viral est transcrit de façon inverse en ADN double brin par la transcriptase inverse (Dezzutti 2007) .

Genre	Exemple	Vecteur de transfert de gène
Alpharetrovirus	Virus du sarcome aviaire	OUI
Betaretrovirus	Virus de la tumeur mammaire murine	NON
Gammaretrovirus	Virus de la leucémie murine (MLV)	OUI
Deltaretrovirus	Virus de la leucémie bovine	NON
Lentivirus	Virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1)	OUI
Epsilonretrovirus	Virus du sarcome dermal du doré jaune	NON
Spumavirus	Virus foamy humain	OUI

Tableau 3 : Les genres de la famille Retroviridae (D'après The universal virus Database, Index of Viruses-Retroviridae, 2006)

La production de particules rétrovirales est réalisée en transfectant dans une lignée cellulaire (*e.g.* les cellules de rein embryonnaire humain HEK293T) les ADN plasmidiques nécessaires à la production des constituants viraux. Plus particulièrement, les gènes viraux *gag*, *pol* et *env*, requis pour la réplication et l'assemblage des particules virales, sont apportés en *trans* sous le contrôle de promoteurs forts comme le promoteur du cytomégalovirus (CMV) ou du virus respiratoire syncitial (RSV). L'apport de ces gènes est réalisé soit i) par transfection transitoire (figure 3), soit ii) par transfection stable, afin d'obtenir une lignée d'encapsidation ou productrice exprimant constitutivement ou sous forme inductible les différents gènes viraux (figure 4). Les particules rétrovirales produites sont ensuite recueillies après 24 à 48 heures dans le surnageant de culture.

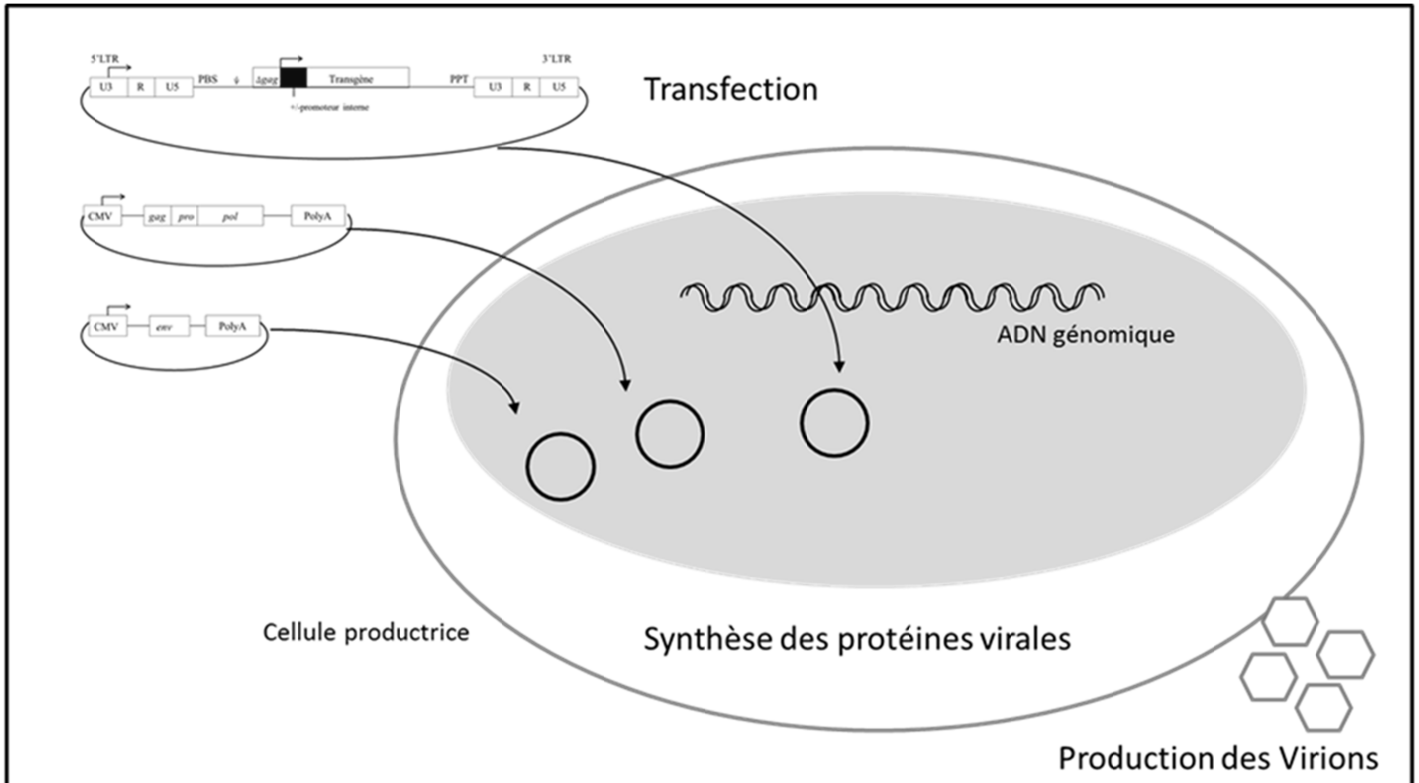


Figure 3 : Représentation schématique de la production de vecteurs dérivés de gammarétrovirus par transfection transitoire. Les plasmides contenant les séquences *gag, pro* et *pol* et la séquence *env* avec le signal polyA sous le contrôle du promoteur du CMV sont transfectés dans la cellule productrice. Après expression des gènes et synthèse des protéines, les virions sont produits et sont récoltés dans le milieu de culture.

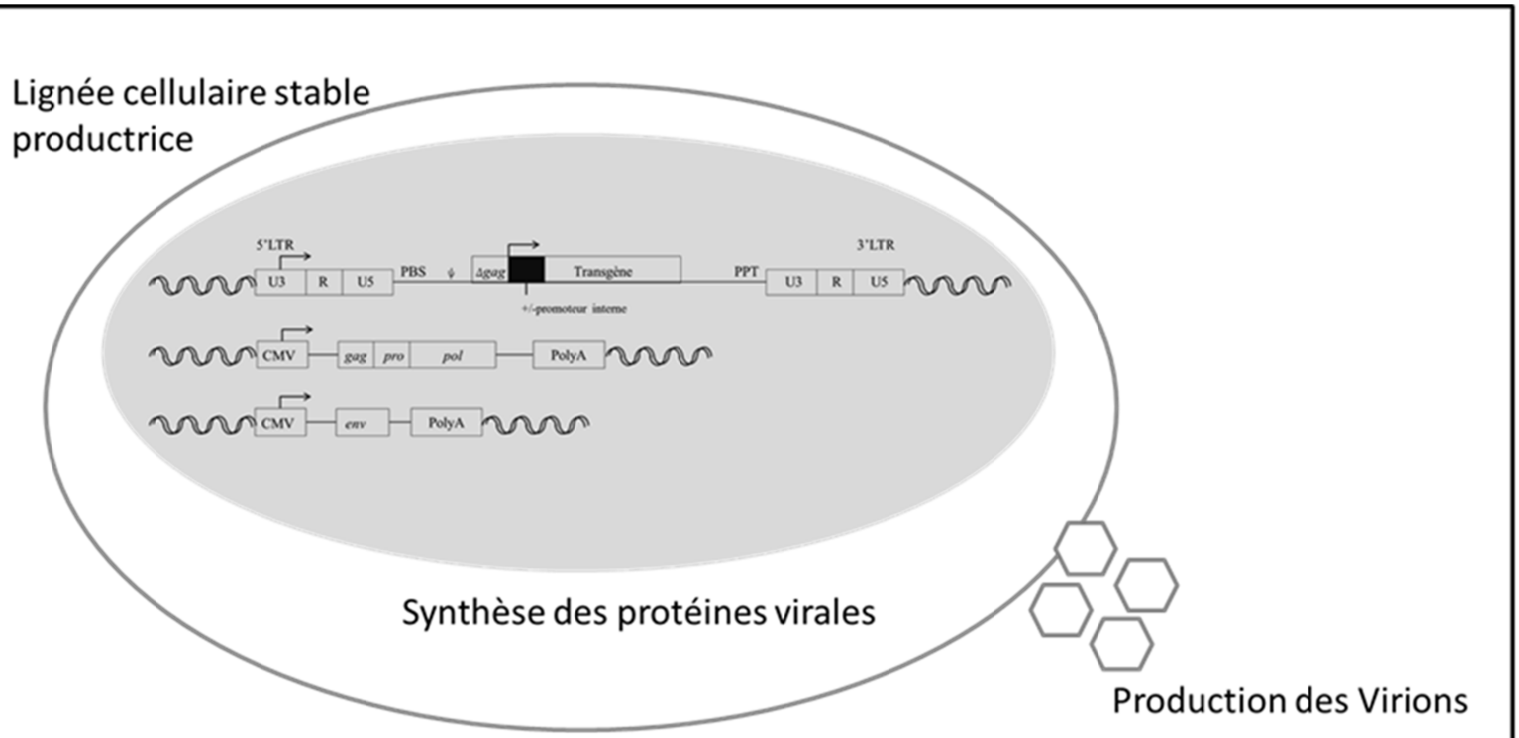


Figure 4 : Représentation schématique de la production de vecteurs dérivés de gammarétrovirus à partir d'une lignée stable. Les séquences *gag, pro* et *pol* et la séquence *env* avec le signal polyA sous le contrôle du promoteur du CMV sont intégrées dans le génome des cellules. Après expression des gènes et synthèse des protéines, les virions sont produits et sont récoltés dans le milieu de culture.

Dans la plupart des systèmes de 3ème génération, les gènes *gag-pol* et *env* avec un signal polyA sont exprimés à partir de plasmides différents (Durand and Cimarelli 2011) (Figure 5). Cette précaution permet de diminuer le risque de produire des particules virales capables de se répliquer pouvant survenir en cas de recombinaisons entre les différents plasmides apportés en *trans*.

L'efficacité de transduction des cellules avec les vecteurs dérivés des MLV est dépendante de la division cellulaire. En effet, le complexe de pré-intégration (CPI) viral est incapable de franchir la membrane nucléaire. C'est pourquoi, le génome viral peut atteindre le noyau seulement lorsque la membrane nucléaire est dégradée au cours de la mitose (Roe *et al.* 1993; Lewis and Emerman 1994). Pour la transduction des CSH qui se divisent peu, il est nécessaire de les stimuler au préalable avec des cytokines et des facteurs de croissance. Pour transduire des cellules quiescentes, telles que les neurones, pour lesquelles une stimulation n'est pas possible, d'autres vecteurs de thérapie génique ont été développés. D'autre part, il a été montré dans le cas particulier du transfert du gène codant pour la β-globine, que l'utilisation de vecteurs γ-rétroviraux ne permet pas de transférer une cassette d'expression contenant les grandes séquences régulatrices de la β-globine afin d'obtenir une expression forte et spécifique dans les cellules erythroïdes (Gelinas *et al.* 1989a; Gelinas *et al.* 1989b), contrairement aux LV qui sont capables de transférer cette cassette d'expression intacte (May *et al.* 2000; Pawliuk *et al.* 2001).

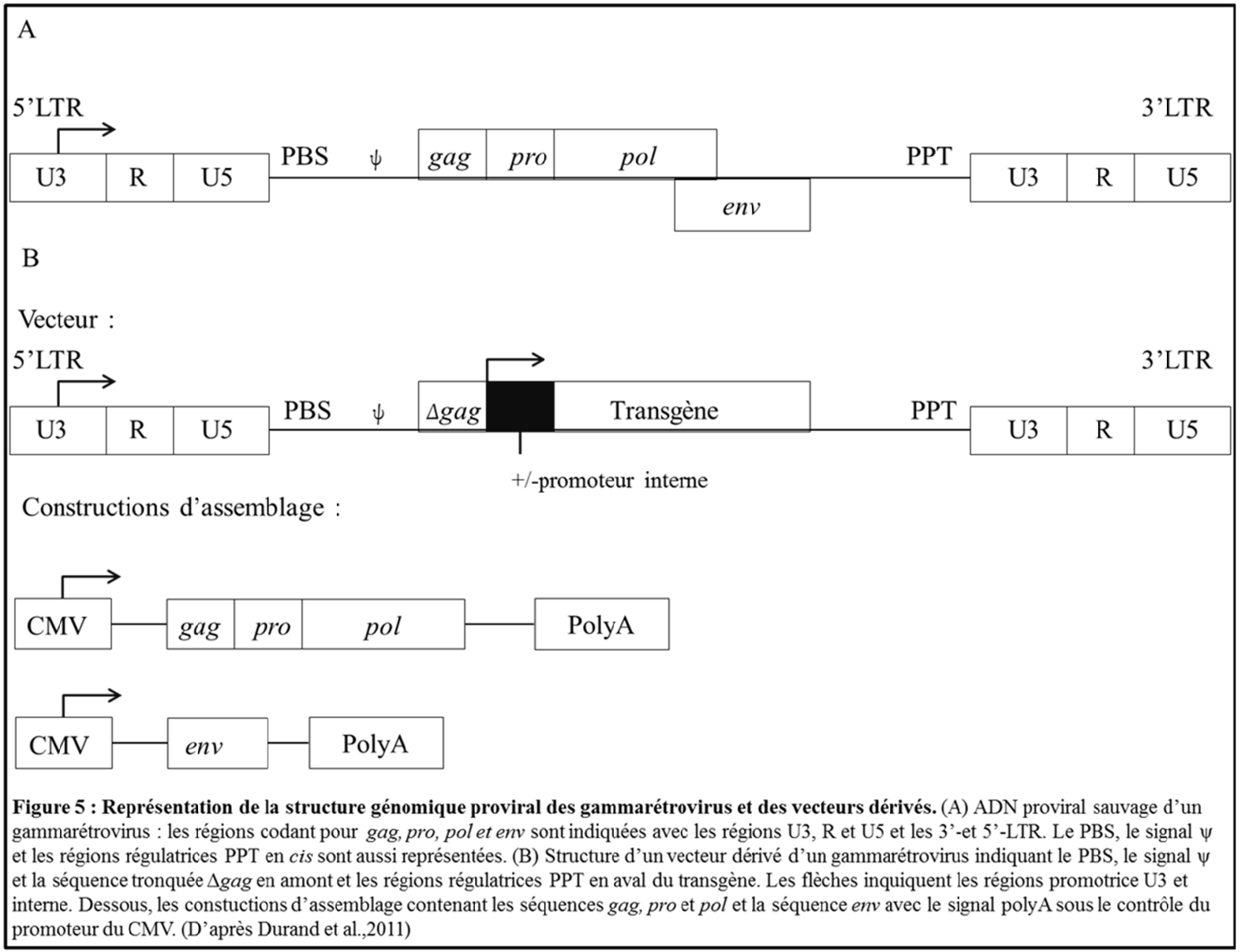


Figure 5 : Représentation de la structure génomique proviral des gammarétrovirus et des vecteurs dérivés. (A) ADN proviral sauvage d'un gammarétrovirus : les régions codant pour *gag, pro, pol et env* sont indiquées avec les régions U3, R et U5 et les 3'-et 5'-LTR. Le PBS, le signal ψ et les régions régulatrices PPT en *cis* sont aussi représentées. (B) Structure d'un vecteur dérivé d'un gammarétrovirus indiquant le PBS, le signal ψ et la séquence tronquée Δ*gag* en amont et les régions régulatrices PPT en aval du transgène. Les flèches inquiquent les régions promotrice U3 et interne. Dessous, les constuctions d'assemblage contenant les séquences *gag, pro* et *pol* et la séquence *env* avec le signal polyA sous le contrôle du promoteur du CMV. (D'après Durand et al.,2011)

II.B- Les vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1

II.B.1- Structure du génome du VIH-1

Le VIH-1 est l'agent étiologique du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Le VIH-1 fait partie de la famille des *retroviridae* du genre lentivirus. Comme tous les rétrovirus, l'ADN proviral du VIH-1 est composé des gènes *gag, pol* et *env* encadrés des deux séquences régulatrices identiques LTR (« long terminal repeat »). Le VIH-1 contient des gènes additionnels dits « accessoires ». En effet, il existe des gènes de régulation de l'expression et de l'export nucléaire des messagers viraux qui sont *tat* et *rev,* mais aussi les gènes accessoires *nef, vpu, vpr et vif* qui jouent un rôle majeur dans la pathogénicité associée au VIH-1(Malim and Emerman 2008). Le gène *gag* code les protéines de structures : la matrice (MA), la capside (CA) et la nucléocapside (NC). Le gène pol code la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT) qui convertit l'ARN en ADN et l'intégrase (IN) qui permet d'intégrer l'ADN viral dans le génome de la cellule cible. Les séquences codant gag et gagpol sont exprimées comme une protéine de fusion. Ces polyprotéines sont clivées spécifiquement par l'action de la protéase PR du VIH-1. De cette façon, les protéines MA, CA et NC sont générées après le clivage de gag. De la même manière, les protéines PR, RT et IN sont générés après le clivage de pol. Le gène *env* code pour la glycoprotéine de surface (SU) et la protéine transmembranaire (TM) de l'enveloppe virale (Vogt 1997). Les séquences promotrices ou LTR, présentes aux deux extrémités de l'ADN proviral, sont composées de 3 régions : U3, R et U5. la région U3 contient les séquences du promoteur (« enhancer ») nécessaires pour la transcription des gènes viraux. La région U5 en 3' est un signal de terminaison de la transcription (signal de polyadénylation) (Naldini *et al.* 1996). D'autres éléments sont aussi nécessaires à la réplication des virus. En aval de la séquence 5'LTR se trouve un site d'adhésion (PBS) pour l'ARN de transfert de la Lysine qui est nécessaire à l'initiation de la synthèse du brin d'ADN (-) lors de la transcription inverse (Peters et al. 1977; Mitra et al. 1979; Sorge and Hughes 1982; Finston and Champoux 1984; Smith et al. 1984; Brown et al. 1989; Charneau and Clavel 1991; Tanese et al. 1991; Trono 1992; Jiang et al. 1993) (Figure 6). A côté de la région PBS se situe le signal d'encapsidation ou psi (ψ) qui est requis pour l'encapsidation du génome ARN dans les nouveaux virions (Miller 1997) et la dimérisation des deux ARN de polarité positive (Figure 7).

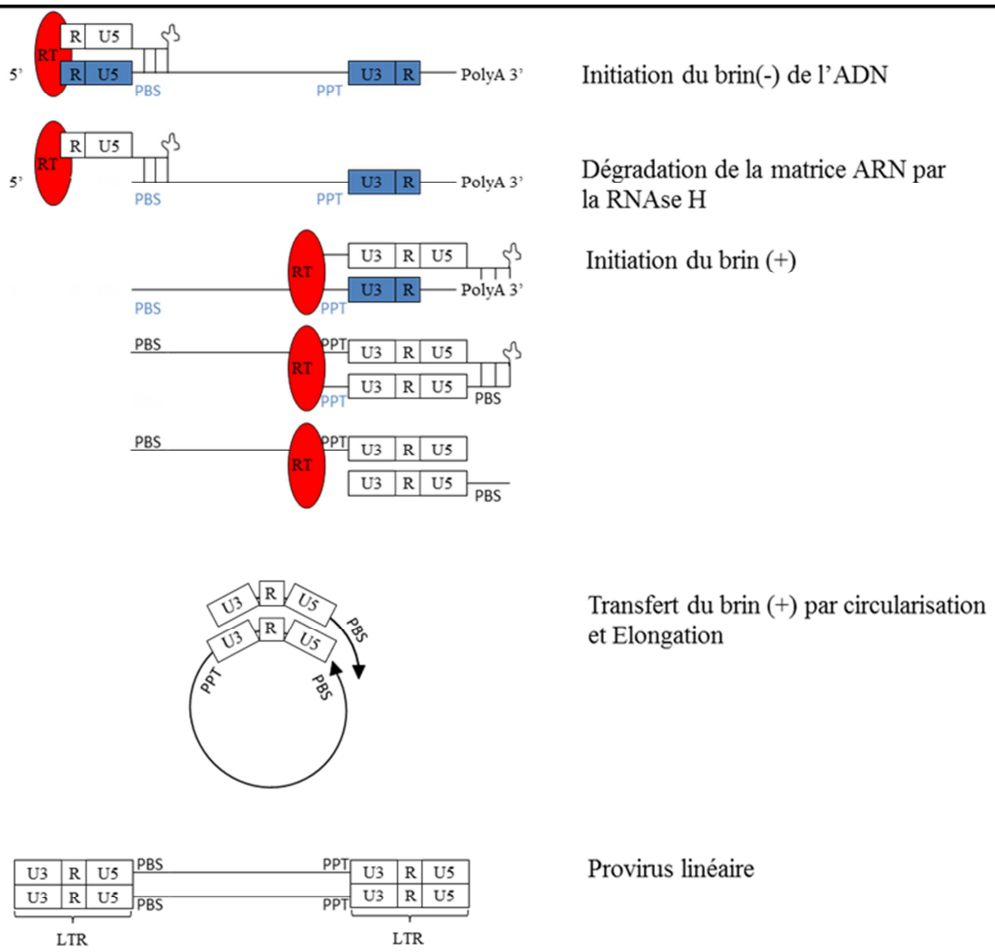


Figure 6 : Schéma de la transcription inverse du VIH-1

La reverse transcription est initiée avec la fixation de l'amorce ARNt sur l'ARN génomique viral. Lors de l'encasidation, tous les rétrovirus emmènent de l'ARNt cellulaire. Ainsi, les virions contiennent de 50 à 100 molécules différente d'ARNt. Néanmoins, l'utilisation d'un primer ARNt spécifique est différents selon le genre. Par exemple pour initier la transcription inverse, le VIH-1 utilise l'ARNt ^{Lys3} (Jiang, Mak et al. 1993) tandis que le MLV utilise l'ARNt ^{Pro} (Peters, Harada et al. 1977).L'amorce se fixe sur une région appelé site de fixation de l'amorce (en anglais primer binding site = PBS) et l'enzyme virale initie la synthèse du simple brin d'ADN (-). Bien que l'initiation peut se passer dans le virion (Trono 1992), l'élongation et la terminaison de la réverse transcription sont réalisés dans le cytoplasme de la cellule hôte.Après l'initiation, la synthèse se poursuit à l'extrémité 5' du génome viral donc les région U5 et R sont codées sur l'ADN –sss (Minus-strand strong stop DNA). Ensuite, la transcriptase inverse dégrade le modèle ARN avec son activité RNase H. La région R est redondante dans le génome viral ce qui permet un saut de l'ADN –sss à partir du R en 5' sur le R en 3' du génome viral (Mitra, Goff et al. 1979) dès que l'ARN a été dégradé (Tanese, Telesnitsky et al. 1991). Après ce transfert de brin, l'ADN –sss est étendu juqu'au 5' du modèle ARN. La RT dégrade la matrice ARN au fur et à mesure qu'elle synthétise le brin d'ADN- sauf dans la séquence polypurine (PPT). Cette séquence d'ARN est alors utilisée pour l'initiation du brin d'ADN + (Sorge and Hughes 1982; Finston and Champoux 1984; Smith, Cywinski et al. 1984). De plus, d'autres séquences d'ARN, comme la séquence polypurine centrale (cPPT) dans le VIH, ne sont pas dégradées et sont aussi utilisées comme des amorces pour la synthèse du brin d'ADN +, créant des produits d'ADN discontinus(Charneau and Clavel 1991). Le brin d'ADN+ est alors synthétisée utilisant l'ADN- sss comme matrice, en s'arrêtant à l'amorce ARNt. Le livre élémentaire tRNA est dégradé par l'activité RNase H de la RT, facilitant un deuxième saut intra-moléculaire. Selon le modèle accepté, la région PBS à l'extrémité 3' du brin d'ADN- se fixe au PBS complémentaire du brin d'ADN+, permettant l'extension du brin d'ADN- utilisant le brin d'ADN+ comme matrice. De cette façon, les régions U3, R et U5 sont dupliqués, formant les LTR de l'ADN viral. Le brin d'ADN+ est aussi prolongé, utilisant le brin d'ADN- comme matrice, complétant le processus de transcription inverse. Le produit final est un ADN double brin à bout franc qui servira pour l'intégration (Brown et al., 1989) Les encadrés bleus représentent les régions de l'ARN génomique et les encadrés blancs représentent l'ADN proviral.

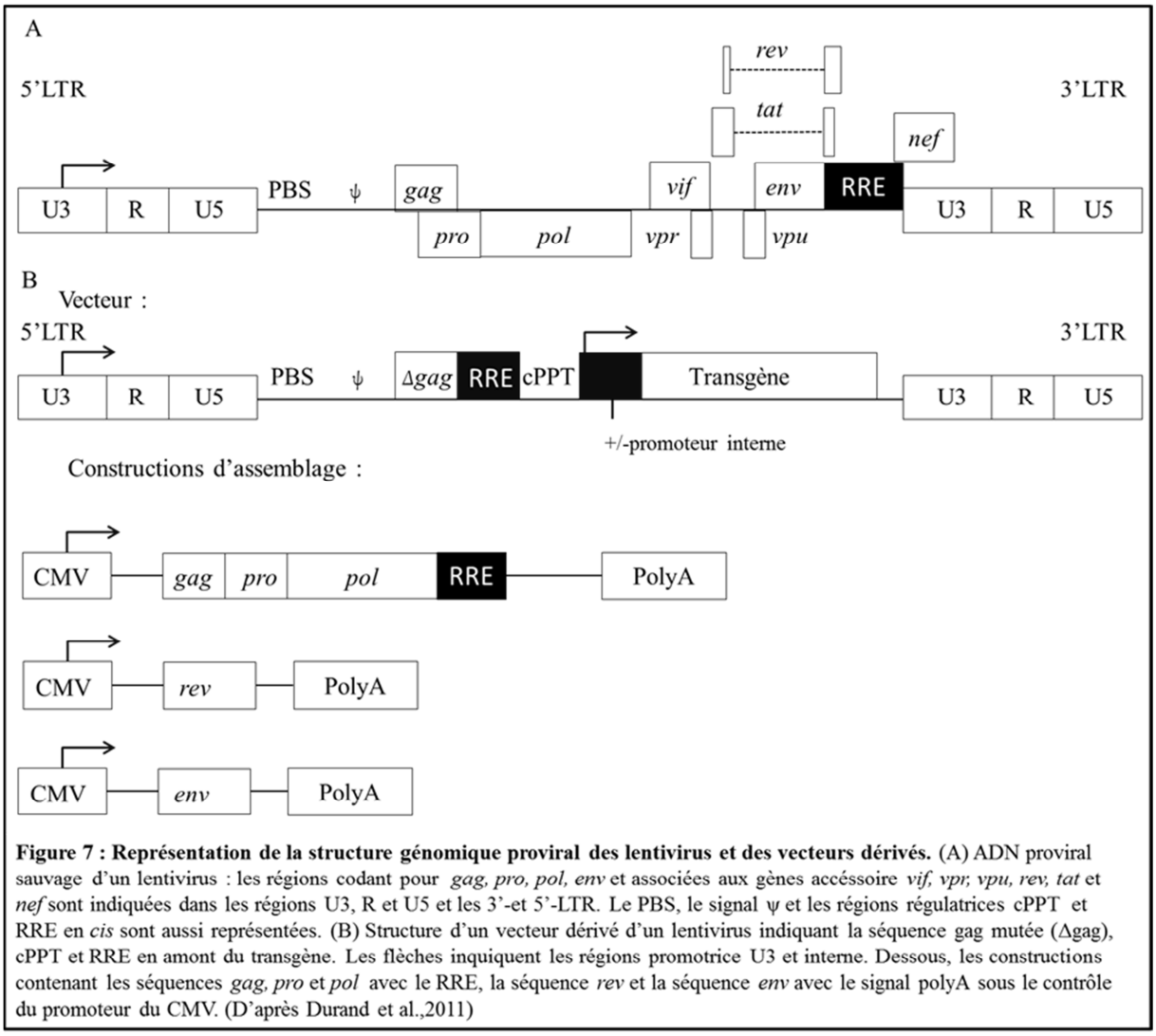


Figure 7 : Représentation de la structure génomique proviral des lentivirus et des vecteurs dérivés. (A) ADN proviral sauvage d'un lentivirus : les régions codant pour *gag, pro, pol, env* et associées aux gènes accéssoire *vif, vpr, vpu, rev, tat* et *nef* sont indiquées dans les régions U3, R et U5 et les 3'-et 5'-LTR. Le PBS, le signal ψ et les régions régulatrices cPPT et RRE en *cis* sont aussi représentées. (B) Structure d'un vecteur dérivé d'un lentivirus indiquant la séquence gag mutée (Δgag), cPPT et RRE en amont du transgène. Les flèches inquiquent les régions promotrice U3 et interne. Dessous, les constructions contenant les séquences *gag, pro* et *pol* avec le RRE, la séquence *rev* et la séquence *env* avec le signal polyA sous le contrôle du promoteur du CMV. (D'après Durand et al.,2011)

II.B.2- Structure de la particule du VIH-1

Au cours de la production, les différents composants viraux s'assemblent et bourgeonnent pour former une particule sphérique immature et non infectieuse (Sierra-Aragon and Walter 2012) (Figure 8). Dans les particules immatures, les protéines Gag et Gagpol sont associées à la membrane virale. Après l'étape de bourgeonnement, les particules immatures subissent un réarrangement important pour devenir des virions matures et infectieux. Les précurseurs protéiques sont clivés par la protéase virale et permettent la formation du nucléoïde de forme conique.

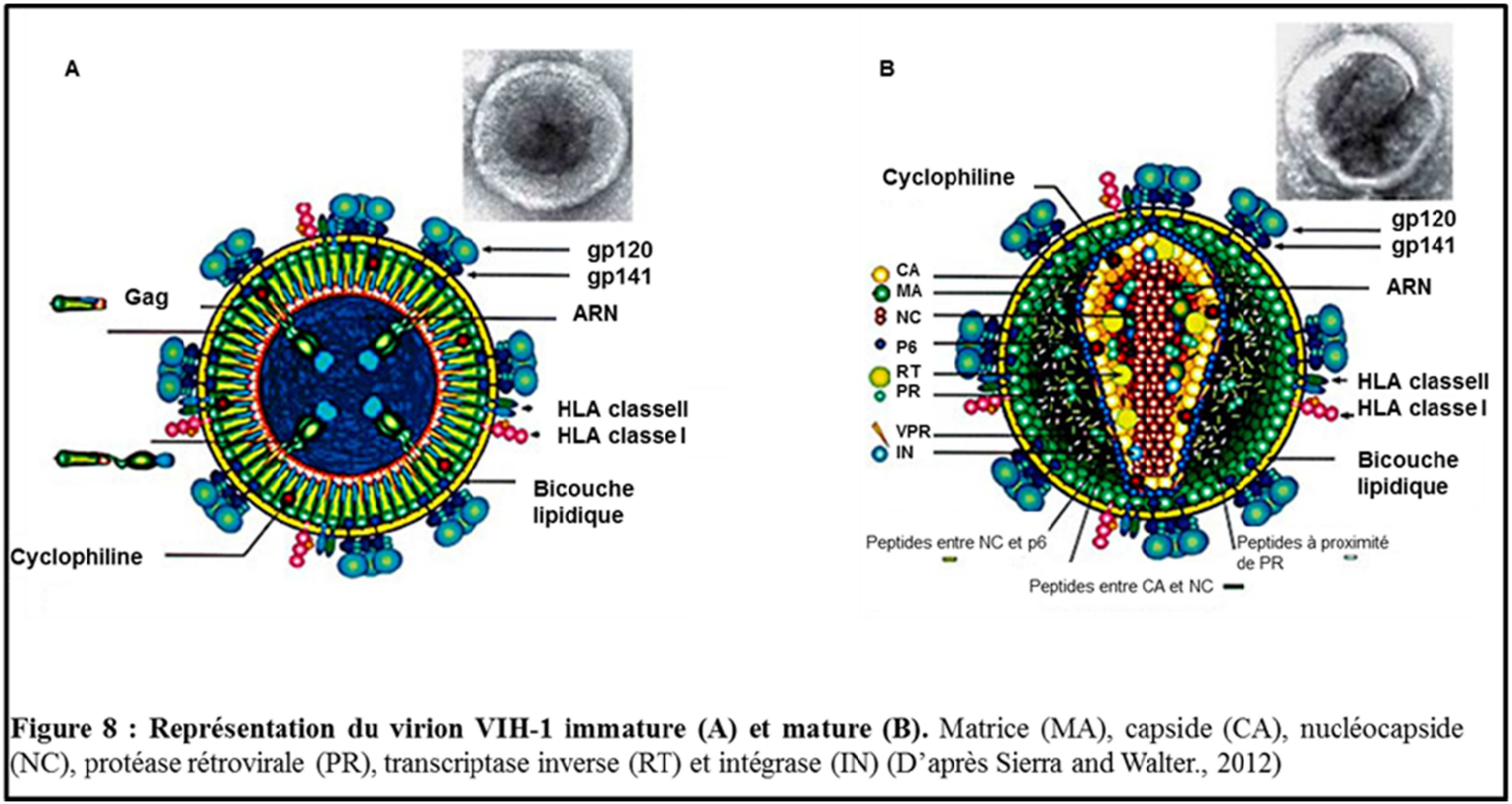


Figure 8 : Représentation du virion VIH-1 immature (A) et mature (B). Matrice (MA), capside (CA), nucléocapside (NC), protéase rétrovirale (PR), transcriptase inverse (RT) et intégrase (IN) (D'après Sierra and Walter., 2012)

II.B.3- Cycle de réplication du VIH-1

Les particules VIH-1 se fixent spécifiquement aux cellules exprimant le récepteur CD4, un marqueur majeur des lymphocytes T auxiliaires. L'adhésion se fait par des interactions spécifiques entre la glycoprotéine d'enveloppe virale (gp120) et le CD4. Ces interactions sont suffisantes pour l'adhésion mais pas l'infection. Les lentivirus ont besoin de co-récepteurs pour promouvoir la fusion des membranes cellulaire et virale. Pour le VIH-1, la fusion membranaire peut-être déclenchée par un récepteur aux chimiokines, majoritairement CXCR4 et/ou CCR5, selon le tropisme de la souche VIH-1 (respectivement X4, R5 ou X4R5) (Doranz *et al.* 1996; Feng *et al.* 1996; Clapham and Weiss 1997; Moore 1997).

La fusion des membranes virale et cellulaire permet de délivrer le nucléoïde dans le cytoplasme, suivi de l'étape de décapsidation et la transcription inverse. Le processus de décapsidation semble être essentiel à l'étape de transcription inverse (Dismuke and Aiken 2006).

La décapsidation du VIH est rapide, contrairement au MLV pour lequel la protéine CA est associée au complexe de transcription inverse (RTC) (Fassati and Goff 1999; Fassati and Goff 2001). Dans tous les cas, le RTC contient au moins les protéines IN et RT et pour le VIH, il y a aussi les protéines Vpr, MA et NC (Bukrinsky *et al.* 1993; Nermut and Fassati 2003).

Le produit final après transcription inverse est un ADN double brin qui est pris en charge par le complexe de pré-intégration (CPI) pour traverser activement la membrane nucléaire. Les protéines MA, IN et Vpr qui possèdent un signal de localisation nucléaire (Bukrinsky *et al.* 1993; Miller *et al.* 1997), ont été proposées comme étant impliquées dans l'import nucléaire mais des résultats contraires ont également été présentés (Popov *et al.* 1998; Reil *et al.* 1998; Dvorin *et al.* 2002; Yamashita and Emerman 2005). Des études réalisées avec des virus chimériques VIH-1/MLV ont suggéré que la protéine CA joue un rôle dans l'entrée nucléaire (Yamashita and Emerman 2004). Schaller *et al*. ont mis en évidence l'interaction de la protéine CA avec Nup358, une protéine du pore nucléaire (Schaller *et al.* 2011).

Les vecteurs dérivés des lentivirus comme le VIH-1 sont donc capables de transduire des cellules qui ne sont pas en cours de division, mais présentant tout de même un certain niveau d'activation leur permettant de ne pas être dans la phase G0 du cycle cellulaire (Case

et al. 1999; Sutton *et al.* 1999). Après entrée dans le noyau, l'ADN proviral est intégré, par l'activité catalytique de l'intégrase, dans l'ADN génomique de la cellule hôte.

Les protéines Tat et Rev sont nécessaires à la réplication du virus. La protéine Tat active le promoteur du LTR (long-terminal repeat) du VIH et la protéine Rev interagit avec une région de l'ARN appelée « Rev response element » (RRE) pour promouvoir l'export nucléaire de l'ARN viral (Brenner and Malech 2003).

La phase tardive du cycle consistant à produire de nouvelles particules virales infectieuses à partir de l'ADN proviral intégré ne sera pas traité dans ce manuscrit (pour revue, voir (Turner and Summers 1999)) (Engelman and Cherepanov 2012) (Figure 9).

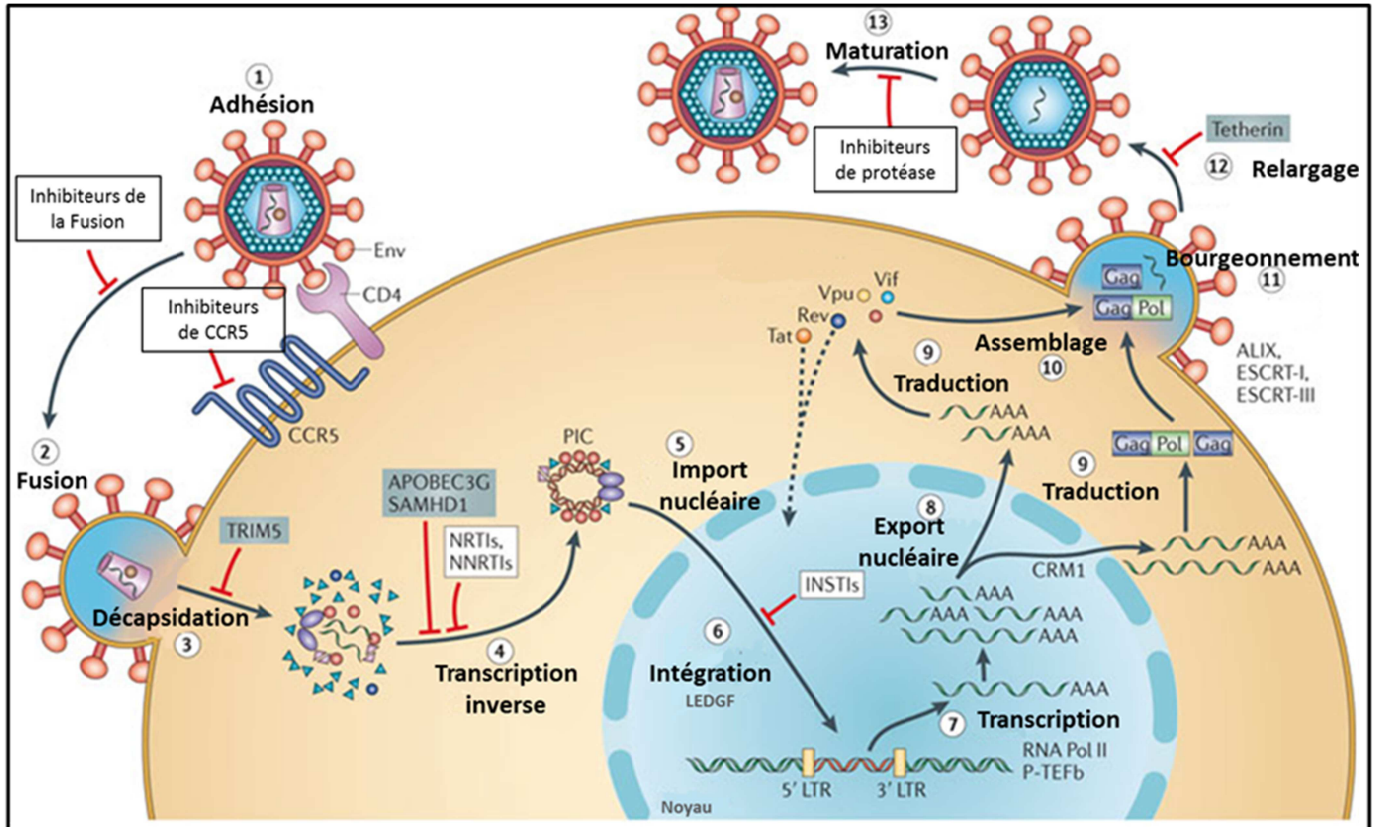


Figure 9 : Cycle de réplication du VIH-1. Adhésion de la glycoprotéine d'enveloppe (Env) à son récepteur CD4 ey à son co-récepteur CCR5(étape 1). Fusion des membranes virales et cellulaires et entrée de la particule virale dans le cellule (étape 2). Décapsidation (étape 3) et transcription inverse (étape 4) puis formation du comlexe de pré-intégration (PIC). Import nucléaire (étape 5), l'intégration du provirus est réalisée par l'intégrase associée au PIC et par LEGDF (lens epithelium-derived growth factor) (étape6). Transcription de l'ADN provirale (étape 7) par l'ARN polymérase II (RNA pol II) et le P-TEFb (positive transcription elongation factor b) réalise la transcription d'ARNm viraux de différentes tailles puis ils sont exportés (étape 8). Traduction des ARNm (étape 9). L'ARN provirale et les protéines Gag et Gag/pol sont incorporés dans les virions (étape 10). Les étapes de bourgeonnement (étape 11) et relargage (étapes 12) des particules virales sont réalisées par les complexes ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) et ALIX. Maturation des virions (étape 13).Dans les encadrés blancs sont indiqués les inhibiteurs cliniques et dans les encadrés bleus sont indiqués les facteurs de restrictions cellulaires, INSTI,integrasestrand transfer inhibitor; LTR, long terminal repeat; NNRTI,non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor,(D'après Engelman et Cherepanov, 2012)

II.B.4- Production de vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1

II.B.4.1- Historique

Les LV sont maintenant couramment utilisés en recherche expérimentale. La preuve de concept a été apportée dans les modèles animaux, montrant que les LV peuvent traiter diverses maladies (Levasseur *et al.* 2003; Biffi *et al.* 2004; Marangoni *et al.* 2009; Nature 2009). Les LV ont atteint les essais cliniques dans de nombreuses approches de thérapie génique. Les procédés de production ont également été optimisés pour réduire l'immunogénicité des vecteurs en limitant au maximum la présence d'impuretés générées pendant la production (composition du milieu de culture, composants cellulaires et viraux) tout en réduisant au maximum les coûts et en restant compatible avec une production à grande échelle selon les Bonnes Pratiques de Fabrications (BPF). Selon leur technologie de production, les vecteurs sont dits de 1ère, de 2nde ou de 3ème génération en fonction des séquences du génome lentiviral dérivé du VIH-1 utilisées dans les plasmides (Brandt et al. 2007) (Figure 10). La construction initialement utilisée pour la production de vecteurs lentiviraux, appelée cassette d'expression de 1ère génération, contenait tous les gènes codant pour les protéines accessoires du VIH-1 (Naldini *et al.* 1996). Cette première génération de vecteurs lentiviraux, très proche du VIH, a subi des modifications génétiques afin d'améliorer sa biosécurité et ses performances. Ces améliorations ont consisté à limiter les séquences homologues dans le but d'éviter la production spontanée de vecteurs lentiviraux réplicatifs (replication-competent LV = RCL) et à éliminer les gènes accessoires tels que *vif*, *vpr*, *vpu* et *nef* (Vigna and Naldini 2000; Pacchia *et al.* 2001). Ces vecteurs lentiviraux de 2nde génération sont produits à partir de trois plasmides, un plasmide codant pour les protéines *gag-pol*, *rev* et *tat*, un autre plasmide codant la protéine d'enveloppe et un troisième plasmide contenant la séquence du transgène d'intérêt. Ce dernier est appelé le plasmide de transfert.

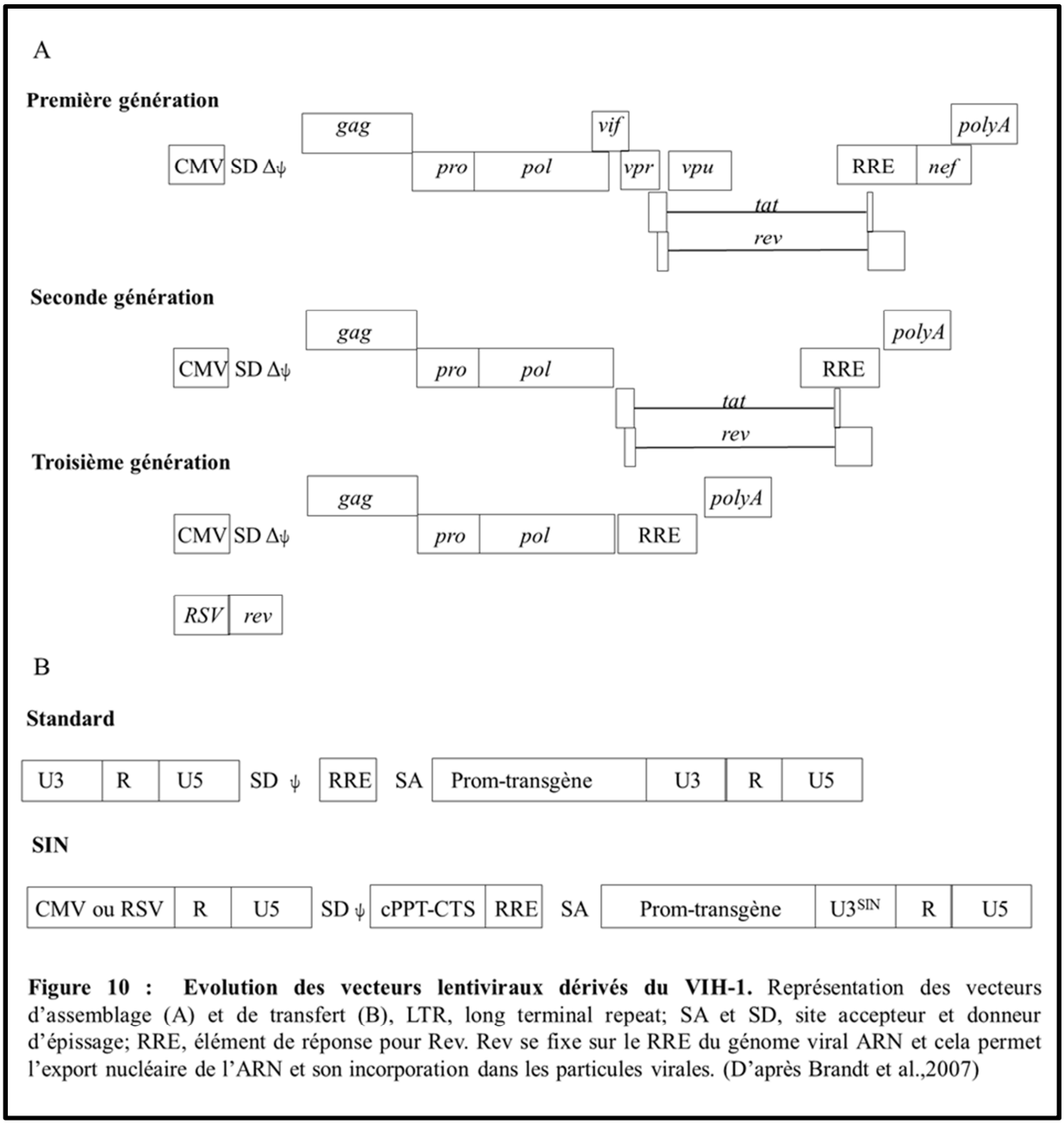


Figure 10 : Evolution des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1. Représentation des vecteurs d'assemblage (A) et de transfert (B), LTR, long terminal repeat; SA et SD, site accepteur et donneur d'épissage; RRE, élément de réponse pour Rev. Rev se fixe sur le RRE du génome viral ARN et cela permet l'export nucléaire de l'ARN et son incorporation dans les particules virales. (D'après Brandt et al.,2007)

II.B.4.2- Vecteurs lentiviraux de 3ème génération

Ces dernières années, de grandes avancées ont été faites au point de vue de la conception des vecteurs, des systèmes de production virale et des méthodes de purification virale avec un double objectif d'améliorer le titre des productions virales contenant des vecteurs d'une parfaite innocuité (non-pathogènes, non-cytotoxiques, non réplicatifs) et de permettre une transduction efficace. Les vecteurs lentiviraux ont évolué avec les constructions de 3ème génération avec l'absence du gène exprimant *Tat* et en séparant dans deux constructions différentes les gènes *Gag/Pol* et *Rev* (Dull *et al.* 1998). Ces constructions ont une configuration SIN pour « self-inactivating » car les séquences homologues de l'enhancer/promoteur dans la région U3 du LTR en 3' ont été éliminées (Zufferey *et al.* 1998). La délétion est répercutée également au LTR en 5' pendant la transcription inverse. Ces séquences sont essentielles pour la transcription et la réplication (Berkhout and Jeang 1992). La transcription du provirus étant inactivée *in vivo* et *in vitro* (Miyoshi *et al.* 1998), la transcription du transgène d'intérêt repose alors sur son promoteur interne. Ainsi, le gène d'intérêt est sous le contrôle d'un promoteur interne qui peut être le promoteur endogène pour permettre une expression et une régulation plus physiologique du transgène et diminuant le risque de mutation liée à l'intégration (Zychlinski *et al.* 2008). De plus, l'absence de promoteur et d'enhancer viral diminue le risque d'activer un oncogène se trouvant à proximité du site d'intégration.

La conception d'un vecteur lentiviral sûr et efficace passe 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. La séquence centrale PPT (cPPT) se trouvant dans la séquence codante du gène Pol du VIH-1 (Follenzi *et al.* 2000; Zennou *et al.* 2000) a été insérée dans les vecteurs lentiviraux car elle permet un transfert de gène plus efficace de l'ordre de 5 à 10 fois dans différents types cellulaires (Riviere *et al.* 2010). L'élément de contrôle post-transcriptionnel PCE (post-transcriptional element) agit avec le promoteur/enhancer du cytomégalovirus (CMV) sur l'augmentation de l'expression du transgène (Yilmaz *et al.* 2006). Il a également été montré que l'élément de régulation du virus de l'hépatite de la marmotte (WPRE : woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element) augmente l'expression du transgène (Dupuy *et al.* 2005; Real *et al.* 2011) et augmente de 7 à 15 fois le titre des productions virales par transfection transitoire dans les cellules 293T et dans les lignées cellulaires stables en comparaison avec les constructions sans WPRE (Schambach *et al.* 2006; Higashimoto *et al.* 2007). Le remplacement du signal de

*poly*adénylation (*poly*A) dans la région 3'LTR U5 par la séquence de *poly*A de l'hormone de croissance bovine augmente l'efficacité des vecteurs SIN (Real *et al.* 2011). Les insulateurs chromatiniens peuvent aider au maintien de l'expression à long terme en supprimant l'inhibition de l'expression du transgène (Hanawa *et al.* 2009). Il a été montré que l'insertion de copies multimériques de l'élément de transport constitutif (CTE) est capable de remplacer le RRE pour exporter l'ARN du noyau vers le cytoplasme et produire des titres équivalents. Pour la production de vecteurs, l'utilisation des CTE représente une alternative potentielle à l'utilisation du gène *rev* dont l'expression est cytotoxique (Oh *et al.* 2007).

Au fil du temps, le développement des vecteurs recombinants basés sur le VIH-1 a permis de produire des vecteurs de transfert de gènes plus sûrs et non réplicatifs. En restreignant l'utilisation de gènes viraux, en diminuant le risque de recombinaison par la séparation des gènes viraux sur différents plasmides et le risque d'apparition de vecteurs réplicatifs avec le développement de constructions SIN dans lesquelles les séquences promoteur et enhancer des LTR sont délétées (Miyoshi *et al.* 1998; Zufferey *et al.* 1998).

II.B.4.3- Pseudotypage des vecteurs lentiviraux avec des glycoprotéines d'enveloppe hétérologues

Une autre modification importante apportée aux vecteurs lentiviraux est l'incorporation dans les particules virales d'une glycoprotéine d'enveloppe appartenant initialement à un autre virus. Cette modification est le « pseudotypage ». La glycoprotéine d'enveloppe choisie sera la clé pour une transduction spécifique des cellules ou du tissu d'intérêt, c'est ce qui est appelé le tropisme. Dans le système nerveux central, il a été montré que l'enveloppe du virus avait un rôle non seulement sur le tropisme mais également sur la circulation des LV.(Mazarakis *et al.* 2001; Wong *et al.* 2004; Azzouz 2006; Kato *et al.* 2011). Le choix du pseudotype est donc important afin d'obtenir une adhésion et une fusion spécifique des vecteurs avec les cellules d'intérêt.

II.B.4.3.1- Les glycoprotéines d'enveloppe et leur tropisme

Il existe une large variété de glycoprotéines (GP) d'enveloppe virale (ex. la glycoprotéine d'enveloppe du VSV, du virus de la rage, du MLV amphotrope, du virus Ebola, du virus Mokola, du baculovirus, du virus de la rougeole, etc…) et aussi des GP d'enveloppe virale modifiées, pour pseudotyper les vecteurs lentiviraux (tableau 4).

Tableau 4 : Liste des glycoprotéines d'enveloppe pour pseudotyper des LV dérivés du VIH-1

Les GP d'enveloppe virale			
Famille	Genre	Espèce	Références
Rhabdoviridae	Vesiculovirus	Vesicular stomatitis virus (Indianavirus)	(Akkina *et al.* 1996; Naldini *et al.* 1996; Reiser *et al.* 1996)
	Lyssavirus	Rabies virus	(Mochizuki *et al.* 1998)
		Mokola virus	(Mochizuki *et al.* 1998)
Arenaviridae	Arenavirus	Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)	(Christodoulopoulos and Cannon 2001; Beyer *et al.* 2002; Sandrin *et al.* 2002; Stein *et al.* 2005)
Togaviridae	Alphavirus	Ross River virus (RRV)	(Kahl *et al.* 2004)
		Sindbis virus	(Morizono *et al.* 2001)
		Semliki Forest virus (SFV)	(Strang *et al.* 2005)
		Venezuelan equine encephalitis virus	(Kolokoltsov *et al.* 2005)
		Western equine encephalitis virus	(Poluri *et al.* 2008)
Filoviridae	Filovirus	Ebola virus Reston	(Kobinger *et al.* 2001)
		Ebola virus Zaire	(Kobinger *et al.* 2001)
		Lassa virus	(Marzi *et al.* 2004)
Retroviridae	Alpharetrovirus	Avian leukosis virus (ALV)	(Lewis *et al.* 2001)
	Betaretrovirus	Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV)	(Liu *et al.* 2004)
	Gammaretrovirus	Moloney Murine leukemia virus (MLV)	(Reiser *et al.* 1996)
		Modified Gibbon ape leukemia virus (GALVTR)	(Christodoulopoulos and Cannon 2001)
		Modified Feline endogenous retrovirus	(Hanawa *et al.* 2002; Sandrin *et al.* 2002)

		(RD114TR)	
	Deltaretrovirus	Human T-lymphotropic virus (HTLV-1)	(Landau *et al.* 1991)
	Spumavirus	Human foamy virus	(Mochizuki *et al.* 1998)
	Lentivirus	Maedi-visna virus (MVV)	(Zeilfelder and Bosch 2001)
Coronaviridae	Coronavirus	SaRS-CoV	(Hofmann *et al.* 2004)
Paramyxoviridae	Respirovirus	Sendai virus	(Kowolik and Yee 2002)
		Respiratory syncytia virus (RSV)	(Kobinger *et al.* 2001)
		Human parainfluenza virus type 3	(Jung *et al.* 2004)
	Henipavirus	Nipah virus	(Palomares *et al.* 2013)
	Morbillivirus	Measles virus (virus de la rougeole)	(Funke *et al.* 2009)
	Pas de genre assigné	Tupaia virus	(Enkirch *et al.* 2013)
Flaviridae	Hepacivirus	Hepatitis C virus (HCV)	(Bartosch *et al.* 2003; Hsu *et al.* 2003)
Orthomyxoviridae	Influenzavirus A	Influenza virus	(Kobinger *et al.* 2001; Sandrin *et al.* 2002)
Baculoviridae	Nucleopolyhadrovirus	Autographa californica multiple nucleopolyhedro virus (AcMNPV)	(Kumar *et al.* 2003)

Les GP d'enveloppe virale modifiées	
Nom de l'enveloppe	**Références**
Measles-scFvs (single chain antibodies)	(Gennari *et al.* 2009; Anliker *et al.* 2010)
Les glycoprotéines du virus de la rougeole (Measles) tronquées de leur queue cytoplasmiques	(Frecha *et al.* 2008; Funke *et al.* 2008; Frecha *et al.* 2009)
DARPins	(Munch *et al.* 2011)

Parmi les glycoprotéines dérivées des γ-rétrovirus, il y a les GP dérivée du MLV ectopique (Landau *et al.* 1991; Reiser *et al.* 1996), du 4070A MLV amphotropique (Reiser *et al.* 1996), du 10A1 MLV (Stitz *et al.* 2000; Christodoulopoulos and Cannon 2001), NZB MLV xénotropique et celle du mink cell focus-forming virus polytropique (Christodoulopoulos and Cannon 2001).

Les LV portant la glycoprotéine du filovirus, Ebola virus Zaire, augmente le niveau de transduction des cellules du poumon chez la souris (Medina *et al.* 2003) tandis que les LV portant la glycoprotéine GP64 du baculovirus ou E1 et E2 du virus de l'hépatite C cibleront préférentiellement les cellules hépatiques (Bartosch *et al.* 2003; Kang *et al.* 2005).

Les vecteurs lentiviraux pseudotypés avec la glycoprotéine du virus de la rage (RV) ou une glycoprotéine de fusion RV/VSV, sont capables, après injection en périphérie, de réaliser un transport rétrograde axonale et d'atteindre le système nerveux central (Mazarakis *et al.* 2001; Wong *et al.* 2004; Azzouz 2006; Kato *et al.* 2011).

Les vecteurs lentiviraux pseudotypés avec les glycoprotéines H et F du Measles virus (MV) Edmondson permettent de transduire efficacement les cellules T exprimant à leur surface les récepteurs SLAM (signaling lymphocytic activation molecule receptor) et CD46 (Frecha *et al.* 2008; Zhou *et al.* 2011; Frecha *et al.* 2012; Kneissl *et al.* 2012).

D'autres glycoprotéines ont aussi été dérivées du virus leucémogène du gibbon (« gibbon ape leukemia virus » : GALV) (Stitz *et al.* 2000; Christodoulopoulos and Cannon 2001) et la glycoprotéine RD114 du rétrovirus félin endogène (Hanawa *et al.* 2002; Sandrin *et al.* 2002; van der Loo *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2004). Ces deux GP ont un ciblage hématopoïétique. La glycoprotéine d'enveloppe GALV présente un tropisme hématopoïétique fort puisque la plupart des cellules hématopoïétiques expriment la protéine Glvr1 (ou Pit-1), le récepteur cellulaire de GALV(Kavanaugh and Kabat 1996; Sabatino *et al.* 1997).

II.B.4.3.1.1- Utilisation des GP modifiées GALVTR et RD114TR pour pseudotyper les vecteurs lentiviraux

Dans le cadre d'études concernant les vecteurs dérivés du virus de l'immunodéficience simienne (VIS), l'utilisation de pseudotypes portant une GP chimérique avec les domaines extracellulaire et transmembranaire de GALV ou RD114 fusionnés à la queue cytoplasmique de la GP du MLV 4070A permet une augmentation de l'efficacité de transduction des lymphocytes T primaires humains et de macaque ainsi que des cellules CD34+. Il a été montré que les modifications des queues cytoplasmiques affectent la circulation intracellulaire et l'assemblage des GP sur les virions (Christodoulopoulos and Cannon 2001; Sandrin *et al.* 2002) Les GP GALV et RD114 modifiées sont appelées GALVTR et RD114TR respectivement. Aussi, une meilleure efficacité de transduction des cellules souches mésenchymateuses (CSM) et de meilleurs titres de production virales ont été obtenus avec des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1 pseudotypés avec la GP RD114TR en comparaison avec des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1 pseudotypés avec la GP RD114 non modifiée (Zhang *et al.* 2004). Pour transduire les cellules CD34+ isolées de sang de cordon, des

résultats ont montré que les LV pseudotypés avec les glycoprotéines d'enveloppe RD114TR et MLV-A étaient plus efficace que les pseudotypes VSV-G. (Hanawa *et al.* 2002). Chez des souris immunodéficientes, il a été montré une meilleure efficacité de reconstitution hématopoïétique à partir de cellules CD34+ humaines, obtenues à partir de sang périphérique après mobilisation par des cytokines, transduites avec des vecteurs MLV-A-LV en comparaison avec des cellules ayant été transduites avec des vecteurs VSV-G-LV.

Pour la transduction de lymphocytes T primaires humains préactivés, une étude a montré que les vecteurs rétroviraux dérivés du MLV pseudotypés avec la GP MLV 10A-1 et GALV étaient plus efficaces que ceux pseudotypés avec les GP MLV, RD114 et VSV-G. Tandis que les LV pseudotypés avec ces mêmes GP transduisent les lymphocytes T primaires humains préactivés avec une efficacité comparable (Muhlebach *et al.* 2003).

II.B.4.3.1.2- Utilisation de la VSV-G pour pseudotyper les vecteurs lentiviraux

La glycoprotéine VSV-G est la plus largement utilisée pour pseudotyper les LV. Elle permet une transduction efficace *ex vivo* des CSH exprimant le marqueur CD34 et la transduction *in vivo* des cellules du système nerveux central, du muscle et du foie (voir(Matrai *et al.* 2010)pour revue). Les vecteurs VSV-G-LV sont utilisés pour la première fois dans un essai clinique en 2002 (voir (Sinn *et al.* 2005) pour revue). Ils sont plus stables et donc plus faciles à purifier dans les contraintes BPF (Lu *et al.* 2004; Manilla *et al.* 2005).

II.B.5- Techniques de production et de titration des vecteurs lentiviraux

II.B.5.1 Techniques de production des vecteurs lentiviraux

II.B.5.1.1 Les lignées cellulaires utilisées pour la production des vecteurs lentiviraux

Les cellules de reins embryonnaires humains (human embryonic kidney) HEK293T (ou 293T) sont principalement utilisées pour produire des vecteurs lentiviraux et des vecteurs rétroviraux (Kutner *et al.* 2009b). Cette lignée cellulaire devenue une référence est facilement transfectable avec une efficacité de l'ordre de 70-90%. Ces cellules ont été modifiées pour exprimer stablement l'antigène T de virus simien 40 (SV40) (Rio *et al.* 1985; DuBridge *et al.* 1987). Dans les mêmes conditions de culture, les cellules 293T ont une croissance plus rapide et permettent de produire 4 fois plus de vecteurs que les cellules HEK293 n'exprimant pas l'antigène T (Van Craenenbroeck *et al.* 2000). Il a également été montré que l'utilisation des cellules 293T permet une augmentation du titre de production des LV de 10 fois en comparaison avec le titre obtenu lors de l'utilisation de la lignée productrice HEK293 (Gama-Norton *et al.* 2011). De plus, les cellules 293T peuvent facilement s'adapter à la culture en suspension dans un milieu sans sérum (Van Craenenbroeck *et al.* 2000; Segura *et al.* 2007; Ansorge *et al.* 2009) ce qui permet de les utiliser pour une production à grande échelle dans des bioréacteurs et de réduire le nombre de composants du milieu de culture, le nombre d'étapes et le coût des procédés de purification.

II.B.5.1.2 Production des vecteurs lentiviraux de 3éme génération par transfection transitoire

L'expression transitoire est la méthode la plus communément utilisée pour produire les LV. Elle consiste à la transfection transitoire de plasmides codants i) *gag-pol*, ii) *rev*, iii) un plasmide codant la glycoprotéine d'enveloppe et iv) un plasmide de transfert codant le transgène d'intérêt avec en *cis* les séquences minimales qui sont requises pour la production, la prise en charge et l'encapsidation de l'ARN viral (Pluta and Kacprzak 2009). La transfection transitoire est un procédé plus rapide et plus simple que l'établissement de lignées stables et elle permet de faire exprimer un transgène cytotoxique (Diaz *et al.* 2000).

De grandes améliorations ont récemment été décrites pour produire des LV par transfection transitoire (Ansorge *et al.* 2009; Kutner *et al.* 2009a; Segura *et al.* 2010; Lesch *et*

al. 2011; Merten *et al.* 2011; Witting *et al.* 2012). Certaines de ces études décrivent des systèmes de production transposable à grande échelle pouvant générer plus de 10^{11} particules lentivirales par lot, ce qui permet la mise en place d'essais cliniques. Ces améliorations sont pour la plupart une combinaison de paramètres comme le type cellulaire, le milieu de culture, les additifs de culture, la technique de culture cellulaire et l'agent transfectant d'ADN plasmidique. Par exemple, Kuroda *et al.* ont décrit un protocole de production basé sur la culture de cellules adhérentes avec une transfection au PEI (Kuroda *et al.* 2011). Tiscornia *et al.* ont décrit une méthode de production lentivirale à large échelle avec des cellules adhérentes et du sérum de veau fœtal (SVF) avec une transfection classique au phosphate de calcium ($CaPO_4$) (Tiscornia *et al.* 2006). Segura *et al.* ont montré qu'il est aussi possible d'améliorer la production lentivirale dans un système de culture en suspension (Segura *et al.* 2010). Leur milieu est sans sérum et complémenté en acide pluronique (Pluronic®) et la transfection est réalisée au PEI.

La qualité de la préparation des plasmides et la taille de l'insert influence aussi l'efficacité de transfection. En effet, plus la taille de l'insert est grande, plus le titre de la production lentivirale diminue (al Yacoub *et al.* 2007) et la préparation d'ADN plasmidique utilisé pour la production lentivirale doit être exempte d'endotoxines d'origine bactérienne et être de préférence sous forme super-enroulée (Segura *et al.* 2010).

Pour la transfection transitoire, les principales difficultés rencontrées sont i) le risque de recombinaison entre les plasmides transfectés, ii) la contamination du milieu avec les plasmides qui complique le processus de purification et iii) la difficulté d'identifier des conditions optimales pour la transfection multiple qui conduit à de la variabilité entre les différents lots de production.

II.B.5.1.3- Production des vecteurs lentiviraux à partir de lignées stables

Des lignées cellulaires d'encapsidation exprimant stablement les gènes *gagpol*, *env* et *rev* ont été développées comme alternative à la transfection transitoire. Pour produire les LV, le plasmide de transfert contenant le transgène d'intérêt est transfecté dans ces cellules avec du PEI (Broussau *et al.* 2008) ou par précipitation au Ca_2PO_4 (Naldini *et al.* 1996; Cockrell *et al.* 2006). Il existe également des lignées cellulaires productrices (LCPs) qui expriment stablement tous les éléments nécessaires pour la production rétrovirale (Ghani *et al.* 2007). Elles peuvent être obtenues soit par transfection de tous les plasmides soit par infection par

des vecteurs rétroviraux précédemment produits. Ces lignées cellulaires stables peuvent produire des particules virales pendant 5 à 6 jours (Stewart *et al.* 2009; Stewart *et al.* 2011). Aussi, des constructions SIN, dans lesquelles les LTR sont régulés, ont été utilisées pour générer des LCPs stables capable de produire des LV de 3ème génération avec un titre supérieur à 10^7 TU/mL (Stewart *et al.* 2009; Throm *et al.* 2009; Stewart *et al.* 2011; Lee *et al.* 2012)**.** Greene MR *et al*. ont décrit une lignée productrice stable de SIN-LV pour la maladie SCID-X1 capable de produire ce vecteurs à large échelle (280 litres) avec un titre de l'ordre de 7,2x10(8) tu/mL après concentration (Greene *et al.* 2012). Récemment, une nouvelle LCP, appelée RD2-MolPack-Chim3, a été mise au point pour la production de vecteurs RD114TR-LV. Il a été montré que ces vecteurs ont permis de transduire des CSH avec la même efficacité que des vecteurs VSV-G-LV produits par transfection transitoire mais avec une dose de vecteur 100 fois inférieure (Stornaiuolo *et al.* 2013).

II.B.5.1.4- Purification et concentration des vecteurs lentiviraux

D'un point de vue pratique, les vecteurs VSV-G-LV sont résistants à la congélation-décongélation et suffisamment stables pour supporter les contraintes exercées par de nombreuses méthodes de purification ou de concentration (Kutner *et al.* 2009b). Ils peuvent donc être produits selon des conditions BPF. De grandes quantités de vecteur sont généralement nécessaires pour une transduction efficace des cellules primaires (Haas *et al.* 2000). Des procédés de concentration ont donc été développés pour concentrer et purifier les vecteurs et ainsi éliminer les impuretés présentes dans les surnageants bruts lors de la récolte. Ces impuretés proviennent du produit lui-même (*ex.* : vecteurs inactifs, agrégats viraux, protéines d'enveloppe solubles) et de contaminants provenant des techniques de production/concentration elles-mêmes (*ex.* : sérum, débris cellulaires, ADN plasmidique, nucléases). La méthode de concentration virale la plus utilisée en recherche est l'ultracentrifugation. Cependant, cette méthode concentre non seulement les vecteurs d'intérêt mais aussi des impuretés, qui peuvent être toxiques pour les cellules primaires et peuvent générer des réactions inflammatoires *in vivo* (Selvaggi *et al.* 1997; Reiser 2000; Tuschong *et al.* 2002; Baekelandt *et al.* 2003). La purification se fait généralement par deux stratégies distinctes de sélection des particules, l'une basée sur la taille et l'autre basée sur la charge des particules virales. (Voir revues pour les γ-RV) (Andreadis *et al.* 1999; Rodrigues *et al.* 2007; Schweizer and Merten 2010) et pour les LV(Segura *et al.* 2006; Schweizer and Merten

2010)). Pour les applications cliniques des LV, des procédés de production et de concentration à large échelle existent et mettent en jeu jusqu'à 6 étapes pour atteindre les niveaux de pureté et de qualité désirées. (Pour revue (Segura *et al.* 2006; Schweizer and Merten 2010)). A titre d'exemple, Merten *et al.* ont décrit une méthode de production et de purification large échelle, pour le vecteur lentiviral codant pour le gène WAS (Merten *et al.* 2011). Ce vecteur n'affecte pas la viabilité, la croissance et la capacité de différentiation des CSH de sang de cordon exprimant le marqueur CD34+ (Merten *et al.* 2011).

II.B.5.2 Techniques de titration des vecteurs lentiviraux

II.B.5.2.1 Méthode de titration des vecteurs lentiviraux en particules physiques

Le nombre de particules virales peut-être déterminé par PCR (polymerase chain reaction) quantitative en temps réel en se basant sur l'ARN présent dans les virions après avoir réalisé une transcription inverse pour obtenir les ADNc (Scherr *et al.* 2001). La titration virale basée sur l'ARN est indépendante des séquences du promoteur et du transgène puisque les sondes d'amplification sont spécifiques de séquences communes à toutes les constructions comme la séquence ψ, elle est donc applicable dans tous les cas. Les titrations basées sur l'ARN des particules virales sont particulièrement utiles pour comparer des lots de vecteurs pseudotypés avec des glycoprotéines d'enveloppes différentes.

Une autre méthode de titration physique consiste à mesurer la protéine p24 de la capside du VIH-1 par ELISA (Logan *et al.* 2004). Aussi, il a été montré que la méthode précédente est plus fiable que la titration basée sur la mesure des p24 par ELISA (Ricks *et al.* 2008)

Cependant, les méthodes de titration décrites ci-dessus, basées sur l'ARN des vecteurs ou sur les protéines p24, ne reflètent pas le titre de vecteurs infectieux et donc fonctionnels.

II.B.5.2.2 Méthode de titration des vecteurs lentiviraux en particules infectieuses

Pour les vecteurs contenant un gène rapporteur, il est possible de déterminer le titre d'une production lentivirale en se basant sur l'expression de ce gène rapporteur, par exemple les vecteurs contenant le gène codant la protéine verte fluorescente GFP (green fluorescent protein) ou codant une protéine détectable par immunomarquage. Il est alors possible de déterminer le titre viral en fonction de l'expression du gène rapporteur après l'analyse des pourcentages de cellules exprimant le gène rapporteur acquis par cytométrie de flux (Kutner *et al.* 2009b)

Comme cette technique requiert l'utilisation d'une lignée cellulaire, une grande attention doit aussi être portée au choix de celle-ci. En effet, le nombre de récepteurs d'une glycoprotéine d'enveloppe donnée, présents à la surface des cellules peut varier d'une lignée cellulaire à une autre. En général, pour éviter de sous-estimé un titre infectieux, des lignées cellulaires considérées comme permissives telles que les HCT116 sont choisies plutôt que les cellules primaires cibles du virus. Aussi, les résultats obtenus *in vitro* avec une lignée cellulaire ou un type de cellules ne sont pas toujours le reflet des résultats obtenus *in vivo* où le vecteur peut être neutralisé par des facteurs comme le complément (DePolo *et al.* 2000; Kutner *et al.* 2009b).

II.C- Autres vecteurs rétroviraux et lentiviraux de transfert de gène

Des vecteurs viraux ont aussi été développés à partir des spumavirus. Avec un génome de 13kb, ce sont les plus gros rétrovirus avec une capacité de 9,2 kb pour la taille du transgène (Mergia and Heinkelein 2003; Trobridge 2009; Erlwein and McClure 2010). Les spumavirus infectent les cellules, qu'elles soient en division ou non (Mergia and Heinkelein 2003; Trobridge 2009). La transcription inverse de leur génome est réalisée principalement dans les cellules productrices plutôt que dans les cellules cibles (Yu *et al.* 1996; Moebes *et al.* 1997; Yu *et al.* 1999) et l'intégration semble être complètement aléatoire dans le génome de la cellule hôte (Trobridge 2009). Des essais cliniques chez l'homme utilisant les spumavirus n'ont pas encore été initiés mais des études pré-cliniques de thérapie génique ont montré leur potentiel thérapeutique dans les cellules souches hématopoïétiques dans le modèle murin de l'anémie de Fanconi (Si *et al.* 2008) et aussi dans le modèle canin du déficit de l'adhésion leucocytaire (Bauer *et al.* 2008). Des vecteurs de thérapie génique ont également été dérivés

de lentivirus non humains tels que les virus de l'immunodéficience simienne (VIS), équine (EIAV), féline (FIV) et bovine (BIV). Il a été montré *in vitro* et *in vivo* que ces vecteurs transduisent efficacement les cellules qui se divisent et qui ne se divisent pas (Olsen 1998; Johnston *et al.* 1999; Nakajima *et al.* 2000; Berkowitz *et al.* 2001).

III- Les essais cliniques mettant en jeu des vecteurs rétroviraux/lentiviraux

III.A- Les essais cliniques

III.A.1- La thérapie génique hématopoïétique

III.A.1.1- Les cellules souches hématopoïétiques humaines et la thérapie génique

Les cellules souches hématopoïétiques sont capables d'autorenouvellement *in vivo* et sont à l'origine des cellules sanguines différenciées. L'hématopoïèse est régulée par un microenvironnement hématopoïétique complexe au sein de la moelle osseuse. Cette niche hématopoïétique est composée de cellules endothéliales, de fibroblastes, de macrophages et de protéines de la matrice extracellulaire (Yoder and Williams 1995). La thérapie génique avec des CSH autologues est une alternative à la greffe de CSH allogéniques (Malech *et al.* 1997; Ott *et al.* 2006; Hacein-Bey-Abina *et al.* 2008; Howe *et al.* 2008; Aiuti *et al.* 2009; Boztug *et al.* 2010; Hacein-Bey-Abina *et al.* 2010; Kang *et al.* 2010; Stein *et al.* 2010; Gaspar *et al.* 2011a; Gaspar *et al.* 2011b; Kang *et al.* 2011). L'utilisation de cellules autologues évite les problèmes relatifs à la recherche d'un donneur compatible et la réaction du greffon contre l'hôte (GvHD) (Mastaglio *et al.* 2010). Les CSH humaines peuvent être isolées à partir de la moelle osseuse, du sang de cordon ou de sang périphérique mobilisé, et enrichies par immuno-affinité en utilisant des anticorps spécifiques du marqueur de surface CD34+ (Miyoshi 2004). Le transfert de gènes dans les CSH est une approche attractive pour le traitement des maladies monogéniques hématopoïétiques. En effet, la correction génétique des progéniteurs hématopoïétiques permet de reconstituer, après quelques semaines, un système immunitaire complet chez le patient. Ces quinze dernières années, une série d'essais cliniques de thérapie génique pour des maladies d'immunodéficiences primaires a été réalisée avec succès (voir (Galy and Thrasher 2011; Aiuti *et al.* 2012; Rivat *et al.* 2012) pour revue).

III.A.1.2- Exemples d'essais cliniques de thérapie génique des cellules souches hématopoïétiques

Le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) est une maladie hématopoïétique candidate pour la thérapie génique avec l'utilisation de CSH transduites avec des LV dérivés du VIH-1 (Galy *et al.* 2008). Le WAS est une immunodéficience primaire rare caractérisée par une microthrombocytopénie, des infections récurrentes, de l'eczéma et il est aussi associé à des symptômes d'auto-immunité (Ochs and Thrasher 2006). Les études précliniques ont montré l'efficacité et la sécurité du transfert de gène *ex vivo* dans des CSH autologues en utilisant un LV exprimant le gène WAS humain sous le contrôle du promoteur endogène WAS et pseudotypés avec la glycoprotéine d'enveloppe VSV-G (WAS-LV) (Dupre *et al.* 2006; Charrier *et al.* 2007; Mantovani *et al.* 2009; Marangoni *et al.* 2009; Zanta-Boussif *et al.* 2009). Ces résultats ont permis de poursuivre les études vers la clinique pour traiter des patients atteints de la forme sévère du syndrome de Wiskott Aldrich et qui n'ont pas de donneur compatible pour une transplantation allogénique de la moelle osseuse (Aiuti *et al.* 2013).

La granulomatose septique chronique (CGD : chronic granulomatous disease) est causée, dans la majorité des cas, par des mutations dans le gène *CYBB*, qui code la protéine $gp91^{phox}$ qui fait partie du complexe nicotinamide adénine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH-oxidase). Cette mutation a un impact sur l'activité antimicrobienne des neutrophiles et donc conduit à un défaut de destruction des bactéries et des champignons (voir (Rivat *et al.* 2012) pour revue). Le premier essai clinique avec des CSH a démarré aux Etats-Unis sans chimiothérapie, mais avec comme résultats une mauvaise greffe et un bénéfice clinique de courte durée pour les patients (Malech *et al.* 1997). Depuis, d'autres essais avec une chimiothérapie au préalable, sont menés dans différents pays (Ott *et al.* 2006; Bianchi *et al.* 2009; Kang *et al.* 2010; Stein *et al.* 2010; Kang *et al.* 2011; Santilli *et al.* 2011). La majorité des patients ont montré des bénéfices cliniques au moins à court terme avec une disparition d'infections antérieures, qui a été associée au rétablissement transitoire de l'activité de la NADPH-oxydase dans les neutrophiles. Dans la majorité des cas, une diminution du nombre de cellules corrigées a été observée au cours du temps, avec une faible greffe des progéniteurs. Ce phénomène peut s'expliquer par le traitement insuffisant de cytoréduction des cellules immunitaires du patient. Dans quatre patients, la présence de neutrophiles fonctionnels à plus long terme était seulement attribuable à l'apparition d'une population

clonale, conséquence d'une transactivation de gènes myéloprolifératifs (MDS et EVI1) causé par l'intégration du vecteur MLV avec LTR sauvage (voir paragraphe III.B- Les problèmes de génotoxicité liés à l'utilisation de vecteurs intégratifs) (Ott *et al.* 2006; Stein *et al.* 2010; Kang *et al.* 2011).

Après des années de recherche, l'amélioration des vecteurs basés sur les MLV a conduit à la mise en place d'essais cliniques portant sur deux formes de déficit immunitaire combiné sévère (DICS). A ce jour, plus de 30 patients atteints de DICS lié à l'X (X-DICS) ou au déficit en adénosine désaminase (ADA-DICS) ont été traités avec succès par l'utilisation de vecteurs dérivés du MLV portant respectivement le gène codant la chaine commune gamma ou l'enzyme ADA (Aiuti *et al.* 2007; Cavazzana-Calvo and Fischer 2007).

La thérapie génique réalisée par transduction lentivirale des CSH peut apporter de réels bénéfices cliniques pour des patients atteints de maladies qui ne sont pas des déficits immunitaires. C'est le cas de l'adrénoleucodystrophie (ALD), une maladie démyélinisante sévère causée par un défaut de la protéine ABCD1. Des cellules CD34+ autologues sont prélevées du patient, puis corrigées génétiquement *ex vivo* avec un vecteur VSV-G-LV codant la protéine ABCD1, et ensuite réintroduites dans les patients ayant reçu au préalable un traitement myéloablatif (Cartier *et al.* 2009). Après une période de suivi de 24 à 30 mois, une reconstitution polyclonale a été détectée avec 9-14% de granulocytes, monocytes, et lymphocytes T et B exprimant la protéine ABCD1. Ces résultats suggèrent fortement que les CSH génétiquement modifiées et réintroduites dans les patients ont été correctement greffées. Quatorze à seize mois après la greffe, la démyélinisation cérébrale a arrêté sa progression. Cette observation est comparable au bénéfice clinique obtenu après une greffe de cellules souches allogéniques (Cartier *et al.* 2009). (Tableau 5)

Tableau 5 : Exemples d'essais cliniques de thérapie génique des cellules souches hématopoïétiques mettant en jeu des vecteurs rétroviraux/lentiviraux						
Maladies	Gène muté (protéine)	Type de vecteurs	Centres	Nombre de patients	Toxicité	références
ADA-SCID	ADA (Adenosine deaminase)	γRV	Italie	18	Non	(Aiuti *et al.* 2009)
		γRV	Grande-Bretagne	8		(Gaspar *et al.* 2011b)
		γRV	Etats-Unis	14		Candotti and Kohn (personal communication)(Rivat *et al.* 2012)
		vecteurs lentiviraux SIN, promoteur EF1α	Etats-Unis/Grande-Bretagne	2		Gaspar (personal communication)(Rivat *et al.* 2012)
SCID-X1	IL2RG (chaine commune γ)	γRV	France	11	Oui, mutation insertion nelle chez 5 patients	(Thrasher *et al.* 2005; Hacein-Bey-Abina *et al.* 2008; Hacein-Bey-Abina *et al.* 2010)
		γRV	Grande-Bretagne	11		(Thrasher *et al.* 2005; Howe *et al.* 2008; Gaspar *et al.* 2011a)
		γRV	Etats-Unis	3		(Chinen *et al.* 2007)
		vecteurs lentiviraux SIN, promoteur EF1α	France, Grande-Bretagne, Etats-Unis	8		(Pai 2011)
CGD	NCF-1 ($p47^{phox}$) CYBB ($gp91^{phox}$)	γRV	Etats-Unis	5	Oui, mutation insertion nelle chez 3 patients	(Malech *et al.* 1997)
		γRV	Allemagne/Suisse	4		(Ott *et al.* 2006; Bianchi *et*

						al. 2009; Stein *et al.* 2010)
		γRV	Grande-Bretagne	4		Trasher (personal communication)(Rivat *et al.* 2012)
		γRV	Etats-Unis	3		(Kang *et al.* 2010)
		γRV	Corrée	2		(Kang *et al.* 2011)
		vecteurs lentiviraux SIN, promoteur myéloïde	Grande-Bretagne/ France/ Allemagne/ Suisse	2		(Santilli *et al.* 2011)
WAS	WASP (WASp)	γRV	Allemagne	10	Oui, mutation insertionnelle chez 1 patient	(Boztug *et al.* 2010)
		vecteurs lentiviraux SIN, promoteur WAS	Etats-Unis /Italie/France/ Grande-Bretagne	8		(Scaramuzza *et al.* 2012)
ALD	ALD (ABCD1)	vecteurs lentiviraux SIN	France	4	Non	(Cartier *et al.* 2009; Biffi *et al.* 2011)

III.B- Les problèmes de génotoxicité liés à l'utilisation de vecteurs intégratifs

L'intégration d'un vecteur est un processus qui nécessite de casser l'ADN génomique et a longtemps été considérée comme un évènement aléatoire dans le génome. L'évolution des techniques de séquençage a rendu possible l'analyse de tout le profil d'intégration rétroviral chez un patient (Wang *et al.* 2007a; Wang *et al.* 2008; Paruzynski *et al.* 2010). L'analyse des sites d'intégrations dans les patients atteints de SCID-X1, CGD et WAS, traités par thérapie génique et ayant développé une leucémie, a révélé des sites d'intégrations préférentiels, à proximité de certains gènes. Dans les patients atteints de SCID-X1 et WAS, le développement de leucémies est associé à l'intégration du vecteur dans les cellules T, à proximité du proto-oncogène *LMO-2* (LIM domain only-2) et dans les régulateurs du cycles cellulaire *BMI1* et *CCND2* (Hacein-Bey-Abina *et al.* 2008; Howe *et al.* 2008). Ces intégrations provoquent des transcriptions aberrantes et non physiologiques des proto-oncogènes causées par les éléments enhancer des LTR du vecteurs. Le processus de mutagénèse causé par l'intégration d'un vecteur n'est pas entièrement compris mais plusieurs facteurs ont été identifiés comme étant responsables d'évènements conduisant à la transformation d'une cellule. En effet, la présence d'enhancers forts dans le génome viral et les sites d'intégration préférentiels des vecteurs semblent perturber l'expression des gènes de la cellule cible. Des facteurs cellulaires peuvent aussi être impliqués (Ginn *et al.* 2010). Les vecteurs dérivés de gammarétrovirus contenant des LTR complets peuvent non seulement moduler le niveau d'expression des gènes alentours mais aussi être responsables de modifications épigénétiques qui vont éteindre l'expression du transgène thérapeutique comme observé dans des patients atteints de CGD traités par thérapie génique (Stein *et al.* 2010). Le MLV et les vecteurs dérivés du MLV s'intègrent préférentiellement au niveau des promoteurs transcriptionnellement actifs et dans les éléments de régulation (Wu *et al.* 2003; Hematti *et al.* 2004; Mitchell *et al.* 2004; Cattoglio *et al.* 2007; Cattoglio *et al.* 2010) ce qui suggèrent que leurs CPI sont attachés aux régions engagées par les composant basaux de la machinerie transcriptionnelle de l'ARN polymerase II (Felice *et al.* 2009; Cattoglio *et al.* 2010). Tandis que le VIS et le VIH-1, et leurs vecteurs lentiviraux dérivés, ciblent les gènes exprimés dans leur région codante et non codante loin des éléments de régulation (Schroder *et al.* 2002; Hematti *et al.* 2004; Mitchell *et al.* 2004; Wang *et al.* 2007a; Cattoglio *et al.* 2010). Le facteur cellulaire LEGDGF/p75 joue un rôle important dans l'attachement du CPI du VIH-1 à la chromatine active en interagissant avec l'intégrase (Engelman and Cherepanov 2008). Il a

également été montré que les interactions entre le CPI et les composants de la machinerie d'import nucléaire jouent un rôle important dans l'attachement et le ciblage de l'intégration du VIH-1 dans la chromatine (Matreyek and Engelman; Ocwieja *et al.* 2011). Les séquences « enhancers », présentes dans les LTR du MLV, jouent un rôle important dans la dérégulation de l'expression génique. Dans le but d'améliorer la biosécurité des vecteurs, les enhancers ont été supprimés des vecteurs dérivés du MLV et du VIH-1, ce sont les vecteurs SIN (voir le paragraphe II.B.4.2). Des études précliniques avec des vecteurs SIN ont montré que le risque d'apparition de tumeurs causées par une insertion est moins élevé en utilisant des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH en comparaison avec l'utilisation des vecteurs dérivés du MLV (Montini *et al.* 2006; Maruggi *et al.* 2009; Modlich *et al.* 2009; Montini *et al.* 2009). Donc les vecteurs basés sur le VIH-1 sont des outils de transfert de gènes utilisables pour de futures applications cliniques. Aussi, l'analyse du profil d'intégration des vecteurs dérivés du VIH a révélé une plus faible probabilité dans l'activation d'un oncogène par rapport aux vecteurs dérivés du MLV (Cattoglio *et al.* 2010).

L'activation transcriptionnelle des gènes n'est pas le seul évènement génotoxique que peut causer l'intégration d'un vecteur rétroviral. En effet, des études menées *in vivo* et *ex vivo* ont montré que des dérégulations post-transcriptionnelles de l'expression génique peuvent être causées par l'insertion d'un produit d'épissage rétroviral ou de signaux de polyadénylation dans des unités de transcription.(Maruggi *et al.* 2009; Cattoglio *et al.* 2010; Almarza *et al.* 2011). Comme par exemple un épissage aberrant, une fin prématurée de transcription et l'apparition de transcrits chimériques cellulaire/viral qui proviennent de lecture à partir du promoteur du vecteur (Moiani and Mavilio 2012) (Almarza *et al.* 2011). Il semble que la délétion de la région U3 dans les vecteurs lentiviraux SIN provoque une diminution des fins de transcription et par conséquent une augmentation de transcrits chimériques (Yang *et al.* 2007). Dans un essai clinique de thérapie génique pour traiter la β-thalassémie, un patient a développé une expansion clonale de progéniteurs hématopoïétiques causé par une activation post-transcriptionnelle d'un proto-oncogène HMGA2 après l'insertion d'un vecteur lentiviral (Cavazzana-Calvo *et al.* 2010). Suite aux mutations insertionnelles survenues lors de l'utilisation des vecteurs γ-RV, l'évaluation des risques liés à chaque vecteur de transfert de gène est une des préoccupations principales dans le domaine de la thérapie génique.

CHAPITRE 2

Description et étude des mécanismes d'adhésion et de fusion des rétrovirus et vecteurs rétroviraux

I- Adhésion et fusion de la particule virale avec la membrane cellulaire

I.A- Adsorption et adhésion des rétrovirus à la surface cellulaire

L'attachement d'un virus se déroule en trois étapes : 1) la diffusion des virus à proximité de la cellule ; 2) l'adhésion non-spécifique du rétrovirus sur la surface de la cellule, c'est l'adsorption ; 3) l'adhésion spécifique à son récepteur cellulaire (Davis *et al.* 2002). L'adsorption du virus à la surface de la cellule est fortement influencée par les interactions électrostatiques ce qui comprend à la fois les forces de répulsions naturelles cellules-virus et d'attraction de l'enveloppe virale avec le récepteur cellulaire, et l'état d'agrégation du virus (Davis *et al.* 2004). Les héparans sulfates (HS) sont importants pour l'infection des cellules par le VIH-1 (Patel *et al.* 1993; Roderiquez *et al.* 1995). Les HS sont des polysaccharides qui sont exprimés sur la surface cellulaire et dans la matrice extracellulaire (Esko and Lindahl 2001). Il a été montré que les HS ont un rôle dans l'adhésion (Vives *et al.* 2005) et la fusion du VIH-1 (Cladera *et al.* 2001). Plus particulièrement, pour l'étape d'adhésion du virus sur la cellule cible, le niveau d'expression de son récepteur à la surface de la cellule va fortement influencer son tropisme. Le tropisme d'un virus dépend des cellules, des tissus, des espèces animales et végétales dans lesquels il peut se répliquer. (Fields 2007; Norkin 2010). Après l'adsorption du virus à la surface cellulaire et l'adhésion à son récepteur, la fusion des membranes virales et cellulaires est déclenchée (Leckband and Israelachvili 2001).

I.B- Fusion de la membrane virale et cellulaire

L'adhésion et la fusion des virus enveloppés sont réalisées par une ou plusieurs glycoprotéines d'enveloppe à la surface du virus mature. Pour certains virus (par exemple les rétrovirus), une seule glycoprotéine à la surface du virus est nécessaire pour la fusion tandis que pour d'autres virus (par exemple les paramyxovirus et le virus de l'herpès) des protéines virales supplémentaires sont requises pour la fusion (tableau 6).

Famille	Protéines requises	Sous unités de la protéine de fusion	Classe	pH pour la fusion
Orthomyxoviridae	HA	HA1-S-S-HA2	I	faible
Retroviridae	Env	SU-S-S-TM, SU/TM	I	Neutre ou faible
Paramyxoviridae	F, HN	F2-S-S-F1	I	Neutre
Coronoviridae	S	S1/S2	I	Neutre ou faible
Filoviridae	GP	GP1-S-S-GP2	I	faible
Arenaviridae	GP, SSP	GP1/GP2/SSP	I	faible
Togaviridae	E1/E2	E1/E2	II	faible
Flaviridae	E(TBEV), E1/E2 (HCV)	E, E1/E2	II	faible
Rhabdoviridae	G	G	III	faible

Tableau 6 : Tableau des protéines de fusion de 9 familles de virus enveloppés. (D'après White et al.,2008)

La fusion des membranes est un processus permettant le rapprochement et l'union de deux membranes. Les mécanismes de fusion de la plupart des virus enveloppés sont répertoriés comme étant pH-dépendant ou pH-indépendant (White *et al.* 2008). En effet, la fusion peut avoir lieu à la surface des cellules à pH neutre ou à l'intérieur de l'endosome à pH acide doux.

Pour les fusions dépendantes du pH et quel que soit le type de récepteur, l'exposition de la protéine d'enveloppe au pH acide de l'endosome entraine la fusion. Alors que les fusions pH-indépendantes sont déclenchées de manière spécifique lorsque la protéine d'enveloppe se fixe à son récepteur cellulaire. Ainsi, le tropisme des virus enveloppés résulte de la capacité des protéines d'enveloppe à réaliser à la fois l'adhésion et la fusion (voir (Morizono and Chen 2011) pour revue).

I.C- Processus général de la formation et de l'élargissement du pore de fusion

La fusion des membranes cellulaires avec les membranes des virus enveloppés se déroule de manière très semblable (Chernomordik *et al.* 1998; Gaudin 2000; Zaitseva *et al.* 2005). De façon générale, il est accepté que le processus de fusion commence par la formation de tiges intermédiaires, ce sont des connections lipidiques locales entre les couches externes des membranes qui fusionnent (Chernomordik and Kozlov 2005). Ensuite, une expansion de la tige conduit à la formation d'une bicouche lipidique locale composée des deux couches internes, appelée diaphragme d'hémifusion transitoire (Chernomordik *et al.* 1998; Gaudin 2000). L'étape suivante passe par la formation d'un pore dans le diaphragme de fusion (Chernomordik et al. 1995)(Figure 11). Le pore initialement formé est étroit et est souvent ouvert et fermé de façon répétée, un phénomène appelé le « flickering pore ». Pour finir, l'élargissement du pore (en anglais « pore enlargement ») conduit à la fusion complète (Spruce *et al.* 1989). D'un point de vue énergétique, il a été montré que le processus de fusion est progressivement de plus en plus demandeur en énergie. Ainsi, l'hémifusion est l'étape nécessitant le moins d'énergie, la formation du pore est une étape plus énergivore et ensuite l'élargissement du pore est l'étape la plus consommatrice en énergie (Cohen and Melikyan 2004; Chernomordik and Kozlov 2005). Après les étapes d'adhésion et de fusion des membranes virales et cellulaires des virus enveloppé, le génome viral est délivré dans le cytoplasme de la cellule cible.

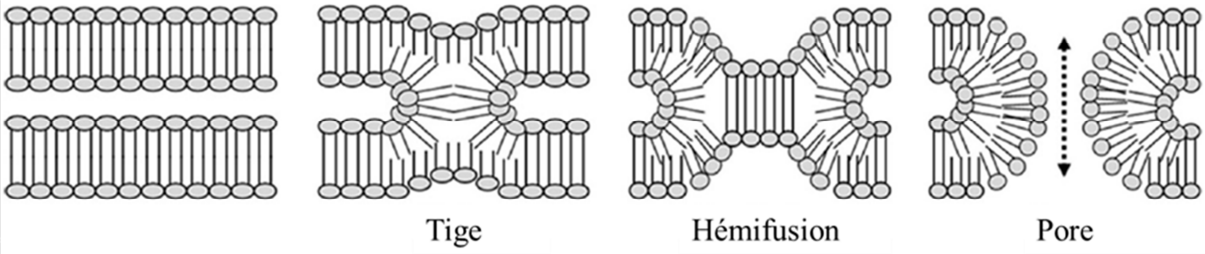


Figure 11 : Etapes de la fusion entre deux membranes. (D'après Chernomordik et al.,1995)

I.D- Les protéines de fusion virales de classe I, II et III

Dans leur conformation finale, toutes les protéines de fusion virale sont des trimères en épingles à cheveux et dans tous les cas, la structure finale se compose en N-terminal d'un faisceau d'hélices α central décoré par 3 hélices C-terminales formant ainsi une « six-helix bundle » (6HB) (Chen *et al.* 1999). Les protéines de fusion de classe I sont en trimères à l'étape pré-fusion et à l'étape post-fusion (Russell *et al.* 2004; Yin *et al.* 2005; Yin *et al.* 2006). Leurs peptides de fusion sont en N-terminal de la sous-unité de fusion (White *et al.* 2008). La protéine HA du virus de l'Influenza, la protéine F du Paramyxovirus et la gp41 du VIH-1 sont des protéines de fusion de classe I (Figure 12). Les protéines de fusion de classe II ont une structure composée de feuillets β. Au centre de ces feuillets, se trouvent des peptides de fusion internes formant des boucles (Rey *et al.* 1995; Bressanelli *et al.* 2004). Les glycoprotéines de fusion de classe II sont associées avec une protéine chaperonne : p62 pour la glycoprotéine E1 du virus de la forêt de Semliki (SFV) et prM pour celle du virus de l'encéphalite à tiques (TBEV) (White *et al.* 2008). La protéine de fusion se présente comme un dimère antiparallèle le long de la surface du virion. Ensuite, les protéines de fusion de classe II se réalignent en trimère (Ferlenghi *et al.* 2001; Gibbons *et al.* 2004; Kielian 2006). Les travaux de structure réalisés sur la VSV-G (Roche *et al.* 2006; Roche *et al.* 2007; Roche *et al.* 2008) et la gB du HSV-1 (Heldwein *et al.* 2006) ont permis l'identification d'une troisième classe de protéine de fusion qui partagent des caractéristiques avec les protéines de fusion des classes I et II. Comme les protéines de fusion de classe I, elles sont en trimères dans leur conformation « pré-fusion » et elles contiennent un faisceau d'hélices α central. Cependant, leur domaine de fusion est plus proche des protéines de classe II (Figure 13).

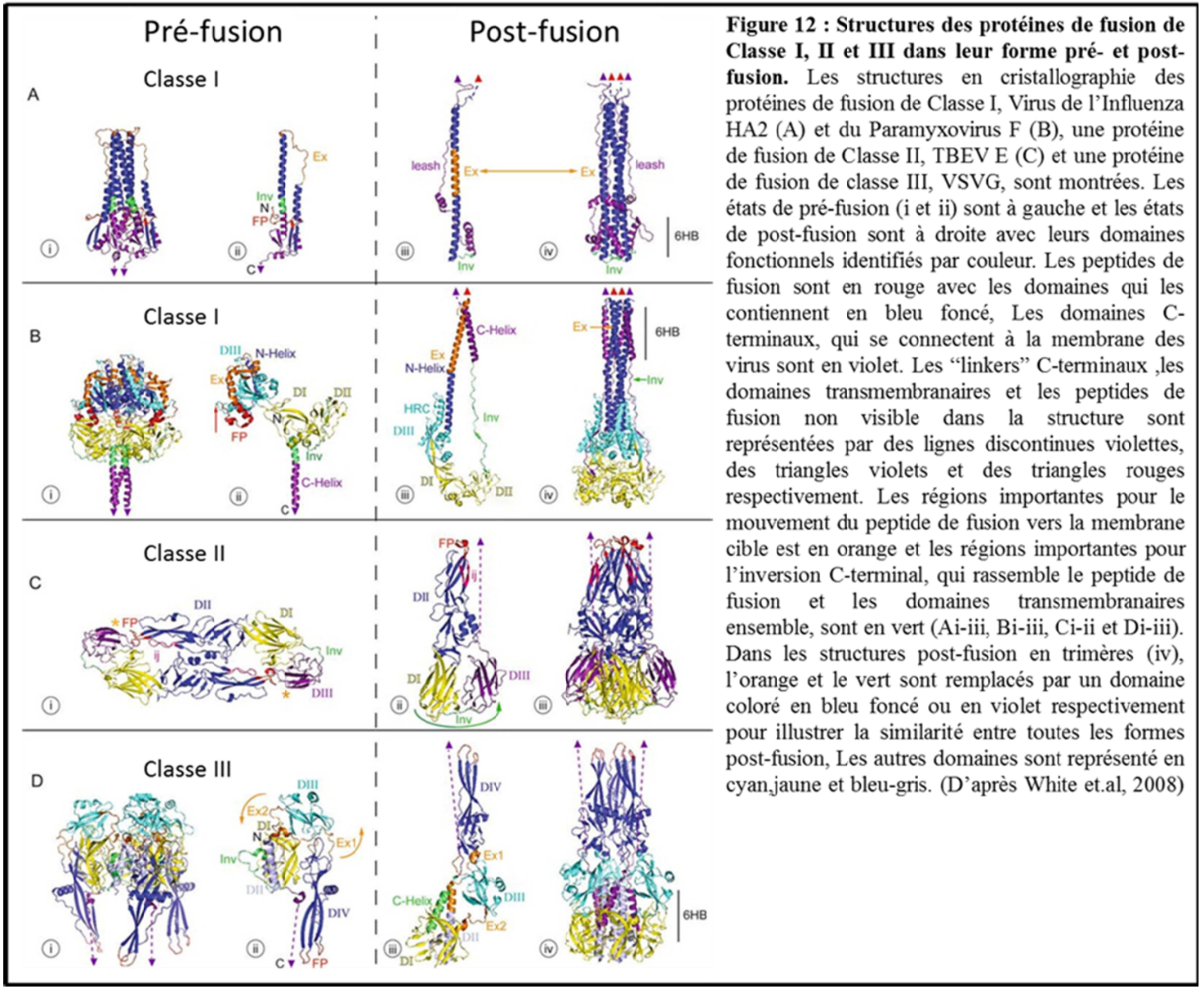


Figure 12 : Structures des protéines de fusion de Classe I, II et III dans leur forme pré- et post-fusion. Les structures en cristallographie des protéines de fusion de Classe I, Virus de l'Influenza HA2 (A) et du Paramyxovirus F (B), une protéine de fusion de Classe II, TBEV E (C) et une protéine de fusion de classe III, VSVG, sont montrées. Les états de pré-fusion (i et ii) sont à gauche et les états de post-fusion sont à droite avec leurs domaines fonctionnels identifiés par couleur. Les peptides de fusion sont en rouge avec les domaines qui les contiennent en bleu foncé, Les domaines C-terminaux, qui se connectent à la membrane des virus sont en violet. Les "linkers" C-terminaux ,les domaines transmembranaires et les peptides de fusion non visible dans la structure sont représentées par des lignes discontinues violettes, des triangles violets et des triangles rouges respectivement. Les régions importantes pour le mouvement du peptide de fusion vers la membrane cible est en orange et les régions importantes pour l'inversion C-terminal, qui rassemble le peptide de fusion et les domaines transmembranaires ensemble, sont en vert (Ai-iii, Bi-iii, Ci-ii et Di-iii). Dans les structures post-fusion en trimères (iv), l'orange et le vert sont remplacés par un domaine coloré en bleu foncé ou en violet respectivement pour illustrer la similarité entre toutes les formes post-fusion, Les autres domaines sont représenté en cyan,jaune et bleu-gris. (D'après White et.al, 2008)

I.D.1- La gp160 du VIH-1 : Généralités sur l'adhésion et la fusion

La glycoprotéine d'enveloppe précurseur du VIH-1, la gp160, est composée de deux sous-unités après clivage par la furine, la glycoprotéine de surface gp120 et la glycoprotéine transmembranaire gp41. La gp120 permet l'adhésion et la gp41 permet la fusion. Lorsque la gp120 se fixe sur son récepteur CD4, elle change de conformation, ce qui lui permet d'interagir avec ses co-récepteurs CXCR4 et/ou CCR5 (Deng *et al.* 1996; Feng *et al.* 1996). L'interaction de la gp120 avec son co-récepteur permet un changement de conformation de la gp41 qui va exposer le peptide fusogène présent à son extrémité et déclencher le processus de fusion des membranes.

I.D.2- La VSV-G : Généralités sur l'adhésion et la fusion

La VSV-G est une protéine très fusogénique qui interagit probablement avec un récepteur cellulaire lipidique, non identifié à ce jour. Bien que le rôle majeur de la phosphatidylsérine dans l'entrée du VSV a été démontré dans de nombreuses études (Schlegel *et al.* 1982; Schlegel and Wade 1983; Coll 1997; Carneiro *et al.* 2002) (Hall *et al.* 1998), l'interaction de la VSV-G avec la phosphatidylsérine contenue dans la membrane cellulaire à l'étape d'adhésion est controversée (Sinclair *et al.* 1997; Coil and Miller 2004). Néanmoins, la VSV-G est impliquée dans la reconnaissance du récepteur à la surface de la cellule hôte et ensuite, après l'endocytose, la fusion des membranes est déclenchée suite à un réarrangement structural de la glycoprotéine à pH acide. La protéine G est une protéine de fusion atypique avec un équilibre dépendant du pH, entre sa conformation « pré-fusion » et sa conformation « post-fusion » (Roche *et al.* 2006; Roche *et al.* 2007) . Les structures atomiques de ces deux conformations révèlent une homologie avec la glycoprotéine gB du virus de l'herpès ainsi qu'une combinaison entre les caractéristiques des protéines de fusion de classes I et II précédemment étudiées (Sun *et al.* 2008). La comparaison des structures pré-fusion et post-fusion de VSV-G montre une forte réorganisation de la molécule (Figure 13) qui rappelle celle de la protéine de fusion F du paramyxovirus. Cette comparaison a aussi permis d'identifier des résidus clés conservés impliqués dans des échanges moléculaires sensibles au pH (voir (Roche *et al.* 2008) pour revue)**.**

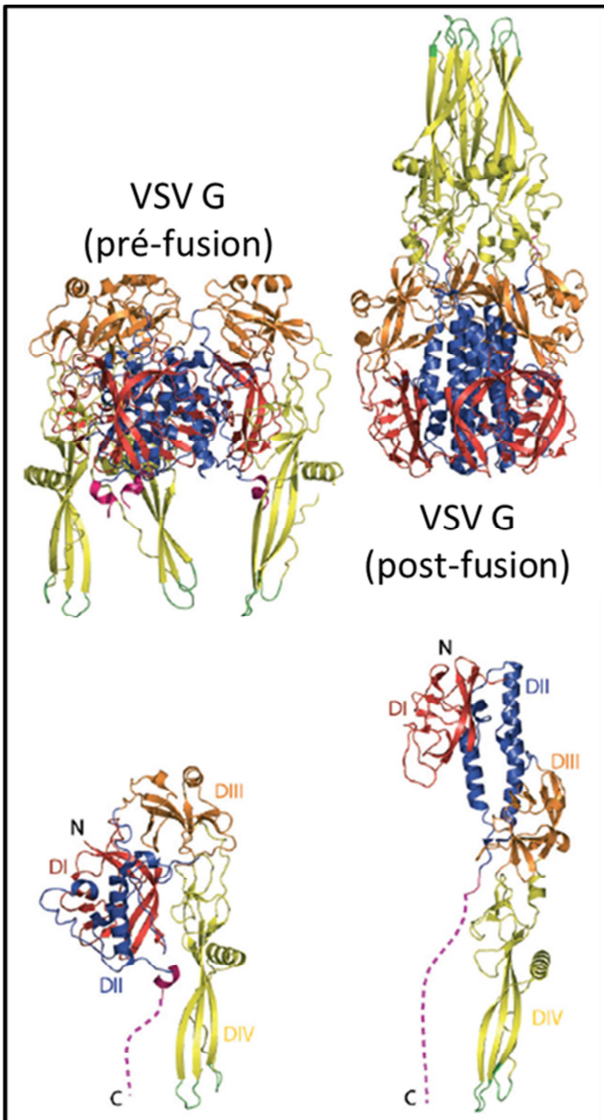


Figure 13 : Structure des formes pré- et post-fusion de la glycoprotéine G de VSV. Diagrammes Ribbon de la structure pré-fusion du trimère G (en haut à gauche; de la structure post-fusion du trimère G (en haut à droite); de la structure pré-fusion du protomère G (résidus 1-413) (en bas à gauche); et de la structure post-fusion du protomère G (résidus 1-410) (en bas à droite). La protéine G est colorée selon les domaines (domaine I en rouge, domaine II en bleu, domaine III en orange et le domaine IV en jaune) avec les boucles de fusion en vert et le C-terminal en magenta. Sur les diagrammes des protomères, les lignes en pointillés représentent le segment C-terminal manquant de l'ectodomaine qui conduit au segment transmembranaire. (D'après Roche et al.,2008)

II-Méthodes d'étude de l'étape d'adhésion et de l'étape de fusion des membranes virales et cellulaires

II.A- Etude de l'adhésion des vecteurs rétroviraux avec la cellule cible

L'étude de l'adhésion d'un vecteur avec la cellule cible est relativement simple. Deux méthodes sont principalement décrites en ce qui concerne l'étude de l'adhésion du VIH sur sa cellule cible. Les deux techniques nécessitent un temps d'incubation court variant de 20 minutes à 2 heures. La température à laquelle est réalisée l'incubation est variable de +4°C à +37°C. (Pluymers *et al.* 2000; Trumpfheller *et al.* 2003; Munch *et al.* 2007; Roan *et al.* 2009a; Roan *et al.* 2009b; Roan *et al.* 2011). Si l'internalisation du vecteur n'est pas désirée, l'incubation se fait à +4°C (Wang *et al.* 2007b; Wang *et al.* 2007c). Cette étape est suivie d'un lavage pour éliminer les vecteurs qui n'ont pas adhéré. Ensuite, deux choix sont possibles, soit un marquage spécifique de la cellule et du vecteur permettra de visualiser l'adhésion du vecteur sur la cellule par microscopie (Trumpfheller *et al.* 2003)soit les cellules sont lysées et une quantitification de la p24 par ELISA est réalisée(Pluymers *et al.* 2000).

II.B- Essai permettant l'étude de la fusion entre la membrane virale et la membrane cellulaire

II.B.1- Système cellulaire basé sur l'expression de l'enveloppe virale pour l'étude de la fusion

Une méthode alternative pour l'étude de la fusion entre les membranes virales et cellulaires consiste à mettre en culture des cellules cibles avec des cellules modifiées pour exprimer une enveloppe virale (Nussbaum *et al.* 1994) (Lineberger *et al.* 2002) et d'observer le résultat de la réaction de fusion en se servant des essais fusions basés sur les sondes lipidiques fluorescentes (Duzgunes *et al.* 1993; Duzgunes and Wilschut 1993; Hoekstra and Duzgunes 1993). Ces essais fusion « cellule/cellule » sont informatifs mais ne récapitulent pas parfaitement toutes les variables gouvernant la fusion entre les virions et leurs cellules cibles. En effet, les membranes virales et cellulaires sont très différentes dans leur taille et dans leur composition en lipides et en protéines (Aloia *et al.* 1993; Nguyen and Hildreth 2000). Des fusions *in vitro* entre des lignées cellulaires créées pour exprimer la glycoprotéine d'enveloppe du VIH et le marqueur CD4 ont largement été utilisées pour étudier les

mécanismes de la fusion et pour tester les effets d'inhibiteurs ou d'activateur potentiels de la fusion. Cao *et al.* ont décrit une méthode basée sur l'observation au microscope qui consiste à quantifier les syncitia ou le nombre de cellules présentant un changement dans leur morphologie. Cette méthode est chronophage et subjective (Cao *et al.* 1996).

II.B.2-Utilisation de sondes fluorescentes pour l'étude la fusion

L'émergence d'un large répertoire de sondes fluorescentes a permis l'examen en détail de l'activité de fusion des glycoprotéines d'enveloppe virale. Il existe deux essais utilisant des sondes fluorescentes qui sont basés sur la fusion de virions (Chen and Blumenthal 1989; Lowy *et al.* 1990). L'un d'entre eux est basé sur la redistribution d'un fluorophore dit « self-quenching » (Chen and Blumenthal 1989; Lowy et al. 1990; Clague et al. 1991)(Figure 14), tandis que l'autre repose sur l'activation photosensible d'une sonde hydrophobe par un lipide fluorescent placé dans la membrane de la cellule cible (Raviv *et al.* 2002) (Figure 15). Ces essais fusion peuvent être réalisés sans enlever les particules virales qui n'ont pas fusionnées et permettent l'analyse des étapes précoces du processus de fusion.

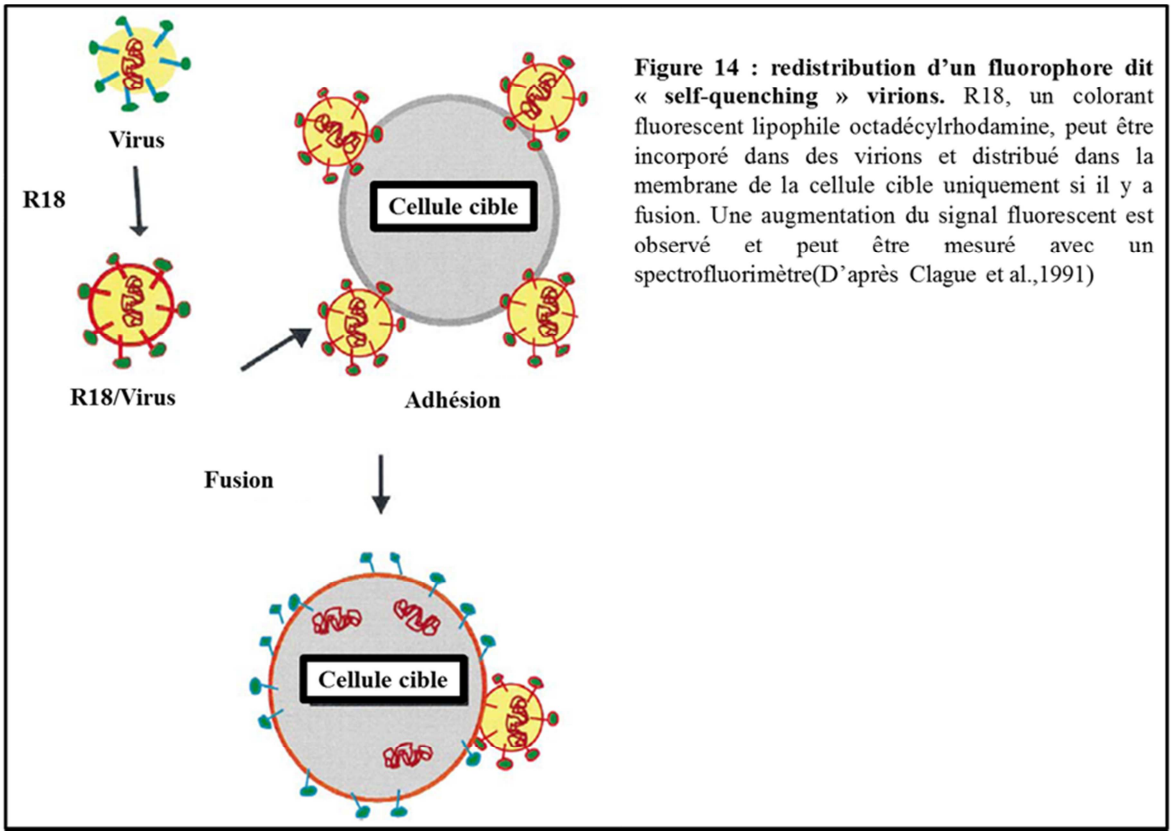


Figure 14 : redistribution d'un fluorophore dit « self-quenching » virions. R18, un colorant fluorescent lipophile octadécylrhodamine, peut être incorporé dans des virions et distribué dans la membrane de la cellule cible uniquement si il y a fusion. Une augmentation du signal fluorescent est observé et peut être mesuré avec un spectrofluorimètre(D'après Clague et al.,1991)

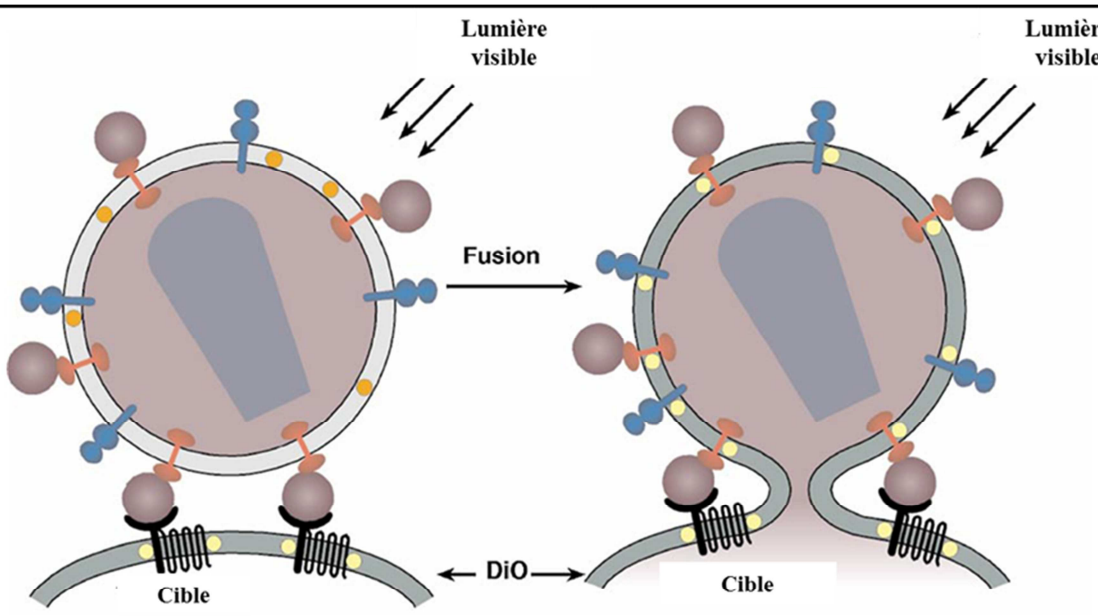


Figure 15: Activation photosensible d'une sonde hydrophobe par un lipide fluorescent placé dans la membrane de la cellule cible. Les membranes de la cellule cible contient un lipide fluorescent 3,3-dioctadecyloxacarbocyanine (DiO) et les membranes virale contiennent une sonde hydrophobe. Lors de la fusion, le lipide fluorescent est distribué dans la membrane virale. Une exposition à la lumière visible permet l'activation de la sonde hydrophobe par le lipide fluorescent. (D'après Raviv et al.,2002)

II.B.3-Utilisation de la β-lactamase et de Vpr pour l'étude de la fusion

En 2002, une méthode simple et rapide a été développée pour détecter la fusion d'une particule VIH-1 avec un type cellulaire relevant tels que les lymphocytes T CD4+ primaires (Cavrois *et al.* 2002). Cet essai se sert de la capacité d'interaction de la protéine Vpr avec la sous unité p6 de la protéine *gag* pour importer dans les virions une enzyme d'intérêt, la β-lactamase. Ainsi, les protéines chimériques β-lactamase-Vpr (BlaM-Vpr) s'incorporent dans les virions lors de la production virale. Après la fusion entre les membranes virales et cellulaires, BlaM-Vpr est distribué dans le cytoplasme. La présence de BlaM-Vpr à l'intérieur de la cellule cible est ensuite détectable grâce au clivage enzymatique de son substrat fluorescent CCF2, préalablement chargé à l'intérieur des cellules sous forme estérifiée (CCF2-AM). Plus précisément, le clivage du cycle β-lactame du CCF2 empêche le transfert d'énergie entre la coumarine et la fluorescéine de la molécule fluorescente. Ainsi, il est possible de différencier le CCF2 non-clivé qui émet une fluorescence verte (520 nm) du CCF2 clivé qui émet alors une fluorescence bleue (447 nm) (Figure 16). L'efficacité de clivage du CCF2 peut être suivie par microscopie à fluorescence, par cytométrie en flux ou

photométrie UV. Il a été montré que cet essai fusion VIH-1, basé sur la technique de FRET, est simple, rapide, sensible et spécifique. De plus, il peut être utilisé pour étudier la fusion du VIH-1 avec des cellules primaires en combinaison avec des immunomarquages pour identifiés différents types cellulaires dans une population de cellules hétérogènes.

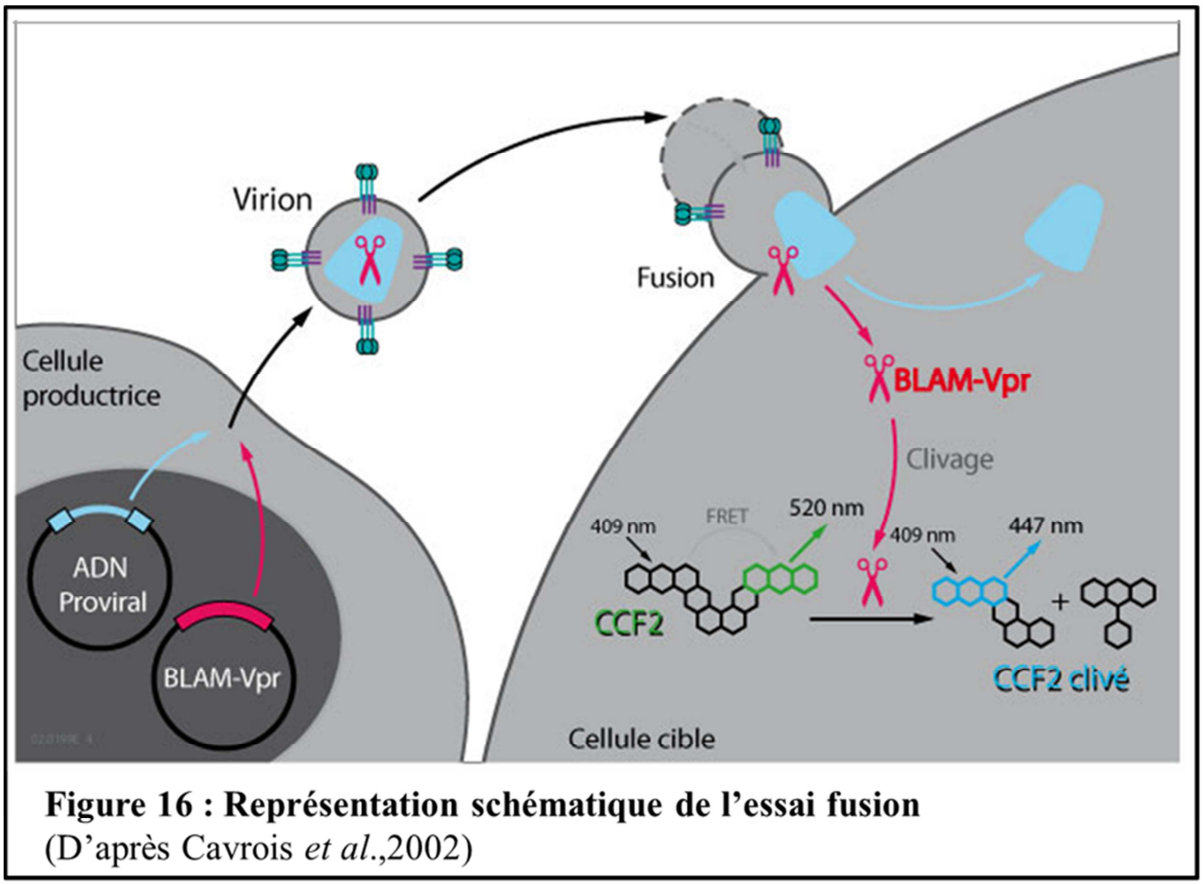


Figure 16 : Représentation schématique de l'essai fusion
(D'après Cavrois *et al.*,2002)

CHAPITRE 3

Utilisation d'additifs de culture pour promouvoir l'entrée des vecteurs rétroviraux dans les cellules cibles

I-Problématique

Deux éléments sont critiques dans le développement de la thérapie génique avec des cellules souches : i) la durée de manipulation *in vitro*, qui augmente les risques de différentiation cellulaire et ii) la nécessité d'utiliser de fortes doses de vecteur pour transduire efficacement des CSH. Les CSH humaines et murines peuvent être transduites *ex vivo* pendant un temps court avec des LV, mais il est nécessaire d'utiliser une forte dose de vecteurs et de les stimuler avec des cytokines pour une transduction efficace (Larochelle and Dunbar 2004). Dans un premier temps, le transfert de gène et l'expression à long terme du transgène dans les cellules différenciées ont été réalisés avec succès dans des modèles murins (Moore *et al.* 1990; Correll *et al.* 1992; Luskey *et al.* 1992; Ohashi *et al.* 1992; Podda *et al.* 1992; Sorrentino *et al.* 1992; Einerhand *et al.* 1993). Ensuite, les expérimentations sur des modèles canins et simiens ont rencontré de plus grandes difficultés liées à la faible efficacité de transduction des cellules souches (Bodine *et al.* 1990; Schuening *et al.* 1991; Carter *et al.* 1992; van Beusechem *et al.* 1992). L'entrée des vecteurs dans les cellules est une étape limitante pour une bonne transduction. Afin de promouvoir l'étape d'entrée, l'utilisation d'additifs de culture est nécessaire.

II-Les additifs de cultures

II.A-Les Polymères cationiques et les lipides cationiques

Les polycations sont des agents qui neutralisent les charges négatives des membranes cellulaires et virales, conduisant à une diminution de leur répulsion respective. Les polymères cationiques s'assemblent avec les vecteurs et forment des complexes qui interagissent avec la surface cellulaire et sont internalisés par endocytose (Mima *et al.* 2005). Comme vu au point « I.A Les approches non-virales de transfert de gène », l'utilisation des polymères cationiques comme le PEI (Fischer *et al.* 1999; Ogris *et al.* 1999; Sweeney *et al.* 2003; Kichler 2004) a d'abord été recommandée pour augmenter l'efficacité de transfert de gène avec des vecteurs non-viraux.

Le polybrene, ou hexadimethrine bromide, est connu pour promouvoir l'infection rétrovirale depuis la fin des années 1960(Toyoshima and Vogt 1969). Il est aujourd'hui largement utilisé pour favoriser le transfert de gènes non seulement avec les vecteurs rétroviraux et aussi avec les vecteurs adénoviraux (Toyoshima and Vogt 1969; Cornetta and

Anderson 1989; Miller 1992b; Arcasoy *et al.* 1997; Coffin JM 1997). Malheureusement, l'utilisation du polybrene est limité à des temps courts d'application et à des concentrations basses entre 5 et 10 µg/mL (selon le type cellulaire cible) pour éviter une toxicité causée par la perturbation potentielle des membranes cellulaires (Aubin *et al.* 1988). Par conséquent, ceci limite son utilisation avec des cellules sensibles, comme les cellules hématopoïétiques**.**

Les liposomes cationiques, comme la Lipofectamine, sont aussi utilisés comme une alternative au polybrene pour améliorer l'efficacité de transduction des cellules avec des vecteurs rétroviraux (Zabner *et al.* 1995; Porter *et al.* 1998; Themis *et al.* 1998). En effet, les lipides cationiques forment un complexe stable virion-liposome qui augmente l'efficacité du transfert de gène (Hodgson and Solaiman 1996). Cependant, l'utilisation de ces molécules en clinique n'est pas approuvée car il a été montré que ces additifs sont cytotoxiques (Cornetta and Anderson 1989; Porter *et al.* 1998).

Les Poloxamers sont des grandes molécules amphiphiles non-ioniques, avec deux branches oxyde éthylène hydrophile oxyde d'éthylène hydrophilic flanquant un oxyde propylène hydrophobe. Il a été montré qu'ils interagissent avec des membranes cellulaires promouvant la réparation de lésions (Lee *et al.* 1992) ou le transport de macromolécules comme des drogues ou des acides nucléiques (Lu *et al.* 1995; Hannig *et al.* 2000). Les poloxamers sont capables d'augmenter l'expression d'un gène après l'injection d'ADN nu dans des muscles squelettiques et cardiaques ou des tumeurs (Gebhart *et al.* 2002; Kabanov *et al.* 2005). L'utilisation du poloxamer pluronic F127 (aussi appelé poloxamer P407) a été suggérée pour promouvoir la transduction lentivirale dans les cellules endothéliales humaines et de cellules gliales de rat (Dishart *et al.* 2003; Strappe *et al.* 2005; Hofig *et al.* 2012).

II.B- Les peptides et protéines cationiques

II .B.1- La protamine sulfate

La protamine sulfate, ou salmine, est une petite protéine cationique du saumon (Sorgi *et al.* 1997). Elle est capable de promouvoir à la fois le transfert de gènes avec des vecteurs rétroviraux (Cornetta and Anderson 1989) mais aussi avec des AAV (Lanuti *et al.* 1999; Yang and Hsieh 2001). Cornetta *et al.* ont montré que la protamine sulfate utilisée à une concentration de 5 à 10 µg/mL est aussi efficace pour améliorer la transduction des cellules avec des vecteurs rétroviraux et est moins toxique que le polybrene (Cornetta and Anderson

1989). Dans l'essai clinique concernant la maladie ALD liée à l'X, La concentration utilisée pour transduire les CSH CD34+ avec des LV est de 4µg/mL(Cartier *et al.* 2009).

II .B.2- La gélatine cationique

La gélatine cationique (Fukunaka *et al.* 2002; Hosseinkhani *et al.* 2002; Hosseinkhani and Tabata 2003) a d'abord été utilisée pour augmenter l'efficacité de transfert de gène avec des vecteurs non-viraux. En 2005, les résultats publiés par Mima *et al.* montrent que l'utilisation de la gélatine cationique est appropriée pour la formation de complexe avec les enveloppes de virus tels que les rétrovirus, le virus de l'herpès et le VIH (Mima *et al.* 2005).

II.B .3- Le peptide SEVI (Semen Enhancer of Viral Infection)

En 2007, une étude destinée à mieux comprendre la transmission sexuelle du VIH a permis de mettre en évidence la présence de peptides correspondant à des fragments de la protéine phosphatase acide prostatique (PAP) dans le sperme humain et quatre ans plus tard, la présence des semenogelins (Munch *et al.* 2007; Roan *et al.* 2011). Des études ont montré que ces peptides naturellement présents dans le sperme humain avaient la capacité d'augmenter l'adhésion des virions sur les cellules cibles (Munch *et al.* 2007; Roan *et al.* 2009a; Kim *et al.* 2010; Wurm *et al.* 2010; Roan *et al.* 2011; Arnold *et al.* 2012). En particulier, Münch *et al.* ont découvert un facteur, appelé SEVI (Semen-derived Enhancer of Virus Infection), qui augmente très fortement l'infection du VIH. Le peptide SEVI est composé de fragments actifs PAP (248-286) formant des fibrilles amyloïdes. Ces fibrilles amyloïdes sont capables non seulement de promouvoir l'infection du VIH-1 mais aussi l'efficacité de transfert de gènes par des LV et γ-RV pseudotypés avec les glycoprotéines d'enveloppe VSV-G, GALV, RD114 ou foamy (Wurm *et al.* 2010). Il a été montré d'une part que le SEVI augmente l'efficacité de transduction des lignées cellulaires hématopoïétiques et non hématopoïétiques avec ces vecteurs et d'autre part que l'efficacité du SEVI est meilleure que le polybrene et le sulfate de protamine. De plus, aucune toxicité liée à l'utilisation du SEVI n'a été détectée quel que soit le type cellulaire testé (Wurm *et al.* 2010). Pour toutes ces raisons, l'utilisation du SEVI semble intéressante pour transduire des cellules fragiles comme les cellules souches hématopoïétiques avec des vecteurs rétroviraux. La difficulté dans l'utilisation du peptide SEVI comme additif est la formation efficace de fibrilles amyloïdes,

essentielles pour promouvoir l'infection rétrovirale (Munch *et al.* 2007; Arnold *et al.* 2012). La formation de fibrilles amyloïdes à partir du peptide SEVI est complexe car elle nécessite une agitation de plusieurs heures à plusieurs jours à une température de 37°C (Munch *et al.* 2007; Roan *et al.* 2009a; Wurm *et al.* 2010).

II.B.4- Les nanofibrilles de peptide EF-C (Enhancing Factor C)

Début 2013, un petit peptide dérivé de la glycoprotéine de surface gp120 du VIH-1 (acides aminés 417 à 428), appelé EF-C (Enhancing Factor C) a été identifié (Yolamanova *et al.* 2013). Ce peptide de 12 résidus acides aminés est environ 4 fois plus actif pour promouvoir l'infection rétrovirale que le peptide SEVI. Comme pour le SEVI décrit précédemment, l'efficacité du peptide EF-C dépend de sa capacité à former des fibrilles amyloïdes. Mais un avantage par rapport au SEVI est que la formation des fibrilles d'EF-C est spontanée, dés la dilution de la solution stock. Cependant, ce peptide n'est pas soluble dans l'eau mais dans le DMSO, un solvant qui peut être toxique pour les cellules en culture, même à faible dose (Santos *et al.* 2003).

II.B.5 - Le fragment de fibronectin CH-296 (Retronectin®)

La fibronectine est une des protéines majeures composant la matrice extracellulaire (Moritz *et al.* 1994). Des études ont montré que la fibronectine permet l'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire mais aussi induit des voies de signalisation intracellulaires *via* son interaction avec les intégrines présentes à la surface des cellules (Patel *et al.* 1985; Patel and Lodish 1986; Williams *et al.* 1991).

Un système d'expression construit dans *Escherichia coli* a permis de produire un fragment de fibronectine humaine de 33 kDa, appelé C-274(Kimizuka *et al.* 1991), avec une forte activité d'adhésion cellulaire (Figure 18). La séquence entière du domaine de fixation à l'héparine avec 271 acides aminés a aussi été exprimée. Des analyses par délétion sur les répétitions de type III ont montré que le site d'adhésion à l'héparine se situe sur le type III-13. La protéine de fusion CH-271, composée du domaine d'adhésion à la cellule et à l'héparine, adhère deux fois plus que le fragment C-271 aux cellules de mélanomes BHK (Baby Hamster Kidney cells) mais elle est inactive sur les cellules murines de mélanome de peau B16-F10, alors que le fragment H-271 seul est inactif sur les cellules BHK et B16-F10. Des protéines

recombinantes contenant la séquence CS1 (connecting segment-1) et la région IIICS sont plus actives que les fragments C-274 et CH-271 avec les cellules B16-F10. Cependant, le fragment H-296 qui contient à la fois H-271 et CS1, n'est presque plus actif sur les cellules BHK. Le fragment CH-296, qui contient CS1 en C-terminal du CH-271 est plus actif avec les cellules B16-F10 que le fragment H-296 (Kimizuka *et al.* 1991).

En thérapie génique, les fragments recombinants de la fibronectine humaines (FN-CH296, Retronectin® sont largement utilisés avec des vecteurs rétroviraux pour augmenter l'efficacité de transfert de gènes dans les cellules cibles(Yu *et al.* 2008; Millington *et al.* 2009; Brentjens *et al.* 2013). Plus précisément, la Retronectin® est un fragment de la fibronectine humaine de 574 acides aminés et son poids moléculaire est d'environ 63 kDa(Kimizuka *et al.* 1991). Cette protéine possède un domaine d'adhésion cellulaire (type III repeat, 8, 9, 10), un domaine de haute affinité d'adhésion aux héparines (type III repeat, 12, 13, 14) et un site CS1 (Figure 17).

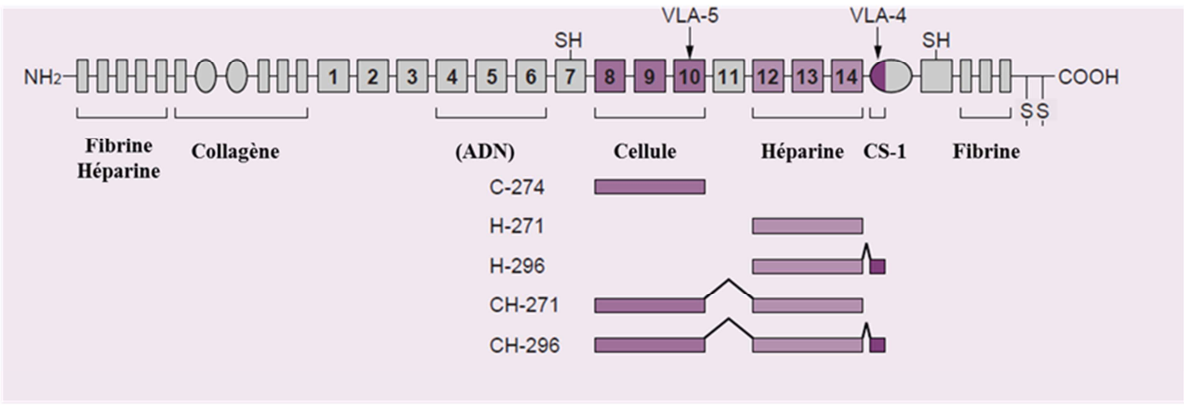


Figure 17 :Structure de la fibronectin et des fragments dont la Retronectin® (CH-296). (D'après Kimizuka et al.,1991)

Plusieurs études montrent une amélioration de l'efficacité du transfert de gènes par des vecteurs rétroviraux en présence de Retronectin® dans des cellules de mammifères dont les cellules humaines CD34+, les lymphocytes T de primates humain et non humain et aussi les cellules de lignées de lymphocytes T humains (Exemples : les cellules Jurkat) (Moritz *et al.* 1994; Moritz *et al.* 1996; Hanenberg *et al.* 1997; Pollok and Williams 1999). L'hypothèse d'action de la Retronectin® est sa capacité à colocaliser des particules virales et des cellules cibles (Hanenberg *et al.* 1996; Hanenberg *et al.* 1997). Plus particulièrement, lors de la transduction de CSH avec des vecteurs rétroviraux, cette colocalisation est réalisée par les

fragments de fibronectine CH-296 *via* à la fois l'interaction directe des particules rétrovirales avec les séquences contenues dans le domaine d'adhésion aux héparines et aussi l'adhésion des cellules, *via* les intégrines Very Late Antigen-4 (VLA-4) (Williams *et al.* 1991), et Very Late Antigen-5 (VLA-5) (van der Loo *et al.* 1998) aux domaines CS-1 et C-domain respectivement (Figure 18).

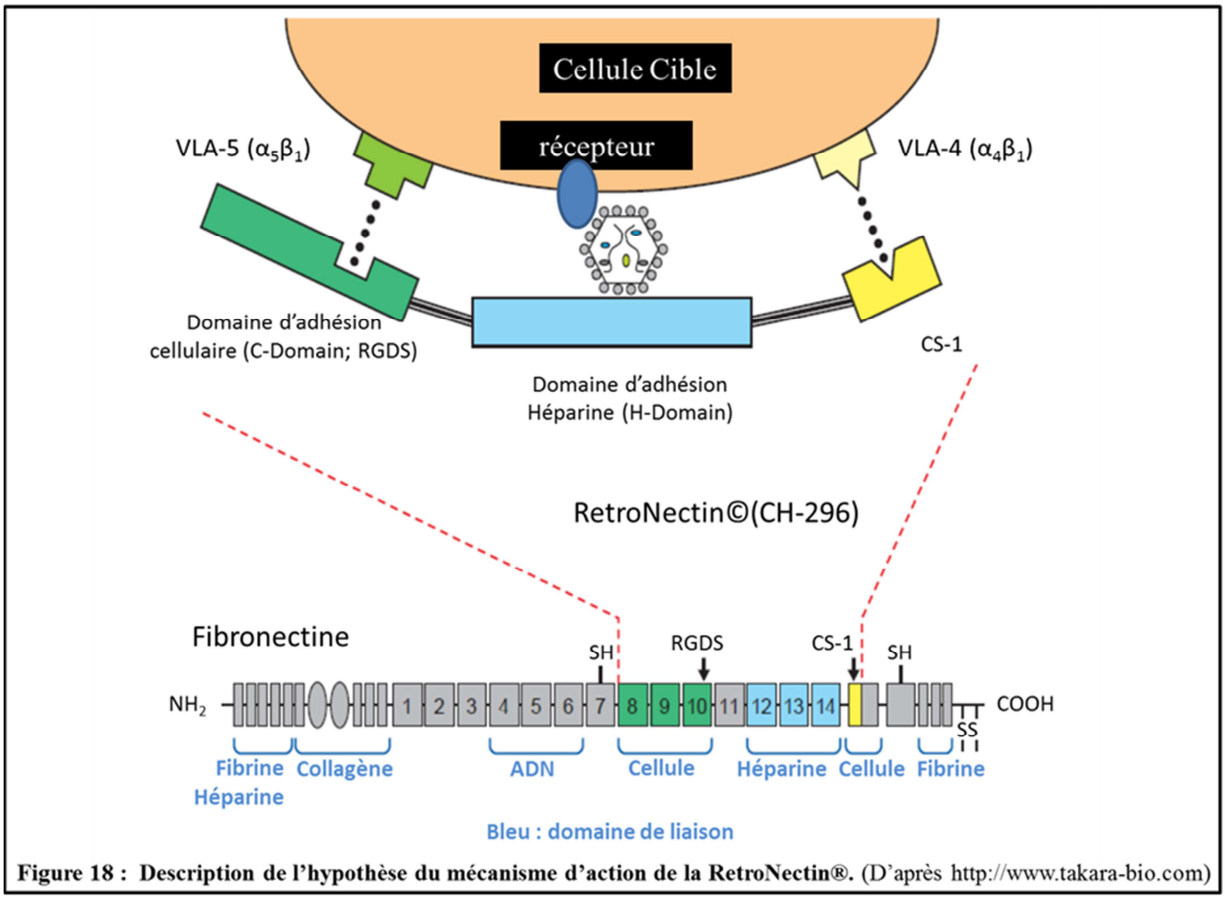


Figure 18 : Description de l'hypothèse du mécanisme d'action de la RetroNectin®. (D'après http://www.takara-bio.com)

La mise au point de ce nouveau protocole de transduction basé sur l'utilisation de la Retronectin® a permis d'obtenir de hautes efficacités de transduction de cellules hématopoïétiques murines et humaine de l'ordre de 50 à 70% (Williams 1999) et cela en absence de co-culture, de polycations ou d'une exposition longue à des facteurs de croissance utilisés auparavant. En particulier, avec les cellules souches hématopoïétiques humaines exprimant le marqueur de surface CD34, l'utilisation de la Retronectin® est essentielle pour améliorer l'infectiosité des vecteurs lentiviraux pseudotypés avec la glycoprotéine d'enveloppe GALVTR et RD114TR (Sandrin *et al.* 2002) mais est moins efficace avec la

glycoprotéine d'enveloppe VSV-G (Haas *et al.* 2000; Sandrin *et al.* 2002). L'efficacité de la Retronectin® nécessite que les cellules soient au préalable préstimulées avec des cytokines.

De plus, la Retronectin® est utilisée en addition de l'anticorps anti-CD3 pour stimuler la croissance des cellules T du sang périphérique et pour conserver leur phénotype naïf (Yu *et al.* 2008). Cette stimulation de la croissance des cellules T par la Retronectin® est probablement induite par l'interaction de l'intégrine VLA-4 avec le domaine CS-1 (Nojima *et al.* 1990; Sato *et al.* 1995). Pour répondre aux besoins d'une utilisation à grande échelle lors des essais cliniques, une adaptation du protocole a été nécessaire, incluant le développement de grands sacs coatés avec de la Retronectin® (Lamers *et al.* 2008). Cependant, les conditions d'utilisation de la Retronectin® ne permettent pas de savoir précisément la quantité de Retronectin® ni le nombre de particules virales fixées sur celle-ci lors de la transduction des cellules. De plus, les interactions fortes des cellules avec la Retronectin® rend difficile la récupération optimale des cellules transduites.

II.B.6 - Le peptide LAH4-L1

Au laboratoire, une collaboration avec Antoine Kichler (DR2, CNRS UMR8151) a permis d'identifier les peptides cationiques de la famille LAH4 comme des additifs de culture très puissants pour promouvoir la transduction lentivirale (Fenard *et al.* 2013a). Les peptides de la famille LAH4 sont connus pour leur propriété antibiotique (Mason *et al.* 2006a) et sont des agents de transfection d'ADN et d'ARN interférant efficaces (Bechinger *et al.* 2010). C'est la première fois que cette famille est décrite comme efficace pour promouvoir l'activité de transfert de gène des vecteurs viraux. Le peptide LAH4-L1 augmente efficacement l'infectiosité des vecteurs GALVTR-LV sur des CSH CD34+ humaines. Cependant, le peptide LAH4-L1 ne permet pas d'augmenter les transductions des cellules avec les vecteurs VSV-G-LV. Des études structure-fonction de ces peptides ont permis de concevoir des peptides plus performants et avec un spectre d'action plus large. Une partie de ce travail de thèse a consisté à étudier le mécanisme d'action d'un de ces peptides appelé Vectofusin-1® (Fenard *et al.* 2013b).

PRESENTATION ET DISCUSSION DES RESULTATS

I- But du travail

Bien que les vecteurs lentiviraux soient des outils couramment utilisés pour réaliser un transfert de gène à l'intérieur des cellules, il n'existe pas de technique permettant de pouvoir évaluer précisément et de façon concomitante dans une même population cellulaire, le pourcentage des cellules dans lesquelles les vecteurs sont entrés en comparaison avec le pourcentage de cellules transduites.

Le travail présenté dans cette thèse porte sur l'adaptation d'une méthode basée sur la technique du transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes (FRET) aux vecteurs lentiviraux, initialement développée pour l'étude de l'entrée du VIH-1 (Cavrois et al. 2002). Cette méthode a été appliquée pour l'étude concomitante de l'adhésion, de la fusion et de la transduction des vecteurs lentiviraux pseudotypés avec la glycoprotéine d'enveloppe du VSV dans des lignées et des cellules primaires en présence ou en absence d'additifs de culture. Une partie de cette étude a servi à étudier le mécanisme d'action d'une nouvelle classe d'additifs dérivés du peptide LAH4-L1 améliorant le potentiel infectieux des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1 pseudotypés avec différentes glycoprotéines d'enveloppe (Fenard et al. 2013) et plus particulièrement pour l'étude du mécanisme d'action de la Vectofusin-1 dont les résultats ont été publiés récemment (Fenard et al. 2013). Cet essai fusion a également été utilisé pour étudier l'effet des additifs de culture comme la Vectofusin-1® et la Retronectin® sur l'entrée et la transduction des cellules hématopoïétiques. L'ensemble de ses résultats ont été publiés récemment (Ingrao et al. 2013).

II- Résultats

II.A- Mise en évidence de l'effet de la Vectofusin-1 sur l'entrée des vecteurs lentiviraux dans les cellules souches hématopoïétiques

La Vectofusin-1 a été identifiée dans notre laboratoire(Fenard *et al.* 2013b). C'est un peptide composé de 26 résidus acides aminés, riche en histidine, cationique et amphipathique (figure 19). Il fait partie de la famille des peptides LAH4 (Kichler *et al.* 2003; Bechinger *et al.* 2010). Ces peptides ont précédemment été décrits comme ayant des propriétés antibiotiques et aussi comme étant des agents capables de transfecter de l'ADN et des ARN interférants à l'intérieur des cellules (Mason *et al.* 2006a; Mason *et al.* 2006b; Marquette *et al.* 2008; Mason *et al.* 2009; Langlet-Bertin *et al.* 2010). Les peptides dérivés de LAH4 ont donc d'abord été proposés pour améliorer les approches non-virales de transfert de gène (Ferrer-Miralles *et al.* 2008). Récemment, le peptide LAH4-L1 a été décrit comme un additif de culture aussi efficace que la Retronectin® pour promouvoir la transduction des CSH exprimant le marqueur CD34+ avec des LV dérivés du VIH-1 pseudotypés avec la GP GALVTR (Fenard *et al.* 2013a). Il a été montré que les peptides de la famille LAH4, dont fait partie la Vectofusin-1, interagissent avec les lipides membranaires, adoptent une orientation transmembranaire à pH neutre et sont capables de déstabiliser la membrane plasmique (Mason *et al.* 2006b). L'absence de toxicité de la Vectofusin-1 a été montrée *in vitro* et *in vivo* (Fenard *et al.* 2013b). De plus, elle est soluble dans l'eau et peut-être synthétisée et purifiée facilement selon les BPF pour l'application clinique *ex vivo*. La Vectofusin-1 pourrait améliorer les protocoles cliniques de transduction des cellules CD34+ avec des vecteurs rétroviraux ou lentiviraux (Galy and Thrasher 2011). De plus, l'utilisation de la Vectofusin-1 permet d'augmenter la transduction lentiviral avec des concentrations de vecteurs suboptimales, ce qui ouvre la perspective de diminuer la quantité de vecteurs nécessaire pour obtenir un taux de transduction des cellules satisfaisant et ainsi réduire les coûts et limiter la toxicité potentielle.



Figure 19 : Séquence de la Vectofusin-1. Le peptide est composé de lysine (K), histidine (H), leucine (L) et alanine (A) et une amidation en C-terminal (-NH2) (D'après Fenard *et al.* 2013b)

Nous avons montré que ce peptide soluble dans l'eau est capable d'augmenter l'efficacité de transduction des CSH humaines en absence de toxicité avec des vecteurs lentiviraux pseudotypés avec les GPs d'enveloppe GALV/TR, RD114/TR, MLV-A et VSV dont une production VSV-G-LV produite et purifiée selon les standards des BPF. En effet, aucun effet délétère lié à laVectofusin-1® n'a été observé sur les CSH humaines pendant les tests de reconstitution du système immunitaire humain dans un modèle de souris immunodéficientes BALB-Rag/γC. De plus, il a été montré que la Vectofusin-1® permet d'augmenter le niveau de transduction de 1 à 2 copies de vecteurs par cellule de façon dose de vecteur dépendante lors de la transduction de CSH humaines transduites avec un VSV-G-LV de grade clinique. Pour finir, l'utilisation de l'essai fusion pour l'étude de l'entrée des vecteurs lentiviraux dans les cellules cibles nous a montré que la Vectofusin-1® permet d'augmenter l'efficacité de transduction des CSH humaines en agissant sur l'étape d'entrée en favorisant l'adhésion et la fusion entre les membranes virales et cellulaires des CSH humaines.

L'ensemble de ces résultats est présenté dans l'article 1.

ARTICLE 1

"Vectofusin-1, a new viral entry enhancer, strongly promotes lentiviral transduction of human hematopoietic stem cells"

D. Fenard, D. Ingrao, A. Seye, J. Buisset, S. Genries, S. Martin, A. Kichler and A. Galy

Molecular Therapy-Nucleic Acids (2013). Vol. 2 e90;
doi:10.1038/mtna.2013.17

Citation: Molecular Therapy–Nucleic Acids (2013) 2, e90; doi:10.1038/mtna.2013.17
© 2013 American Society of Gene & Cell Therapy All rights reserved 2158-3188/11
www.nature.com/mtna

METHODS: ORIGINAL ARTICLE

Vectofusin-1, a New Viral Entry Enhancer, Strongly Promotes Lentiviral Transduction of Human Hematopoietic Stem Cells

David Fenard[1–3], Dina Ingrao[1–3], Ababacar Seye[1–3], Julien Buisset[1–3], Sandrine Genries[1–3], Samia Martin[1], Antoine Kichler[1,4,5,6] and Anne Galy[1–3]

Gene transfer into hCD34⁺ hematopoietic stem/progenitor cells (HSCs) using human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based lentiviral vectors (LVs) has several promising therapeutic applications. Yet, 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 and cationic compounds, but all present limitations. In this study, we describe a new transduction enhancer called Vectofusin-1, which is a short cationic peptide, active on several LV pseudotypes. Vectofusin-1 is used as a soluble additive to safely increase the frequency of transduced HSCs and to augment the level of transduction to one or two copies of vector per cell in a vector dose-dependent manner. Vectofusin-1 acts at the entry step by promoting the adhesion and the fusion between viral and cellular membranes. Vectofusin-1 is therefore a promising additive that could significantly ameliorate hCD34⁺ cell-based gene therapy.

Molecular Therapy–Nucleic Acids (2013) **2**, e90; doi:10.1038/mtna.2013.17; published online 7 May 2013
Subject Category: Methods section

Introduction

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based lentiviral vectors (LVs) are attractive delivery tools for gene therapy applications. These vectors are currently used in clinical applications to treat various diseases such as immune deficiencies, neurological diseases, cancers, anemias, and HIV infection.[1,2]

Numerous LV applications rely on *ex vivo* transduction of hematopoietic stem/progenitor cells (HSCs) expressing the hCD34 marker. Transduction of HSCs by LVs is initiated by binding of the viral envelope glycoprotein (GP) to cell surface receptors. Among the first and still most widely used GPs for pseudotyping LVs is vesicular stomatitis virus-G GP (VSV-G), which has broad tropism and generates stable particles that can be purified and cryopreserved.[3,4] LVs can also be efficiently pseudotyped with other GPs harboring efficient hematopoietic tropism, such as amphotropic murine leukemia virus (MLV) GP, modified feline endogenous retrovirus RD114 GP (RD114TR), and modified gibbon ape leukemia virus GP (GALVTR).[5] The capacity of pseudotyped LVs to interact with HSCs is thought to be a limiting factor that depends on the envelope GP used and the relative paucity of viral receptors. One strategy to optimize the binding and entry steps of LVs is the addition of cofactors during the transduction procedure. For laboratory research purposes, various culture additives can be used, such as cationic polymers (e.g., polybrene, refs. 6,7 and DEAE-Dextran, ref. 8), cationic lipids (e.g., lipofectin, lipofectamine, refs. 9,10), and cationic peptides (e.g., protamine sulfate, ref. 6 and human semen enhancer of viral infection (SEVI), ref. 11). The mechanism of action of these cationic additives is mainly based on their abilities to neutralize membrane charges and to promote virus aggregation.[12,13] For clinical applications, transduction protocols include the fibronectin fragment FN CH-296 (also called Retronectin).[14–16] Retronectin enhances transduction by facilitating the colocalization of viruses and cells. This peptide is essential to promote the infectivity of GALVTR-LV and RD114TR-LV, particularly with hCD34⁺ cells,[5] but is less efficient with VSV-G-LV.[5,17] Despite the limited effect of Retronectin to enhance infection of hCD34⁺ cells with VSV-G-LVs, this reagent continues to be the lead compound additive that is used in clinical gene therapy protocols. However, use of Retronectin is surface-based which is cumbersome both practically and for precise dosage of the additive relative to the vector and cell product-specific activity. Therefore, identification of new, soluble, easy to manipulate additives capable of enhancing the infectivity of a broad spectrum of LV pseudotypes including VSV-G-LVs is needed to provide an alternative to existing additives such as Retronectin.

Because the cationic property appears crucial for many enhancers of retroviral infectivity, we focused our attention on Vectofusin-1, a new histidine-rich cationic amphipathic peptide derived from the LAH4 peptide family.[18,19] LAH4 peptides were previously used as an antimicrobial agent and also as efficient transfection agents for DNA and small-interfering RNA.[20–24] LAH4 derivatives have been proposed to optimize nonviral gene transfer approaches,[25] but have never been tested in the context of gene transfer strategies relying on enveloped viruses.

[1]Généthon, Evry, France; [2]INSERM, UMR_S951, Généthon, Evry, France; [3]Université Evry Val d'Essonne, UMR_S951, Evry, France; [4]CNRS, UMR_8151, Paris, France; [5]INSERM, U1022, Paris, France; [6]Université Paris Descartes, Paris, France. Correspondence: David Fenard, Généthon, INSERM UMR_S951, 1bis, rue de l'Internationale – BP60, Evry Cedex F-91002, France. E-mail: dfenard@genethon.fr or Anne Galy, Généthon, INSERM UMR_S951, 1bis, rue de l'Internationale – BP60, Evry Cedex F-91002, France. E-mail: galy@genethon.fr
Keywords: cationic peptide; gene therapy; hematopoietic stem cell; lentiviral vector
Received 2 March 2013; accepted 7 March 2013; advance online publication 7 May 2013. doi:10.1038/mtna.2013.17

For the first time, we show that Vectofusin-1 was able to promote HSC transduction with every lentiviral pseudotype tested, including highly purified VSV-G-LVs. There were no deleterious effects of Vectofusin-1 on HSCs as tested by human immune system (HIS) reconstitution in the BALB-Rag/γC–immunodeficient mouse model. Finally, the adaptation of the widely used HIV-1 fusion assay[26,27] to study the entry of LVs into target cells revealed that the enhancement of HSC transduction with LVs in the presence of Vectofusin-1 resulted from an increase in the adhesion and the fusion steps of LVs with the cellular membranes of HSCs.

Results

Enhanced lentiviral transduction of HSC in the presence of the Vectofusin-1 peptide

Vectofusin-1 is a 26-mer cationic amphipathic peptide identified in our laboratory and derived from the LAH4 peptide family[18,19] (**Figure 1a**). Vectofusin-1 enhances the transduction of hCD34⁺ HSCs obtained from umbilical cord blood (UCB) as shown with several LV pseudotypes (**Figure 1b–d**). Vectofusin-1 enhances transduction with a green fluorescent protein (GFP)-encoding LV pseudotyped with the GALVTR, RD114TR or amphotropic MLV GPs, known to promote receptor-mediated entry into human hematopoietic cells.[5,28,29] With unprocessed bulk harvest supernatant titering as low as 10^6 transducing units/ml, the transduction levels reached beyond 50% when Vectofusin-1 was added to the transduction medium, whereas transduction was nearly undetectable in the absence of this additive (**Figure 1b–d**). Notably, Vectofusin-1 reproducibly increased transduction levels with cells from several UCB donors and with no apparent cytotoxicity. The enhancing effects of Vectofusin-1 were also observed with Moloney MLV γ-retroviral vectors pseudotyped with GALV (GALV-MLV), showing that Vectofusin-1 activity is not restricted to the lentiviral genus (**Figure 1e**). Vectofusin-1 promotes GALVTR-LV infectivity of cord blood-derived CD34⁺ cells, with a half maximal efficient concentration (EC_{50}) of ~6 µg/ml (**Figure 2a**) and showed a half maximal toxic concentration (TC_{50}) of ~60 µg/ml (**Figure 2b**). Here, the TC_{50} of Vectofusin-1 was evaluated after overnight incubations with hCD34⁺ cells rather than 6 hours, for a more stringent assessment of toxicity. Hence, the Vectofusin-1 TC_{50}/EC_{50} ratio represents a one log safety index which permits a safe and practical use of this reagent to transduce human CD34⁺ cells with various retroviral pseudotypes.

Vectofusin-1 augments CD34⁺ HSC transduction with highly purified VSV-G-LV

Most of the current clinical cell and gene therapy applications involving CD34⁺ HSCs use the pantropic VSV-G-LV pseudotype which enables robust virus purification protocols.[4] However, the titer and infectivity of chromatographically purified vectors for HSCs can be low, requiring the help of transduction additives. Accordingly, the effects of Vectofusin-1 were compared with those of widely used additives: Retronectin,

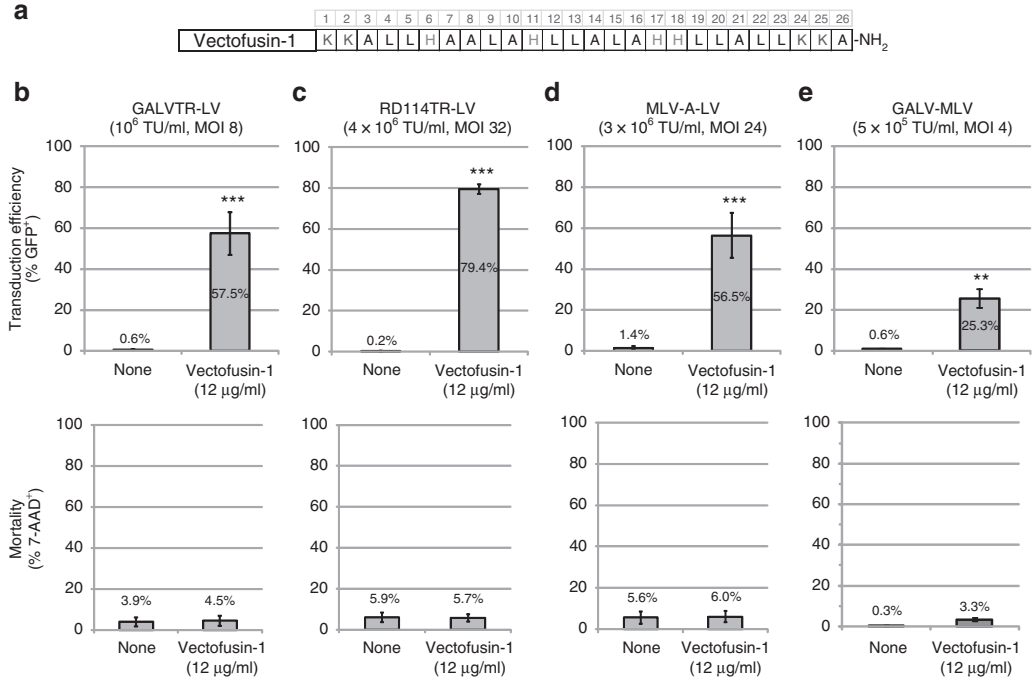


Figure 1 Vectofusin-1 enhances CD34⁺ hematopoietic stem/progenitor cells transduction with various lentiviral or retroviral pseudotypes. (**a**) Schematic representation of the primary sequence of Vectofusin-1 peptide composed of four different types of residue: lysine (K), histidine (H), leucine (L), and alanine (A); carboxy-terminal amidation (-NH_2). (**b**–**e**) A variety of green fluorescent protein (GFP)-encoding vectors (GALVTR-LVs (n = 5), RD114TR-LVs (n = 3), MLV-A-LVs (n = 3), GALV-MLV (n = 3)) were used to transduce hCD34⁺ cells during 6 hours in the absence (none) or presence of Vectofusin-1 (12 µg/ml). Data are shown as the average percentage of GFP⁺ or 7-AAD⁺ cells ± SD from number of umbilical cord blood samples treated in duplicate (**P < 0.01; ***P < 0.001, Student's t-test). 7-AAD, 7-aminoactinomycin D; GALV, gibbon ape leukemia virus; LV, lentiviral vector; MLV-A, amphotropic murine leukemia virus; MOI, multiplicity of infection; TU, transducing unit.

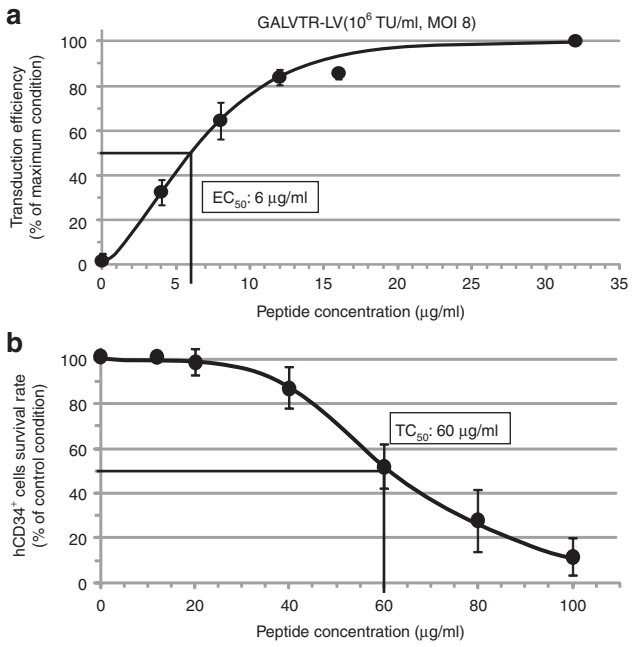


Figure 2 Determination of the half maximal efficient (EC_{50}) and toxic (TC_{50}) concentrations of Vectofusin-1. (**a**) hCD34⁺ cells were infected with GALVTR-LVs in the absence or presence of various concentrations of Vectofusin-1. Transduction efficiencies (percentage of GFP⁺ cells) were obtained 5 days post-transduction ($n = 4$). Data are normalized to the maximum effect observed ± SD (average maximal value of transduction was 67%). (**b**) Evaluation of the TC_{50} of Vectofusin-1. The hCD34⁺ cells were incubated overnight with the indicated amounts of Vectofusin-1 ($n = 6$). The survival rate was estimated by counting the number of living cells using the Trypan blue exclusion method under light microscopy. Data are normalized to the control condition ± SD (average value of survival rate in the absence of peptides was 98.9%). GALV, gibbon ape leukemia virus; LV, lentiviral vector; MOI, multiplicity of infection; TU, transducing unit.

and also SEVI, a natural cationic peptide expressed in human semen and characterized as a strong enhancer of viral and vector infection.[11,30] A purified GFP-expressing VSV-G-LV was obtained following a series of membrane and chromatography steps as described for the production of large-scale clinical grade LVs[4] used to infect hCD34⁺ cells. As shown in **Figure 3a**, the different culture additives all enhanced transduction levels at each dose of vector tested. The enhancing effects were most prominent when suboptimal concentrations of vector were used, but became less evident as vector concentration increased because basal levels of transduction without additive also increased. Vectofusin-1 was more efficient than SEVI at the same optimal molar concentration (4.3 µmol/l) in enhancing the effects of high concentrations of vector. Vectofusin-1 was as efficient as Retronectin in promoting the transduction level of hCD34⁺ cells, and gave more reproducible results (as shown by a lower *P* value comparing effects versus "none" with 5×10^7 infectious genome (ig)/ml vector). Most importantly, the average vector copy number (VCN) per cell obtained in the presence of Vectofusin-1 ranged only between 1 and 2 for transduction levels reaching 60–80% of cells (**Figure 3b**), whereas the same range of VCN was observed when 45–65% of hCD34⁺ cells were transduced in the presence of Retronectin. These results illustrate the ability of Vectofusin-1 to transduce a high percentage of target cells in the bulk population, with a safe level of VCN (**Figure 3b**). Similarly, with other lentiviral pseudotypes, transduction efficiencies of hCD34⁺ cells in presence of Vectofusin-1 were able to reach 80% with VCN below 2.5 (**Supplementary Figure S1**). Thus, Vectofusin-1 safely enhanced the frequency of HSC transduction consistent with its predicted VCN value. In addition, we have shown that the effect of Vectofusin-1 is not restricted to hCD34⁺ cells isolated from UCBs. Indeed, using hCD34⁺ cells isolated from granulocyte colony-stimulating factor–mobilized peripheral blood (MPB), we observed a twofold increase of the

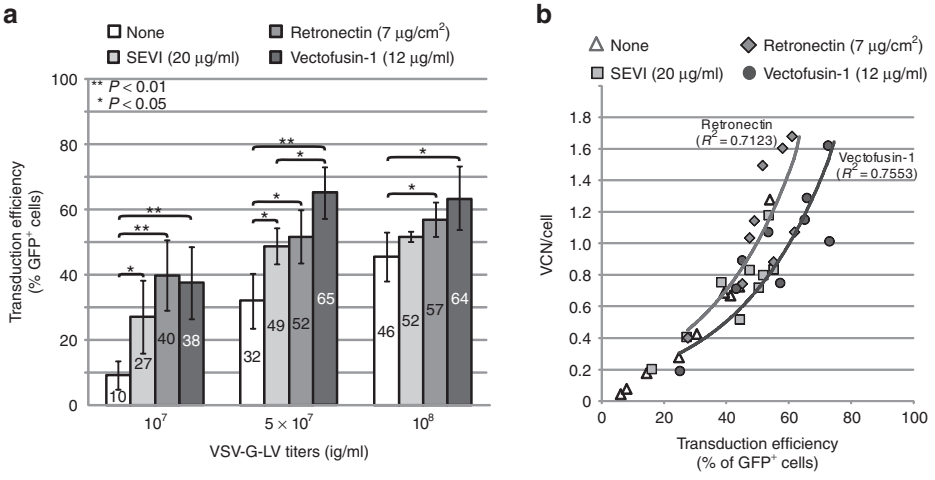
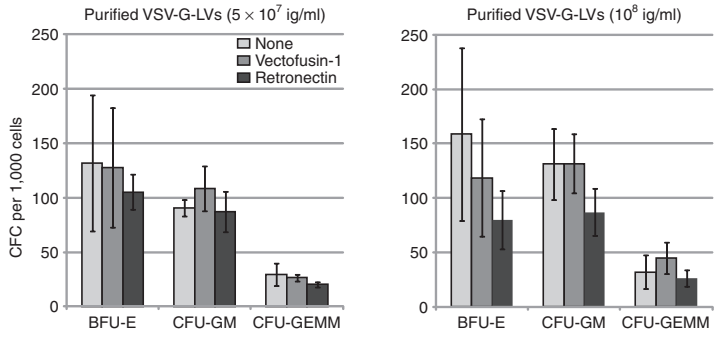


Figure 3 Comparison of Vectofusin-1 with other culture additives to promote transduction of hCD34⁺ cells with purified vesicular stomatitis virus-G-lentiviral vectors (VSV-G-LVs). hCD34⁺ cells (three umbilical cord blood donors tested in three independent experiments) were infected with increasing concentrations of purified VSV-G-LVs (10^7, 5×10^7, and 10^8 ig/ml corresponding to multiplicity of infection (MOI) 80, 400, and 800, respectively) in the absence (none) or presence of indicated transduction enhancers. (**a**) Transduction was measured in the bulk of cultured cells after 5 days by following the percentage of GFP⁺ cells ± SD using flow cytometry (**$P < 0.01$; *$P < 0.05$, Student's *t*-test) and (**b**) average vector copy number (VCN) of the cell population by quantitative PCR. GFP, green fluorescent protein; ig, infectious genome; SEVI, semen enhancer of viral infection.

a



b

VSV-G-LV titers (ig/ml)	Enhancer	Number of CFC tested	Vector-positive CFC (%)	Average VCN within transduced CFC (range)
5×10^7	None ($n = 3$)	118	59 ± 27	0.8 (0.1–3.4)
5×10^7	Vectofusin-1 ($n = 3$)	119	86 ± 06	1.1 (0.1–6.7)
5×10^7	Retronectin ($n = 2$)	77	69 ± 15	1.5 (0.1–6.2)
10^8	None ($n = 3$)	111	75 ± 17	1.2 (0.1–3.9)
10^8	Vectofusin-1 ($n = 3$)	117	91 ± 04	1.1 (0.1–5.3)
10^8	Retronectin ($n = 2$)	76	90 ± 00	1.1 (0.1–6.7)

c

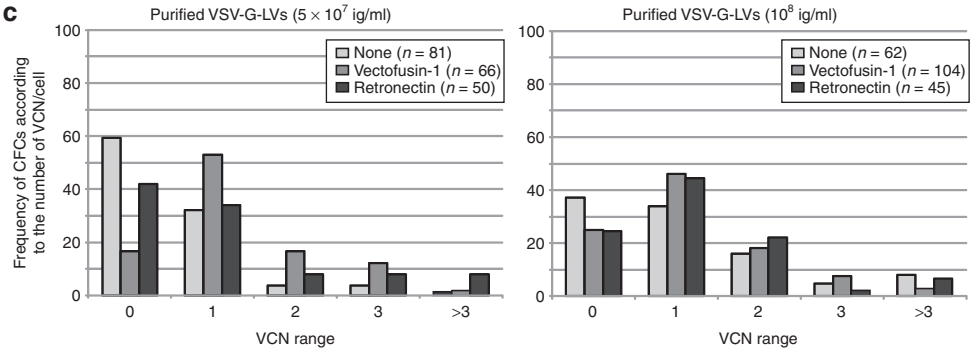


Figure 4 Lack of *in vitro* hematopoietic toxicity of Vectofusin-1. (**a**) Differentiation of transduced hCD34⁺ cells in colony-forming cell (CFC) assays. Results represent the average number of different types of colonies obtained for 1,000 cells plated after transduction with 5×10^7 and 10^8 ig/ml (conditions of **Figure 3**). (**b**) Transduction was measured in individual CFCs obtained after 2 weeks of culture in methylcellulose. Transduction of CFCs was measured by determining the percentage of GFP⁺ CFCs using epifluorescence microscopy ("vector-positive CFC (%)"), and the vector copy number (VCN) in each CFC by quantitative PCR. The average VCN per vector-positive CFC and range are listed (right column). (**c**) Bars represent the percentage of CFCs in each category (VCN range) over the total number of CFCs analyzed. The number of CFCs analyzed is indicated between brackets for each group. BFU-E, burst-forming unit, erythroid; CFU-GEMM, colony-forming unit, granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte; CFU-GM, colony-forming unit, granulocyte-monocyte; GFP, green fluorescent protein; ig, infectious genome; VSV-G-LV, vesicular stomatitis virus-G-lentiviral vector.

transduction level in presence of Vectofusin-1 (**Supplementary Figure S2**). The slightly lower transduction efficiency that we observed for MPB-derived HSCs compared with UCB was previously described in the presence of Retronectin.[31]

Lack of hematopoietic toxicity of Vectofusin-1

Hematopoietic toxicity was first evaluated *in vitro* by analyzing colony-forming cell (CFC) generated from CD34⁺ cells exposed to optimal concentrations of Vectofusin-1 during transduction. For these experiments, we used highly purified VSV-G-LV to transduce CD34⁺ cells because these vectors exhibit no measurable hematopoietic toxicity in this assay.[4] There was no evidence of toxicity from Vectofusin-1 either. Exposure of CD34⁺ cells to Vectofusin-1 did not affect their subsequent growth as CFC and myeloerythroid differentiation (**Figure 4a**). Also, we did not observe any differences in the type and appearance of the CFCs transduced in the presence of Vectofusin-1 (data not shown). Genomic DNA extracted from single colonies was tested by Taqman real-time PCR (quantitative PCR) to evaluate transduction and VCNs at the clonal level.[32] Up to 91% of individual CFCs were transduced in the presence of Vectofusin-1 (**Figure 4b**). Average VCN per CFC, and distribution of the number of VCN per CFC were comparable with the use of Vectofusin-1 or Retronectin to enhance the transduction of the initial hCD34⁺ cell population (**Figure 4c**). To further investigate the potential of Vectofusin-1 in the perspective of clinical applications, we evaluated whether this compound has hematopoietic toxicity *in vivo* by measuring the engraftment of Vectofusin-1–treated CD34⁺ cells in BALB-Rag/γC–immunodeficient mice. The effects of Vectofusin-1 were compared with those of the leading clinical additive Retronectin. To facilitate this comparison, UCB hCD34⁺ cells were transduced with GALVTR-LVs in the presence of optimal concentrations of Vectofusin-1 (12 µg/ml) or Retronectin (20 µg/cm²) and the transduced cells were injected

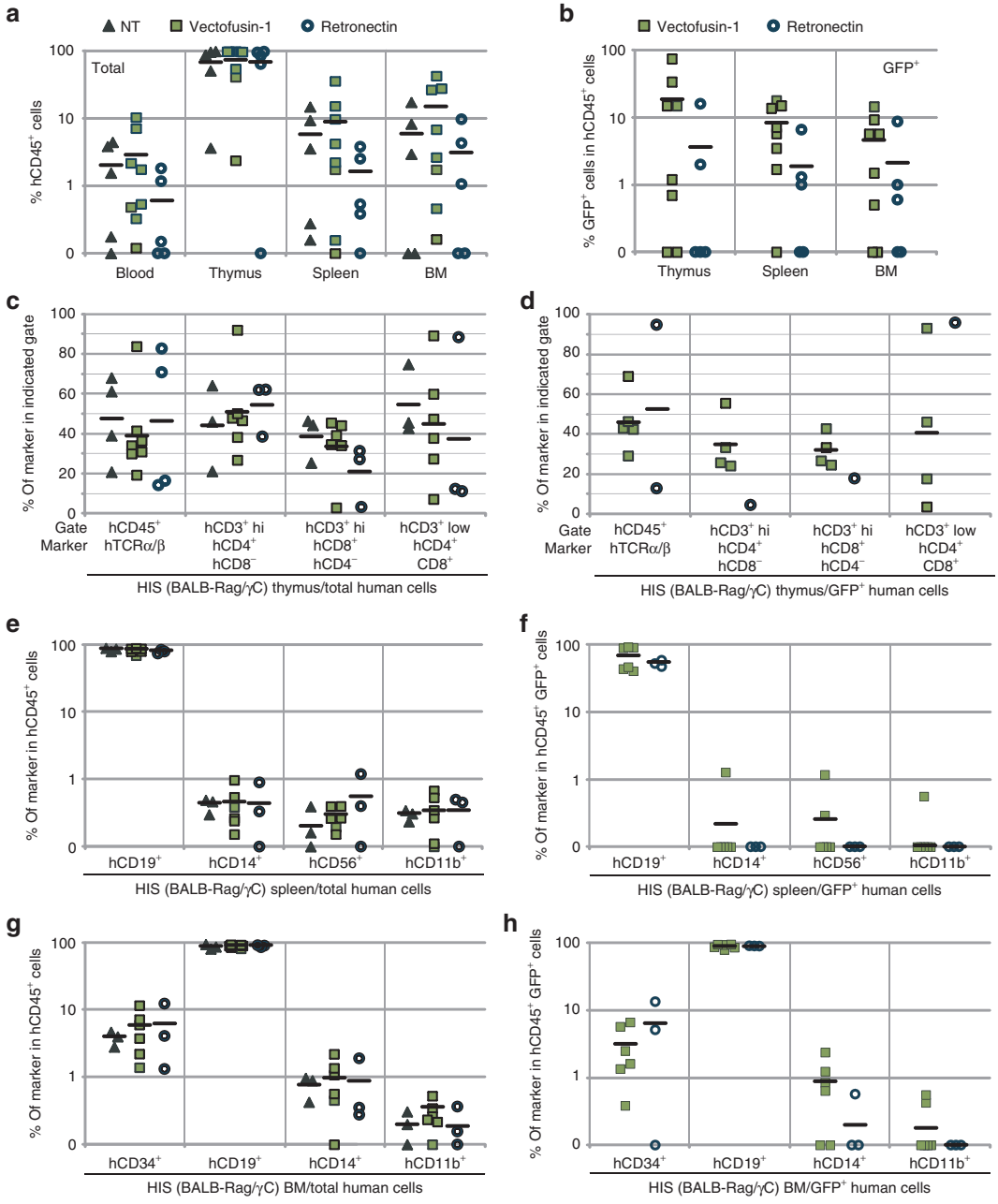


Figure 5 Evaluation of the safety of Vectofusin-1 in the immunodeficient BALB-Rag/γC mouse model. hCD34+ cells were transduced for 6 hours with GALVTR-LVs either in the presence of 12 µg/ml of Vectofusin-1 (squares) or 20 µg/cm² of Retronectin (circle) and injected into the liver of newborn mice. Controls (NT) included non-infected cells not exposed to any transduction enhancer (triangle). (**a**,**b**) Eleven to thirteen weeks post-injection, the engraftment of human transduced cells into HIS (BALB-Rag/γC) mice was measured by flow cytometry in the peripheral blood, the thymus, the spleen, and the bone marrow (BM) using anti-hCD45 antibodies and green fluorescent protein (GFP) expression levels. (**c**,**d**) Human T lymphopoiesis was measured in the thymus by monitoring human TCRα/β in the hCD45+ gate, and CD4 and CD8 marker expression in CD3+ low or high (hi) gates. Human B lymphoid development, monocytes, natural killer cells, granulocytes, and hematopoietic progenitors were determined in the (**e**,**f**) spleen or the (**g**,**h**) BM by monitoring, respectively, the human CD19, CD14, CD56, CD11b, and CD34 surface markers in the hCD45+ gate. GALV, gibbon ape leukemia virus; HIS, human immune system; LV, lentiviral vector; NT, not transduced; TCRα/β, T-cell receptor α/β.

into the liver of irradiated BALB-Rag/γC newborn mice to obtain a human immune lymphomyeloid system (HIS model) in the mouse as described previously.[33] Twelve weeks after injection, equivalent numbers of hCD45+ cells were detected in PB, thymus, spleen, and bone marrow (BM) of mice, whether or not the cells had been transduced in presence of Vectofusin-1, Retronectin, or not transduced (**Figure 5a**). The engraftment of transduced GFP+ hCD45+ cells was at least as good when Vectofusin-1 was used compared with Retronectin (**Figure 5b**), and we confirmed that transduction levels of the bulk hCD34+ cell

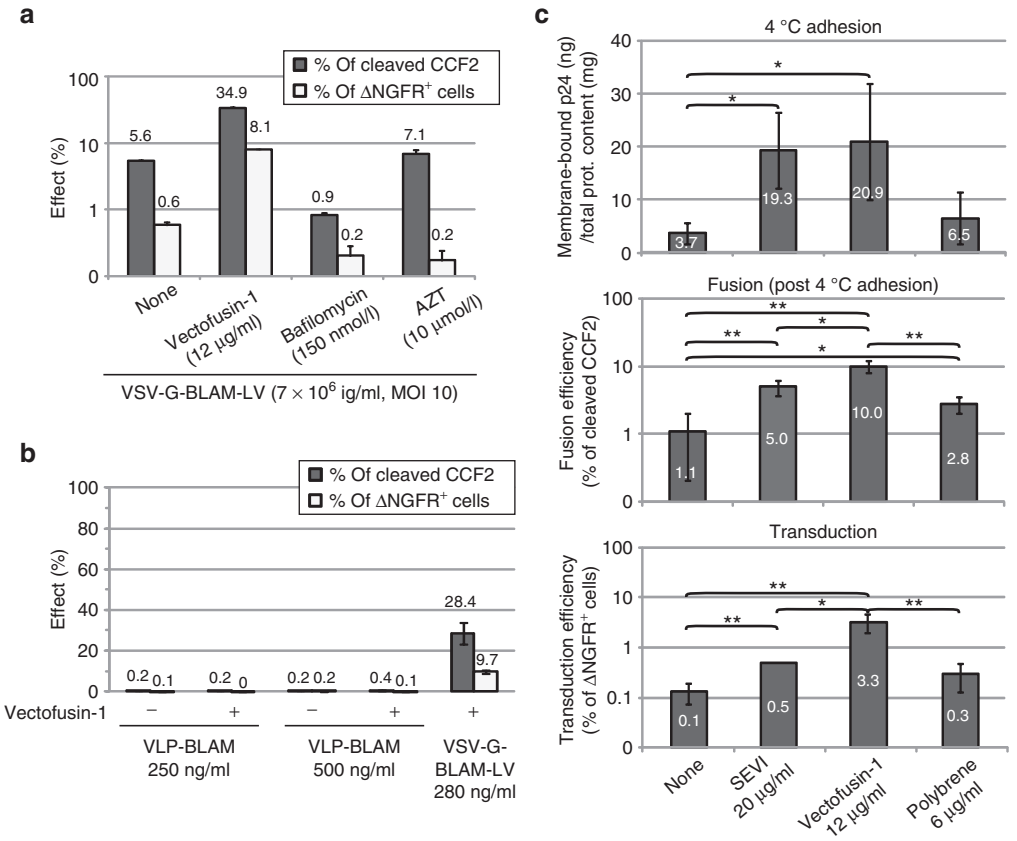


Figure 6 Influence of Vectofusin-1 and other culture additives on the adhesion and fusion step of vesicular stomatitis virus-G-lentiviral vectors (VSV-G-LVs). (**a**) Viral fusion (percentage of cleaved CCF2) and level of transduction after 9 days (percentage of ΔNGFR+ cells) are represented as the average of duplicates ± SD. Data are representative of two different experiments. (**b**) Fusion and transduction assay on hCD34+ cells in the presence of BLAM-VLPs (250 or 500 ng/ml) or the positive control VSV-G-BLAM-LVs (280 ng/ml) in the absence or presence of Vectofusin-1 (12 µg/ml). Data are expressed as the average of two independent experiments performed in duplicate ± SD. (**c**) Adhesion, fusion, and transduction assays of hCD34+ cells in the presence of VSV-G-BLAM-LVs. Pre-cooled hCD34+ cells were incubated for 2.5–3 hours at 4 °C with the pre-cooled vector/peptide mix. Cells were then washed and half of the cells were lysed to evaluate the total membrane-bound p24 (top panel). The remaining cells were further cultured for 2–2.5 hours at 37 °C to induce viral fusion. Next, an aliquot of cells was used for the BLAM fusion assay (middle panel), whereas the remaining cells were further cultured. After 9 days, the transduction efficiency was evaluated as in **a** by monitoring ΔNGFR expression (lower panel). Data are expressed as the average of three independent experiments ± SD (***P* < 0.01; **P* < 0.05, Student's *t*-test). AZT, azidothymidine; BLAM, β-lactamase; MOI, multiplicity of infection; SEVI, semen enhancer of viral infection; VLP, virus-like particle.

population were comparable (**Supplementary Figure S3a**). All observed mice exhibited active human thymopoiesis as evidenced by high percentages of immature CD3-low double-positive hCD4/hCD8 cells in the thymus and with an expected distribution of mature CD3-high single-positive hCD4 and hCD8 T cells (**Figure 5c,d** and **Supplementary Figure S4a**). These populations were efficiently transduced in the presence of Vectofusin-1 (**Figure 5d**). The spleen contained a large population of hCD19+ cells, indicating an active human B lymphoid development which was also transduced (**Figure 5e,f** and **Supplementary Figure S4b**). Human HSCs (hCD34+ hCD45+ cells) were also detectable in the BM and transduced in the presence of Vectofusin-1, as well as myeloid cells such as monocytes (hCD14+ cells) and granulocytes (hCD11b+ cells) (**Figure 5g,h** and **Supplementary Figure S4c**). We observed comparable potency of Vectofusin-1 and Retronectin in the capacity to promote the transduction of hCD34+ HSC cells engrafted in the BM, even though this conclusion is based on low numbers of transduced cells, around 2% of the engrafted CD34+ cells, in each condition tested (**Supplementary Figure S3b**). Such low level of transduction can be explained by suboptimal experimental conditions with the use of a single hit (6 hours) of unconcentrated GALVTR-LV in a murine model best known for efficient human thymic reconstitution than human HSC repopulation in BM (**Figure 5a**). In summary, Vectofusin-1 had no deleterious effects on the transduction, viability, differentiation or sustained engraftment of HSCs and HIS reconstitution. The encouraging safety profile of Vectofusin-1 indicates that it could potentially be used to enhance the *ex vivo* transduction of HSCs in clinical gene therapy applications.

Vectofusin-1 promotes both the adhesion and the fusion steps of LVs with the plasma membrane of CD34+ cells

At a pH above 7, peptides that belong to the LAH4 family adopt a transmembrane orientation in lipid bilayers.[34] The transduction of CD34+ cells is performed in buffered culture

medium with a neutral pH. Therefore, we hypothesized that during transduction, Vectofusin-1 is able to insert itself in the viral and/or cellular membranes, leading to a modulation of the adhesion and the fusion steps of LVs with the membrane of CD34+ cells. To investigate this possibility, we adapted a fluorescence resonance energy transfer-based fusion assay, initially designed for replicative HIV-1 virions,[26,27] to study nonreplicative LVs. The assay utilized recombinant LVs containing β-lactamase (BLAM)-Vpr chimeric proteins (BLAM-LVs) to measure fusion with target cells *via* viral incorporation and delivery of BLAM-Vpr into the cytoplasm.[26] Concomitantly, the transduction efficiency was monitored by following ΔNGFR marker expression. As shown in **Figure 6a**, Vectofusin-1 strongly enhanced VSV-G-LV fusion with target cell membranes and consequently enhanced transduction efficiency. VSV-G-LVs fusion is specifically blocked using the endosome acidification inhibitor bafilomycin A1, whereas the azidothymidine, a reverse transcription inhibitor, is acting only on post-fusion events as expected. BLAM-VLPs, corresponding to BLAM-LVs produced in the absence of any envelope GP were unable to fuse with the plasma membrane, even in the presence of Vectofusin-1 (**Figure 6b**). These results suggest that Vectofusin-1 enhanced a receptor-mediated entry pathway rather than a simple induction of liposome fusion with the plasma membrane.

To determine whether Vectofusin-1 acts on the adhesion step or exclusively on the fusion step, we implemented an entry assay capable of concomitantly evaluating the adhesion, fusion, and transduction steps. Briefly, hCD34+ cells were incubated with VSV-G-BLAM-LVs at 4 °C to allow viral adhesion, in the absence or presence of Vectofusin-1, SEVI, or polybrene. Unbound VSV-G-LVs were removed by washing and the cells were either lysed to determine the amount of membrane-bound p24, or cultured at 37 °C to allow the fusion process to occur. An aliquot of the hCD34+ cell suspension was used for the fusion assay, whereas the remaining cells were further cultured. After 9 days, the transduction efficiency was monitored by following ΔNGFR expression.[35] As shown in **Figure 6c**, Vectofusin-1 was as efficient as SEVI, a known aggregating additive, to potentiate the adhesion step. In addition, the difference between SEVI and Vectofusin-1 was clearly shown in the fusion step. After an extensive wash of unbound VSV-G-LVs, we observed that viral particles bound to the cell surface are more prone to fusion and subsequent transduction in the presence of Vectofusin-1 (10%) than in the presence of SEVI (5%) or polybrene (2.8%) (**Figure 6c**). These results show that Vectofusin-1 has a major role on the cellular entry of LVs, acting both on the adhesion step and the fusion step.

Discussion

The Vectofusin-1 peptide is a new culture additive that potently enhances the transduction of HSCs with retroviral or lentiviral pseudotypes including highly purified VSV-G-LVs. The absence of hematopoietic toxicity of Vectofusin-1 has been demonstrated *in vitro* with CFC assays and *in vivo* in a surrogate murine model of HSC/progenitors engraftment, indicating that Vectofusin-1 is a nontoxic, effective, and versatile culture additive to be used as a transduction enhancer. Most importantly, Vectofusin-1 acts at the level of viral entry, by enhancing both the adhesion and the fusion of viral particles with the cellular plasma membrane. We have shown that these mechanisms are partially different from those of other transduction enhancers, either cationic polymers (polybrene) or peptides (SEVI). The effect on fusion is rather unique in this context.

It has been shown previously that peptides of the LAH4 family, to which Vectofusin-1 belongs, interact with membrane lipids, adopt a transmembrane orientation at neutral pH, and are able to disturb the plasma membrane.[21] Because lipid mixing between viral and plasma membrane seems to precede viral pore formation,[36–39] it is tempting to speculate that Vectofusin-1 may act in a two-step manner. The initial step could involve use of its cationic property to neutralize anionic lipids and heparan sulfates, leading to an increase of adhesion. In the second step, local destabilization of the membrane lipid leaflet could occur, leading to optimization of the lipid-mixing step and subsequent fusion that is independent of the envelope used to pseudotype LVs. This proposed mechanism of action will require further investigation to determine whether Vectofusin-1 acts on both the target cell and viral particle membranes. Structure function studies of Vectofusin-1 are also necessary to determine which amino acid residues are critical in promoting lentiviral transduction. Finally, it will be necessary to study these effects in various cell types that may have distinct membrane compositions and also to study the effects on other lentiviral pseudotypes harboring new viral GP (e.g., measle GP, refs. 40,41 and Tupaïa GP, ref. 42) or chimeric GP (e.g., measle hemagglutinin single-chain antibody, refs. 43,44 and designed ankyrin repeat proteins, ref. 45).

Vectofusin-1 significantly increased the entry of LVs. Major improvements in vector transduction have been obtained using Retronectin in clinical protocols, particularly with γ-retroviral gene therapy applications, but Vectofusin-1 has some advantages compared with Retronectin: (i) Vectofusin-1 is easier to use as it can be added directly into the transduction medium, whereas Retronectin requires a precoating step, which is difficult to standardize, leads to imprecise amounts of additive in relation to cells, and increases the steps of the viral transduction procedure; (ii) binding of CD34+ HSCs to Retronectin-coated surfaces may reduce the yields of cells obtained after transduction in culture bags,[46] a side effect that is not expected with soluble factors like Vectofusin-1; (iii) the cell adhesion induced by Retronectin-coated surfaces may accelerate the differentiation of a subset of stem cells and this step may be better controlled in suspension cultures;[47] (iv) Vectofusin-1 is a relatively small synthetic peptide of 26 amino acids, which is water soluble and can be easily synthesized and purified according to good manufacturing practices for *ex vivo* clinical applications. Interestingly, preliminary experiments suggest that Retronectin and Vectofusin-1 could be combined together to enhance the transduction of hCD34+ cells with LVs, but further experiments are needed to define optimal protocol conditions (data not shown).

In conclusion, Vectofusin-1 represents a new transduction enhancer which has numerous advantages over conventional additives now in widespread use. There are several

potential applications of Vectofusin-1 in technological platforms, preclinical studies or clinical gene therapy applications. Vectofusin-1 could potentially ameliorate protocols for clinical transduction of CD34+ cells using retroviral vectors or LVs.[48] Vectofusin-1 could be used to augment the levels of transduction or the VCN in cells. Alternatively, by enhancing the effects of suboptimal concentrations of vector, Vectofusin-1 could allow the use of lower amounts of vector on the cells thereby reducing cost and potentially toxicity. Based upon these results, we believe that there is strong rationale for future testing of this additive in clinical applications.

Materials and methods

Peptides and reagents. The Vectofusin-1 and SEVI peptides were produced by standard Fmoc solid-phase peptide synthesis, purified by preparative reverse phase high-performance liquid chromatography, and analyzed by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry (Genecust, Dudelange, Luxembourg). Peptide purity was >99%. To promote full fibril formation, the SEVI peptide solution (5 mg/ml in phosphate-buffered saline) was agitated for 4 days at 37 °C at 1,400 rpm with an Eppendorf Thermomixer (Eppendorf, Le Pecq, France). Hexadimethrine bromide (Polybrene), Azidothymidine, Bafilomycin A1, 7-aminoactinomycin D (7-AAD), Trypan Blue, and Triton X-100 were obtained from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). Retronectin was from Ozyme (St-Quentin-en-Yvelines, France).

Cell line culture. HCT116 cells derived from a human colorectal carcinoma (CCL-247; ATCC, Manassas, VA) and 293T cells[4] were cultured at 37 °C, 5% CO_2 in Dulbecco's modified Eagle's medium + glutamax supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Life Technologies, St-Aubin, France).

Viral vector production and vector tittering. HIV-1–derived LVs were generated by transient calcium phosphate transfection of 293T cells with four plasmids as described,[4] consisting of the transfer vector plasmid expressing GFP (pCCLsin-cPPT-hPGK-eGFP-WPRE), the plasmid encoding HIV-1 Rev (pK.Rev), the plasmid encoding HIV-1 gagpol (pKLgagpol), and the appropriate envelope GP construct: pMDG (VSV-G) to generate VSV-G-LVs; pHCMV-RD114TR (modified feline endogenous retrovirus GP) to generate RD114TR-LVs;[5] pBA-Ampho (amphotropic MLV GP) to generate MLV-A-LVs and pBA-GALV ampho-Kana (modified GALV GP) to generate GALVTR-LVs.[5] Unless indicated otherwise, the viral supernatants were collected 48 hours post-transfection, filtered (0.45 µm), aliquoted, and stored at –80 °C before use. 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 either the detection of GFP by flow cytometry (FACSCalibur; BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), with titers expressed as transducing units per milliliter,[49] or using quantitative PCR with titers expressed as ig/ml.[4] LVs containing BLAM-Vpr (BLAM-LVs) and encoding the surface marker ΔNGFR are generated as described above but with a transfer plasmid encoding ΔNGFR (pRRLsin-cPPT-hPGK-ΔNGFR-WPRE, Généthon) and the addition of the BLAM-Vpr expression vector (pCMV4-BlaM-Vpr, plasmid 21950; Addgene, Cambridge, MA)[26] and pAd-VAntage (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Viral supernatants of MLV retroviral vector pseudotyped with the GALV envelope GP were obtained from the producer cell line PG13-MFG-GFP.[50]

Human CD34+ cells culture and transduction. UCB samples and human granulocyte colony-stimulating factor–MPB samples were obtained in accordance with international ethical principles and French national law under declaration N° DC-201-1655 to the French Ministry of Research and Higher Studies. UCB samples were collected from the Centre Hospitalier Sud-Francilien (CHSF) in Evry after uncomplicated births. MPB from adult donors were obtained from the French blood establishment (EFS, Evry, France) or from the Gustave Roussy Institute (IGR, Villejuif, France) following institutional agreements. The hCD34+ progenitors were isolated from UCB or MPB using immunomagnetic selection (Miltenyi Biotec, Paris, France) from the mononuclear cell fraction. The transduction of hCD34+ cells was performed first, by pre-activating the cells overnight in X-vivo 20 medium (Lonza, Levallois-Perret, France) supplemented with cytokines as described previously.[32] Next, pre-activated cells were plated in 48-well plates (2.5×10^4 cells/100 µl). Transduction was initiated by adding 100 µl of LV supernatants mixed with transduction enhancers. Retronectin was used in 48-well plates and was pre-coated overnight (7–20 µg/cm^2) and loaded with viral supernatants (dynamic pre-loading as previously described)[28] before adding the cell suspension (2.5×10^4 cells/per well). At 6 hours post-transduction, viruses and additives were diluted by adding 1 ml of differentiation medium in each well. After 5–6 days, cellular mortality and transduction efficiency were evaluated respectively by 7-AAD labeling and measurement of GFP expression or ΔNGFR expression (anti-CD271 (NGFR) antibody conjugated to APC; Miltenyi Biotec) using flow cytometry (LSRII; BD Biosciences).

CFC assays and VCN determination. CFC assays were performed in duplicate by plating 500 transduced or untransduced cells per milliliter of Methocult (H4434), a complete methylcellulose medium supplemented with human cytokines (Stem Cell Technologies, Grenoble, France), according to the manufacturer's instructions. After 2 weeks of culture, colony-forming unit, erythroid/burst-forming unit, erythroid; colony-forming unit, granulocyte, monocyte; and colony-forming unit, granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte were counted using an inverted microscope with standard visual criteria. The protocols to isolate CFCs, to evaluate the GFP expression, and to determine VCN in each CFC have been described previously.[32]

BLAM-LVs adhesion, fusion, and transduction assay. LV-cell fusion was measured using the BLAM fusion assay.[26] To study concomitantly the adhesion step, the fusion step, and the transduction efficiency of LVs, the BLAM fusion assay was adapted. Briefly, pre-activated hCD34+ cells (1.5×10^5 cells/well) were pre-cooled for 20 minutes at 4 °C. At the same time, VSV-G-BLAM-LVs were incubated for 15 minutes at 4 °C in the absence or in the presence of either SEVI (20 µg/ml, 4.3 µmol/l), Vectofusin-1 (12 µg/ml, 4.3 µmol/l) or

polybrene (6 µg/ml). Cells were then incubated with BLAM-LVs (1.5×10^7 ig/ml, multiplicity of infection 20) for 2.5–3 hours at 4 °C. Next, cells were washed twice with cold phosphate-buffered saline 1x. For each condition, half of the cells were lysed with 100 µl of phosphate-buffered saline 1x containing 1% Triton X-100 and a cocktail of protease inhibitors (Complete; Roche Diagnostics, Meylan, France). In cell lysates, p24 contents were evaluated with an anti-p24 ELISA kit and normalized to total protein contents with the BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). The remaining cells were resuspended in 200 µl of pre-activation medium and cultured for 2–2.5 hours at 37 °C, 5% CO_2. Next an aliquot of the cells was processed for the fusion assay as described previously.[26] Nine days post-transduction, cells were labeled with anti-human ΔNGFR and analyzed using flow cytometry.

Production and monitoring of HIS (BALB-Rag/γC) mice. BALB-Rag/γC mice were housed under pathogen-free conditions at Généthon and treated in accordance with the guidelines of the Animal Ethical Committee under protocol CE11003 (approval dates 1 March 2011–1 March 2012). Briefly, transduced or untransduced hCD34$^+$ cells (10^5 cells/mice) were injected intrahepatically into irradiated BALB-Rag/γC newborn pups. Eleven to thirteen weeks post-injection, HIS (BALB-Rag/γC) mice were euthanized and the engraftment level of human hematopoietic cells was monitored by flow cytometry in the PB, the thymus, the spleen, and the BM. The PB samples were treated with a RBC lysing solution (PharmLys; BD Biosciences). Next, WBCs and also thymus, spleen, and BM cells were resuspended in cold phosphate-buffered saline 1x/0.5% bovine serum albumin solution. In each well, the nonspecific binding was saturated with human γ-globulins. Next, cells were stained with fluorescently conjugated anti-human antibodies and dose-matched fluorescently labeled isotype antibodies according to the manufacturer's instruction. 7-AAD–positive, nonviable cells were excluded from the analysis. For engraftment analyses, we performed a nonparametric Mann–Whitney test.

Supplementary material

Figure S1. Determination of the VCN in hCD34$^+$ cells transduced with various lentiviral pseudotypes.
Figure S2. Transduction of hCD34$^+$ cells isolated from G-CSF–mobilized peripheral blood (MPB) in presence of Vectofusin-1.
Figure S3. hCD34$^+$ transduction levels and engraftment efficiency of transduced cells in HIS (BALB-Rag/γC) mice.
Figure S4. Monitoring of the engraftment of HIS (BALB-Rag/γC) mice.

Acknowledgments. This work was supported by the Association Française contre les Myopathies and the French ministry of research (PGT project: ANR-10-DPBS-01). We thank Généthon collaborators, in particular Armelle Viornery, Roseline Yao, the Flow Cytometry Core for technical assistance, the Bioexperimentation Department and Animal Care Facility for BALB-Rag/γC mice experiments, and the Standardized Production Department for lentiviral production of purified vesicular stomatitis virus-G glycoprotein-lentiviral vectors. We are very grateful to the mothers and staff of the Louise Michel hospital (Evry, France) for providing us with umbilical cord blood samples and to the Gustave Roussy Institute for providing us with mobilized peripheral blood samples. We also thank Fulvio Mavilio (Généthon) and Burkhard Bechinger (University of Strasbourg) for critical reading of the manuscript, Warner Greene (Gladstone Institute) for the pCMV4-BlaM-Vpr plasmid, and François-Loïc Cosset (University of Lyon) for helpful discussions and gift of GALVTR and RD114TR constructs. The authors declared no conflict of interest.

1. D'Costa, J, Mansfield, SG and Humeau, LM (2009). Lentiviral vectors in clinical trials: Current status. *Curr Opin Mol Ther* **11**: 554–564.
2. Naldini, L (2011). Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nat Rev Genet* **12**: 301–315.
3. Cronin, J, Zhang, XY and Reiser, J (2005). Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr Gene Ther* **5**: 387–398.
4. Merten, OW, Charrier, S, Laroudie, N, Fauchille, S, Dugué, C, Jenny, C *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.
5. Sandrin, V, Boson, B, Salmon, P, Gay, W, Nègre, D, Le Grand, R *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.
6. Cornetta, K and Anderson, WF (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.
7. Toyoshima, K and Vogt, PK (1969). Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions. *Virology* **38**: 414–426.
8. Vogt, PK (1967). DEAE-dextran: enhancement of cellular transformation induced by avian sarcoma viruses. *Virology* **33**: 175–177.
9. Innes, CL, Smith, PB, Langenbach, R, Tindall, KR and Boone, LR (1990). Cationic liposomes (Lipofectin) mediate retroviral infection in the absence of specific receptors. *J Virol* **64**: 957–961.
10. Hodgson, CP and Solaiman, F (1996). Virosomes: cationic liposomes enhance retroviral transduction. *Nat Biotechnol* **14**: 339–342.
11. Wurm, M, Schambach, A, Lindemann, D, Hanenberg, H, Ständker, L, Forssmann, WG *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.
12. Davis, HE, Rosinski, M, Morgan, JR and Yarmush, ML (2004). Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophys J* **86**: 1234–1242.
13. Roan, NR, Münch, J, Arhel, N, Mothes, W, Neidleman, J, Kobayashi, A *et al.* (2009). The cationic properties of SEVI underlie its ability to enhance human immunodeficiency virus infection. *J Virol* **83**: 73–80.
14. Moritz, T, Patel, VP and Williams, DA (1994). Bone marrow extracellular matrix molecules improve gene transfer into human hematopoietic cells via retroviral vectors. *J Clin Invest* **93**: 1451–1457.
15. Moritz, T, Dutt, P, Xiao, X, Carstanjen, D, Vik, T, Hanenberg, H *et al.* (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.
16. Hanenberg, H, Xiao, XL, Dilloo, D, Hashino, K, Kato, I and Williams, DA (1996). Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med* **2**: 876–882.
17. Haas, DL, Case, SS, Crooks, GM and Kohn, DB (2000). Critical factors influencing stable transduction of human CD34(+) cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Mol Ther* **2**: 71–80.
18. 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 USA* **100**: 1564–1568.
19. Bechinger, B, Vidovic, V, Bertani, P and Kichler, A (2011). A new family of peptide-nucleic acid nanostructures with potent transfection activities. *J Pept Sci* **17**: 88–93.
20. Mason, AJ, Gasnier, C, Kichler, A, Prévost, G, Aunis, D, Metz-Boutigue, MH *et al.* (2006). Enhanced membrane disruption and antibiotic action against pathogenic bacteria by designed histidine-rich peptides at acidic pH. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 3305–3311.
21. Mason, AJ, 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.
22. Marquette, A, Mason, AJ and Bechinger, B (2008). Aggregation and membrane permeabilizing properties of designed histidine-containing cationic linear peptide antibiotics. *J Pept Sci* **14**: 488–495.

23. Mason, AJ, Moussaoui, W, Abdelrahman, T, Boukhari, A, Bertani, P, Marquette, A *et al.* (2009). Structural determinants of antimicrobial and antiplasmodial activity and selectivity in histidine-rich amphipathic cationic peptides. *J Biol Chem* **284**: 119–133.
24. Langlet-Bertin, B, Leborgne, C, Scherman, D, Bechinger, B, Mason, AJ and Kichler, A (2010). Design and evaluation of histidine-rich amphipathic peptides for siRNA delivery. *Pharm Res* **27**: 1426–1436.
25. Ferrer-Miralles, N, Vázquez, E and Villaverde, A (2008). Membrane-active peptides for non-viral gene therapy: making the safest easier. *Trends Biotechnol* **26**: 267–275.
26. Cavrois, M, De Noronha, C and Greene, WC (2002). A sensitive and specific enzyme-based assay detecting HIV-1 virion fusion in primary T lymphocytes. *Nat Biotechnol* **20**: 1151–1154.
27. Cavrois, M, Neidleman, J, Bigos, M and Greene, WC (2004). Fluorescence resonance energy transfer-based HIV-1 virion fusion assay. *Methods Mol Biol* **263**: 333–344.
28. Jacome, A, Navarro, S, Río, P, Yañez, RM, González-Murillo, A, Lozano, ML *et al.* (2009). Lentiviral-mediated genetic correction of hematopoietic and mesenchymal progenitor cells from Fanconi anemia patients. *Mol Ther* **17**: 1083–1092.
29. Relander, T, Johansson, M, Olsson, K, Ikeda, Y, Takeuchi, Y, Collins, M *et al.* (2005). Gene transfer to repopulating human CD34+ cells using amphotropic-, GALV-, or RD114-pseudotyped HIV-1-based vectors from stable producer cells. *Mol Ther* **11**: 452–459.
30. Münch, J, Rücker, E, Ständker, L, Adermann, K, Goffinet, C, Schindler, M *et al.* (2007). Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell* **131**: 1059–1071.
31. Pollok, KE, van Der Loo, JC, Cooper, RJ, Hartwell, JR, Miles, KR, Breese, R *et al.* (2001). Differential transduction efficiency of SCID-repopulating cells derived from umbilical cord blood and granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood. *Hum Gene Ther* **12**: 2095–2108.
32. Charrier, S, Ferrand, M, Zerbato, M, Précigout, G, Viornery, A, Bucher-Laurent, S *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.
33. Legrand, N, Weijer, K and Spits, H (2008). Experimental model for the study of the human immune system: production and monitoring of "human immune system" Rag2-/-gamma c-/- mice. *Methods Mol Biol* **415**: 65–82.
34. Georgescu, J, Munhoz, VH 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.
35. Bonini, C, Grez, M, Traversari, C, Ciceri, F, Marktel, S, Ferrari, G *et al.* (2003). Safety of retroviral gene marking with a truncated NGF receptor. *Nat Med* **9**: 367–369.
36. de la Vega, M, Marin, M, Kondo, N, Miyauchi, K, Kim, Y, Epand, RF *et al.* (2011). Inhibition of HIV-1 endocytosis allows lipid mixing at the plasma membrane, but not complete fusion. *Retrovirology* **8**: 99.
37. Jha, NK, Latinovic, O, Martin, E, Novitskiy, G, Marin, M, Miyauchi, K *et al.* (2011). Imaging single retrovirus entry through alternative receptor isoforms and intermediates of virus-endosome fusion. *PLoS Pathog* **7**: e1001260.
38. Miyauchi, K, Kim, Y, Latinovic, O, Morozov, V and Melikyan, GB (2009). HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell* **137**: 433–444.
39. Chien, MP, Lin, CH and Chang, DK (2009). Recruitment of HIV-1 envelope occurs subsequent to lipid mixing: a fluorescence microscopic evidence. *Retrovirology* **6**: 20.
40. Frecha, C, Costa, C, Nègre, D, Gauthier, E, Russell, SJ, Cosset, FL *et al.* (2008). 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.
41. Funke, S, Schneider, IC, Glaser, S, Mühlebach, MD, Moritz, T, Cattaneo, R *et al.* (2009). Pseudotyping lentiviral vectors with the wild-type measles virus glycoproteins improves titer and selectivity. *Gene Ther* **16**: 700–705.
42. Enkirch, T, Kneissl, S, Hoyler, B, Ungerechts, G, Stremmel, W, Buchholz, CJ *et al.* (2013). Targeted lentiviral vectors pseudotyped with the Tupaia paramyxovirus glycoproteins. *Gene Ther* **20**: 16–23.
43. Funke, S, Maisner, A, Mühlebach, MD, Koehl, U, Grez, M, Cattaneo, R *et al.* (2008). Targeted cell entry of lentiviral vectors. *Mol Ther* **16**: 1427–1436.
44. Anliker, B, Abel, T, Kneissl, S, Hlavaty, J, Caputi, A, Brynza, J *et al.* (2010). Specific gene transfer to neurons, endothelial cells and hematopoietic progenitors with lentiviral vectors. *Nat Methods* **7**: 929–935.
45. Münch, RC, Mühlebach, MD, Schaser, T, Kneissl, S, Jost, C, Plückthun, A *et al.* (2011). DARPins: an efficient targeting domain for lentiviral vectors. *Mol Ther* **19**: 686–693.
46. Lamers, CH, van Elzakker, P, van Steenbergen, SC, Sleijfer, S, Debets, R and Gratama, JW (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.
47. Guilak, F, Cohen, DM, Estes, BT, Gimble, JM, Liedtke, W and Chen, CS (2009). Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. *Cell Stem Cell* **5**: 17–26.
48. Galy, A and Thrasher, AJ (2011). Gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **11**: 545–550.
49. Kutner, RH, Zhang, XY and Reiser, J (2009). Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nat Protoc* **4**: 495–505.
50. Merten, OW (2004). State-of-the-art of the production of retroviral vectors. *J Gene Med* **6** (suppl. 1): S105–S124.

Molecular Therapy–Nucleic Acids **is an open-access journal published by** ***Nature Publishing Group.*** **This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivative Works 3.0 License. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/**

Supplementary Information accompanies this paper on the Molecular Therapy–Nucleic Acids website (http://www.nature.com/mtna)

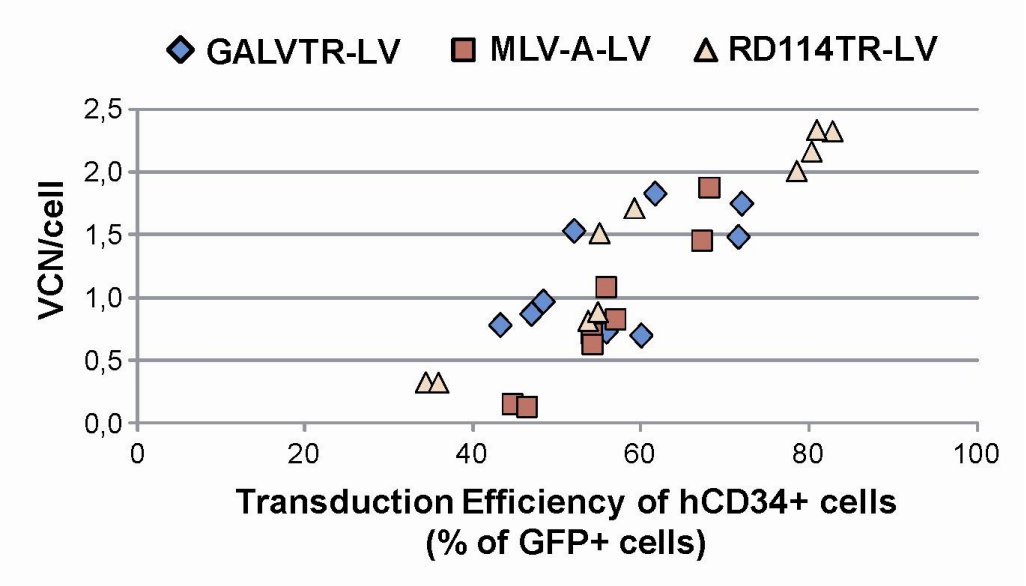


Figure S1. Determination of the VCN in hCD34+ cells transduced with various lentiviral pseudotypes. Pre-activated hCD34+ cells were transduced 6 hours with various titers of GALVTR-LV (diamond), MLV-A-LV (square) or RD114TR-LV (triangle) in presence of Vectofusin-1 (12µg/ml). After 5 days, transduction efficiencies were determined by monitoring the percentage of GFP+ cells. Next, hCD34+ cell genomic DNAs were extracted and the VCN values were determined using Taqman qPCR on HIV-1 Psi sequence normalized to albumin gene expression levels.

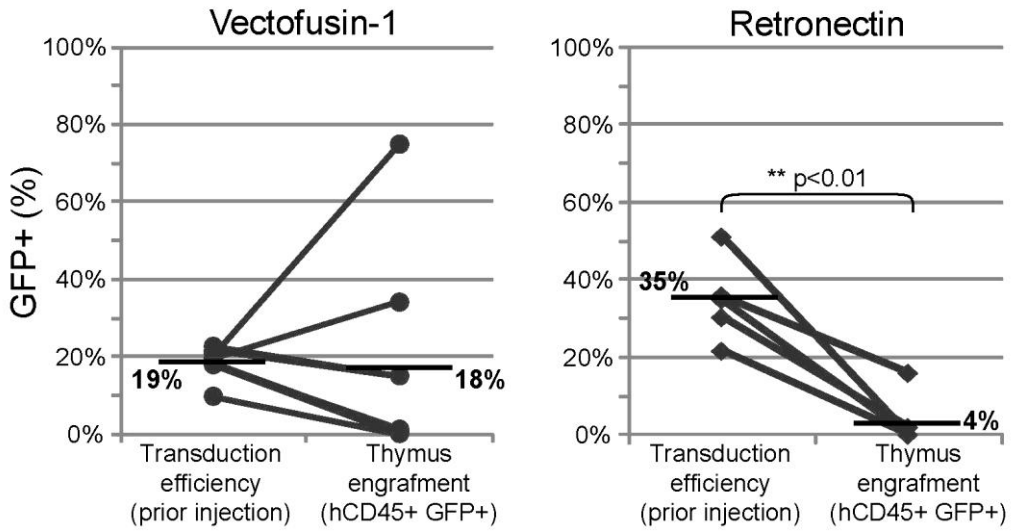


Figure S2. Comparison between hCD34+ transduction levels and engraftment efficiency of transduced cells in HIS (BALB-Rag/gC) mice. Transduction efficiencies of hCD34+ cells (% GFP+) were obtained 5 days post-transduction and were compared with the level of engraftment after 12 weeks of hCD45+ GFP+ cells in the thymus of HIS (BALB-Rag/gC) mice, for cells transduced either in presence of Vectofusin-1 (Left panel) or Retronectin (right panel)(no statistical difference for the Vectofusin-1 condition; $p<0.01$ for the Retronectin condition using unpaired student's t-test).

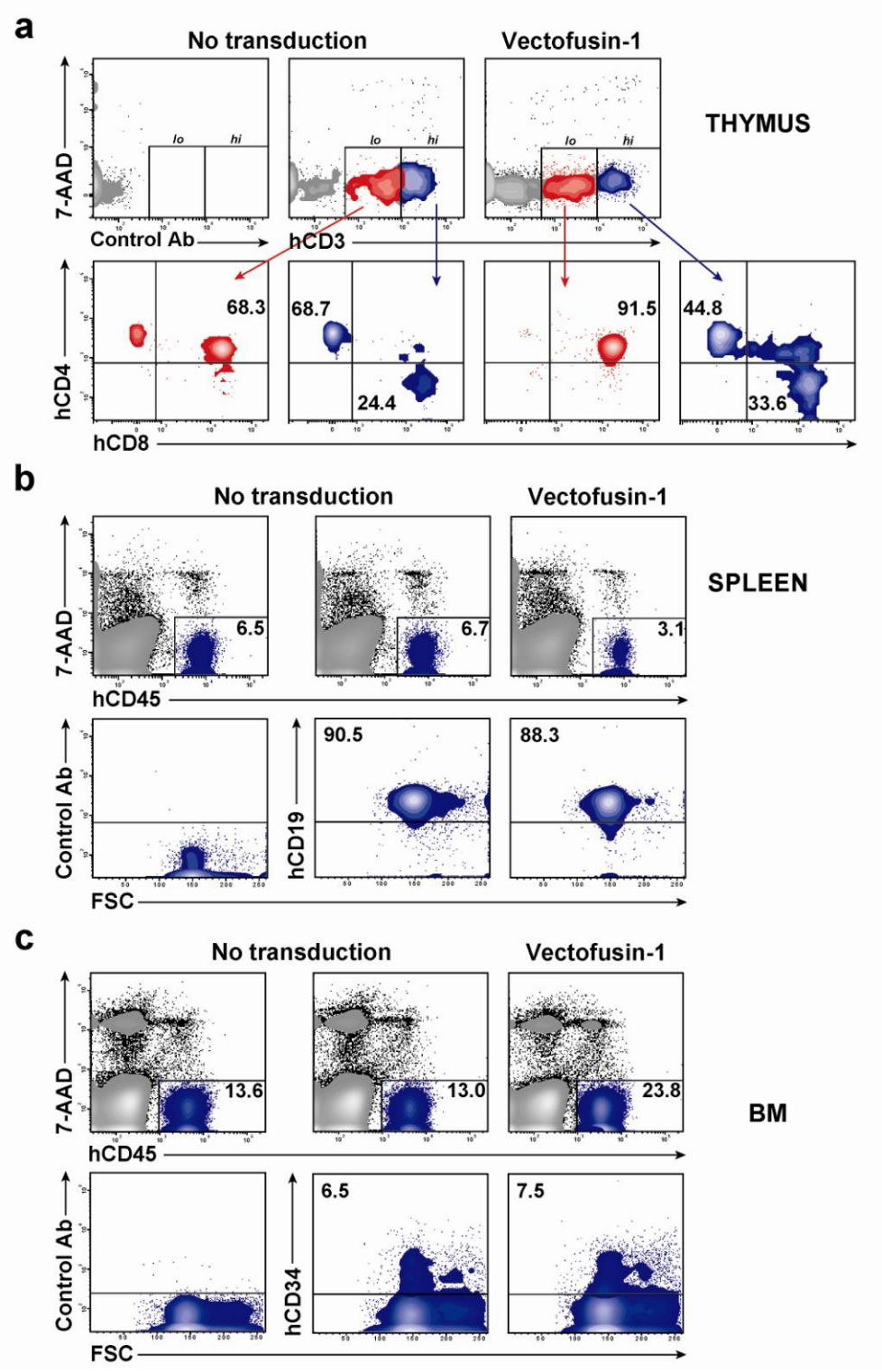


Figure S3. Monitoring of the engraftment of HIS (BALB-Rag/gC) mice. Gating strategies used for the analysis of human CD4 and CD8 T cells isolated from the thymus (**a**); the analysis of human B cells (hCD19) isolated from the spleen (**b**) and the analysis of human CD34+ hematopoietic progenitors isolated from the mouse bone marrow (BM) (**c**).

II.B- Etude des effets des additifs de culture sur la fusion et la transduction de cellules primaires CD34+ avec des vecteurs lentiviraux

Nous avons adapté un essai fusion basé sur la technique du transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes (FRET), initialement développée pour l'étude de l'entrée du VIH-1, pour mesurer l'entrée de vecteurs lentiviraux recombinants et non-réplicatifs dans des cellules cibles dont des cellules souches hématopoïétiques et pour quantifier le niveau de transduction dans la même population cellulaire. Cet essai utilise des vecteurs lentiviraux recombinants dérivés du VIH-1 contenant les protéines chimériques β-lactamase (BLAM)-Vpr (BLAM-LV) et codant une forme tronquée du récepteur au facteur de croissance nerveuse (ΔNGFR). Lors de la transduction de cellules cibles avec ces vecteurs, pseudotypés avec la glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV-G-BLAM-LV), la fusion entre les membranes virale et cellulaire peut être mesurée lorsque BLAM entre dans le cytoplasme de la cellule cible et clive un substrat fluorescent, le CCF2, préalablement chargé dans la cellule cible. Une partie des cellules provenant de la même population cellulaire infectée est conservée en culture. Dans un second temps, la détection de l'expression du transgène ΔNGFR, par une étape d'immunomarquage, permet de mesurer le pourcentage de cellules transduites. Cet essai fusion BLAM-LV permet donc d'étudier de façon concomitante la fusion et la transduction des cellules cibles avec des LV. Cet essai nous a permis de montrer que les LV sont soumis à une restriction post-entrée forte dans les cellules hématopoïétiques, que ce soit dans des lymphocytes T immortalisées ou bien des CSH CD34+. Nous montrons également que cette inhibition post-entrée peut être partiellement saturée après une forte augmentation de la multiplicité d'infection ou lorsque des additifs de culture, comme la Vectofusin-1 ou la Retronectin®, sont utilisés pour promouvoir les niveaux de transduction. Cette technique représente donc un nouvel outil sensible et efficace pour étudier de façon concomitante l'étape de fusion et le niveau de transduction dans les cellules cibles. A terme, ce travail permettra une meilleure compréhension de la biologie des LV mais pourra également conduire à l'élaboration de protocoles de transduction lentivirale plus efficaces.

L'ensemble de ces résultats est présenté dans l'article 2.

ARTICLE 2

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

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

Human Gene Therapy Methods24:1-9 (2013)
doi:10.1089/hgtb.2013.090

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

Dina Ingrao[1,2,3], Saliha Majdoul[1,2,3], Ababacar K. Seye[1,2], Anne Galy[1,2,3*] and David Fenard[1,2,3*]

[1]Généthon, F-91002 Evry, France; [2]INSERM UMR_S951, Généthon, F-91002 Evry, France; [3]Université Evry Val d'Essonne, UMR_S951, Evry, France.

Running title: Concurrent study of lentiviral fusion/transduction

*Co-corresponding authors:

David Fenard, PhD

Généthon, INSERM UMR_S951,

1bis, rue de l'Internationale – BP60, F-91002 Evry Cedex, France

Tel. : +33 1 69 47 25 31

E-mail address: dfenard@genethon.fr

or

Anne Galy, PhD

Généthon, INSERM UMR_S951,

1bis, rue de l'Internationale – BP60, F-91002 Evry Cedex, France

Tel. : +33 1 69 47 34 40

E-mail address: galy@genethon.fr

ABSTRACT

Lentivirals vectors (LVs) are used for various gene transfer applications, notably for hematopoietic gene therapy, but methods are lacking to precisely evaluate parameters that control the efficiency of transduction in relation with the entry of vectors into target cells. We adapted a fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based HIV-1 fusion assay to measure the entry of non-replicative 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 (ΔNGFR). Following 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 ΔNGFR expression. This LV-based fusion/transduction assay is a dynamic and versatile tool, revealing for instance the post-entry 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 like Vectofusin®-1 or Retronectin® can partially relieve the post-entry block but their effects differ in the way to promote LV entry. In conclusion, one such assay should be useful to study hematopoietic post-entry restrictions directed against LVs and therefore should allow improvements in various LV-based gene therapy protocols.

INTRODUCTION

Human 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 post-entry 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 (Anliker *et al.,* 2010; Frecha *et al.,* 2008b). Another strategy to improve the entry step is the addition of cofactors during the transduction procedure, such as cationic polymers (*e.g.* polybrene (Cornetta and Anderson 1989; Toyoshima and Vogt 1969), DEAE-Dextran (Vogt 1967) or cationic peptides (e.g. Vectofusin®-1 (Fenard *et al.,* 2013b), Retronectin® (Pollok and Williams 1999), protamine sulphate (Cornetta and Anderson 1989), human Semen Enhancer of Viral Infection (SEVI) (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, virus/cell fusion and/or to promote virus aggregation (Davis *et al.,* 2004; Fenard *et al.,* 2013b; Pollok and Williams 1999; Roan *et al.,* 2009; Yolamanova *et al.,* 2013).

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 post-entry restrictions have been extensively studied in HIV-1-infected T cells, macrophages and monocytes from different species, with the identification of major antiviral factors like SAMHD1, tetherin, TRIM5α, the APOBEC3 family (for reviews, see (Duggal and Emerman 2012; Harris *et al.,* 2012; Wolf and Goff 2008)) and some DNA repair pathways (Fenard *et al.,* 2009; Lau *et al.,* 2004; Lloyd *et al.,* 2006; Weil *et al.,* 2013; Yoder *et al.,* 2006). 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 (Santoni de Sio *et al.,* 2006; Santoni de Sio *et al.,* 2008; Zhang *et al.,* 2005; Zhang *et al.,* 2007).

To evaluate the extent of post-entry restriction into HSPCs and to study the effect of transduction enhancers on entry and post-entry 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 FRET-based fusion assay (Cavrois *et al.,* 2002), adapted to study non replicative LVs and recombinant transgene expression, we show that LVs are subjected to a strong post-fusion restriction in human hematopoietic cells, either immortalized T lymphocytes or HSPCs expressing the hCD34+ marker. This post-fusion restriction can be partially saturated when increasing amounts of LVs are used in the assay and/or when transduction enhancers like Vectofusin-1 or Retronectin are used in the transduction protocol.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

CCF2-AM substrate and the CO_2-independent medium were purchased from Life Technologies (St-Aubin, France). Bovine Serum albumin (BSA), 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-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), HIV-1 gagpol (pKLgagpol) were described in (Merten *et al.*, 2011). The lentiviral transfer plasmid pRRL-PGK-ΔNGFR was constructed based on the pRRLsin-cPPT-hPGK-GFP-WPRE by substituting the GFP coding sequence, after digestion with BamHI and SalI, with that of ΔNGFR coding sequence obtained by PCR 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.*) were cultured at 37°C, 5% CO_2 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+ cells culture

Umbilical cord blood (UCB) samples were obtained in accordance with international ethical principles and French national law under declaration N° DC-201-1655 to the French Ministry of Research and Higher Studies. UCB samples were collected from the Centre Hospitalier Sud-Francilien (CHSF) in Evry after uncomplicated births. The hCD34+ cells were obtained by immunomagnetic selection (Miltenyi Biotec) from the mononuclear cell fraction of UCB. The preactivation of hCD34+ cells was performed 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 µg/ml streptomycin and 2mM L-glutamine (Life Technologies), SCF (25 ng/ml), Flt-3 ligand (50 ng/ml), TPO (25 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml) (Miltenyi Biotec).

Viral vector production and vector titering

HIV-1 derived lentiviral vectors were generated by transient calcium phosphate transfection of 293T cells with a 6-plasmid vector system as described in Supplemental Table 1. The viral supernatants were collected 48 h post-transfection, filtered (0.45 µm), 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 PCR on genomic DNA of serially infected HCT116 cells as described previously (Merten *et al.*). Physical particle titers were determined by measuring HIV-1 p24 capsid contents using a commercial ELISA kit (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France).

Fusion and transduction assay

HCT116 cells (4 x 10^5 plated cells/well), Jurkat T cells (5 x 10^5 cells/well) or pre-activated hCD34+ cells (7 × 10^4 cells/well) were incubated with VSV-G-BLAM-LVs for 2.5 h at 37°C, 5% CO2. For

Retronectin conditions, LV particles were pre-adsorbed on plate-bound Retronectin (7µg/cm^2) for 2 h and hCD34+ cells were subsequently added in the well for 2.5 h at 37°C, 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 to 7 days, while the remaining cells were processed for the fusion assay (Cavrois *et al.*, 2004). Briefly, cells were washed with 200 µl of CO_2-independent medium and incubated with 100 µl of CCF2/AM loading solution for 1 h at room temperature in the dark. After the loading step, cells were washed and incubated with 200 µl of CO_2-independent medium supplemented with 10% FCS and 2.5 mM probenecid, for 16 h at room temperature in the dark. Cells were then washed with PBS1x and fixed with 1.2% PFA. The change in emission fluorescence of CCF2 was monitored by flow cytometry using an LSRII and data were analyzed with DiVa software (BD Biosciences). To evaluate the level of transduction, cells maintained in culture for 4 to 7 days were washed and the nonspecific binding on hCD34+ cells was prevented by pre-incubating the cells with human γ-globulins. Next, cells were labeled for 30 min at 4°C with Allophycocyanin (APC)-conjugated anti-human LNGFR (Miltenyi Biotech). Cells were then washed and analyzed by flow cytometry.

RESULTS

Production of LVs containing BLAM-Vpr and encoding ΔNGFR (BLAM-LVs)

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 non-replicative 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 (lentiviral vectors carrying the fusion protein BLAM-Vpr) were designed to encode a truncated form of the low affinity nerve growth factor receptor (ΔNGFR) (Bonini *et al.,* 2003; Rudoll *et al.,* 1996) 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 6-plasmid vector system (Figure 1 and Supplemental Table 1). 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 ΔNGFR. For BLAM-LV production, two other plasmids have to be included (Supplemental Table 1). The plasmid pCMV4-BLAM-Vpr, encoding the BLAM enzyme fused to the HIV-1 Vpr protein, specifically incorporated into lentiviral particles through its interaction with the p6 region of HIV-1 p55gag (Kondo *et al.,* 1995; Paxton *et al.,* 1993) and the pAdVAntage™ plasmid, encoding adenoviral VAI/VAII RNAs, acting as specific inhibitors of the Protein Kinase R (Supplemental Table 1). 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 ΔNGFR-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 (Figure 1).

Concurrent study of the lentiviral fusion and transduction of hematopoietic and non-hematopoietic cell lines.

First, the BLAM-LV assay has been performed on adherent HCT116 cells (Fig. 2A), a non-hematopoietic cell line, highly permissive to VSV-G lentiviral peudotypes. As shown in Figure 2, the use of only 3.8 x 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 two hours 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 Figure 3A, the use of 7.5 x 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 artefact since the transduction efficiencies obtained with Jurkat cells at 7.5 x 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 h which results in low levels of detectable vector-infected cells (6%) (Fig.4). As expected, this percentage was downregulated in 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 post-fusion restrictions into target cells and shows that these restrictions are cell-type dependent and sensitive to the amount of LVs used in the assay.

Effect of hCD34+ HSPCs 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 absence (Mock) or presence of cytokines and transduced in parallel during 2.5 h 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 to 39% of cleaved CCF2+ cells). In addition, cytokines also enhanced the transduction efficiency (Fig.5B) to the same extent as fusion (16 to 23% of ΔNGFR+ 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 post-fusion 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 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 absence or presence of the culture additives (Fig. 6A and B). The average F/T ratios calculated for each condition were plotted on a 2-D contour chart (Fig. 6C). The lines in the contour chart delineate different F/T ratios ranging from 1-5 fold 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 post-entry restrictions (Fig. 6C). Such effects of increasing concentrations of LVs are also found on Jurkat cells, as observed in Figure 2. In presence of Retronectin, the level of lentiviral fusion is not statistically different from the control conditions in absence of additive (Fig.6A), while 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 post-entry restrictions without the need to increase LV input. This Vectofusin-1 effect on the F/T ratio is observed at the optimal concentration of 12µg/ml but is also effective at concentrations as low as 6µg/ml (Supplemental Fig.1). As shown in Figure 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 h (Fig. 7). The fusion 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 like Vectofusin-1 or Retronectin. Although both improve transduction, they utilize different mechanisms of action, acting mainly on the fusion and consequently on the post-fusion steps for Vectofusin-1, while Retronectin seems to act mainly on the post-fusion steps.

DISCUSSION

In this report, an HIV-1 viral fusion assay was adapted to study non-replicative lentiviral vectors (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 a lot more efficient than the effective transduction level achieved, revealing post-entry 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 (Fenard *et al.,* 2013a; Kichler *et al.,* 2013; Lam *et al.,* 2012; Mason *et al.,* 2006), is a new culture additive that potently enhances the fusion and transduction of HSPCs with LVs (Fenard *et al.,* 2013b). Using this additive, post-entry 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, this latter was shown to act mainly on post-entry 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 sub-domains CS-1 and cell binding domain (CBD) respectively (Horiuchi *et al.*, 2009; Yokota *et al.*, 1998).

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 post-entry 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 post-entry 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 (Anliker *et al.*, 2010; Frecha *et al.*, 2008b) could be a way to avoid post-entry restrictions. For instance, envelope GPs harboring a strong hematopoietic-tropism, like 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: i) to evaluate the degree of post-entry restriction for various LV pseudotypes into attractive target cells (e.g. HSPCs, lymphocytes); ii) to determine which cells are targeted during the entry process in comparison with cells that are really transduced in the same bulk population; iii) to better characterize culture additives that are able to improve the adhesion and fusion steps of LVs; iv) to better define and develop compounds that can attenuate or abrogate the post-entry 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 manuscript. 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. We also thank Warner C. Greene for the pCMV4-BlaM-Vpr plasmid and Veronique Parietti for constructing the pRRL-PGK-ΔNGFR.

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, 929-35.

Bonini C., Grez M., Traversari C., *et al.* (2003). Safety of retroviral gene marking with a truncated NGF receptor. Nat. Med. 9, 367-9.

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, 1151-4.

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, 333-44.

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, 479-87.

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, 4129-38.

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, 187-94.

D'Costa J., Mansfield S.G., and Humeau L.M. (2009). Lentiviral vectors in clinical trials: Current status. Curr. Opin. Mol. Ther. 11, 554-64.

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, 1234-42.

Duggal N.K., and Emerman M. (2012). Evolutionary conflicts between viruses and restriction factors shape immunity. Nat. Rev. Immunol. 12, 687-95.

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, 375-8.

Fenard D., Houzet L., Bernard E., *et al.* (2009). Uracil DNA Glycosylase 2 negatively regulates HIV-1 LTR transcription. Nucleic Acids Res. 37, 6008-18.

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. doi:10.1038/mtna.2013.17.

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, 4843-52.

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, 5975-85.

Frecha C., Szecsi J., Cosset F.L., and Verhoeyen E. (2008b). Strategies for targeting lentiviral vectors. Curr. Gene Ther. 8, 449-60.

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, 2332-8.

Harris R.S., Hultquist J.F., and Evans D.T. (2012). The restriction factors of human immunodeficiency virus. J. Biol. Chem. 287, 40875-83.

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, 777-83.

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, 2759-64.

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, 3421-9.

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, 320-2.

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, 343-56.

Naldini L. (2011). Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. Nat. Rev. Genet. 12, 301-15.

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

Pernod G., Fish R., Liu J.W., and Kruithof E.K. (2004). Increasing lentiviral vector titer using inhibitors of protein kinase R. Biotechniques 36, 576-8, 580.

Pollok K.E., and Williams D.A. (1999). Facilitation of retrovirus-mediated 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, 823-32.

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, 4257-65.

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, 2142-52.

Toyoshima K., and Vogt P.K. (1969). Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions. Virology 38, 414-26.

Vogt P.K. (1967). DEAE-dextran: enhancement of cellular transformation induced by avian sarcoma viruses. Virology 33, 175-7.

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. U.S.A 110, E448-57.

Wolf D., and Goff S.P. (2008). Host restriction factors blocking retroviral replication. Annu. Rev. Genet. 42, 143-63.

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, 137-46.

Yamazaki S., Iwama A., Morita Y., *et al.* (2007). Cytokine signaling, lipid raft clustering, and HSC hibernation. Ann. N.Y. 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. U.S.A 103, 4622-7.

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, 3263-72.

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, 130-6.

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, 1444-52.

Zhang J., Scadden D.T., and Crumpacker C.S. (2007). Primitive hematopoietic cells resist HIV-1 infection via p21. J. Clin. Invest. 117, 473-81.

FIGURE LEGENDS

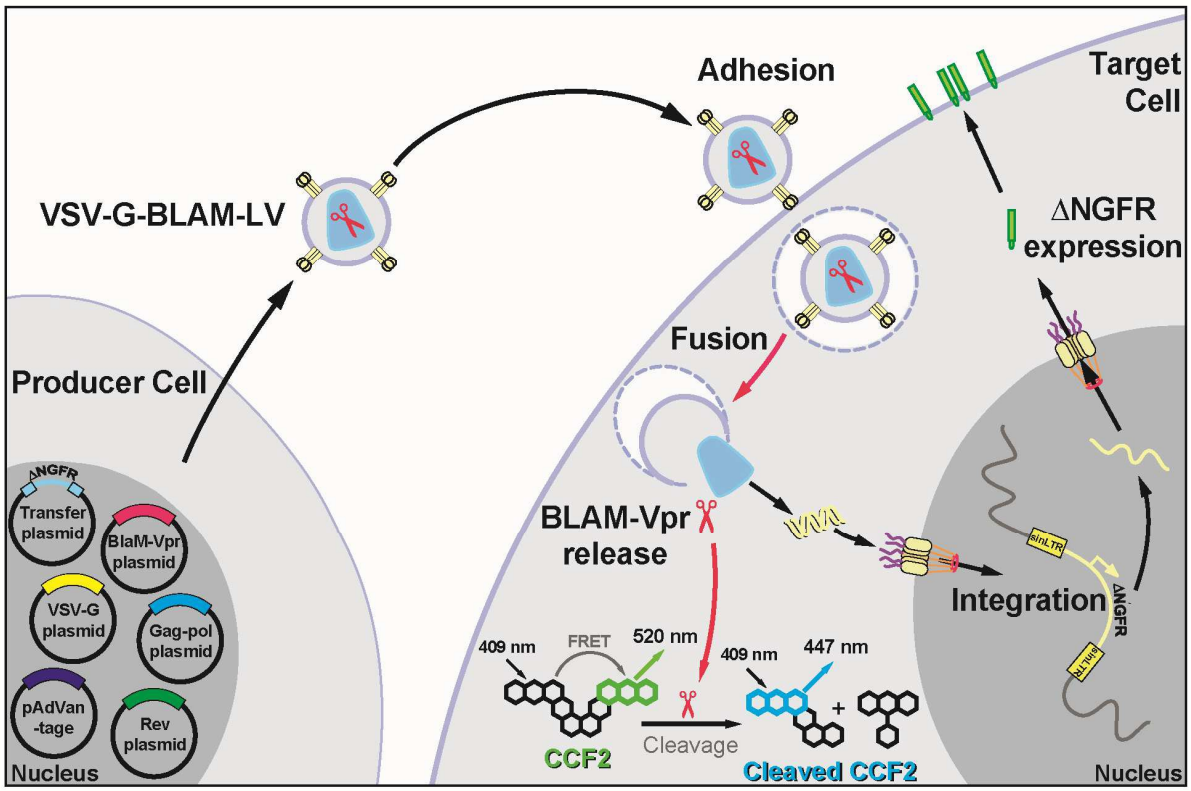


Figure 1. Schematic representation of the BLAM-LV system. Representation of the VSV-G-BLAM-LV production using a 6-plasmid vector system (left) and the target cell transduction with VSV-G-BLAM-LVs (right) allowing the concurrent study of the fusion efficiency (CCF2 cleavage) and the transduction efficiency (ΔNGFR expression at the cell surface).

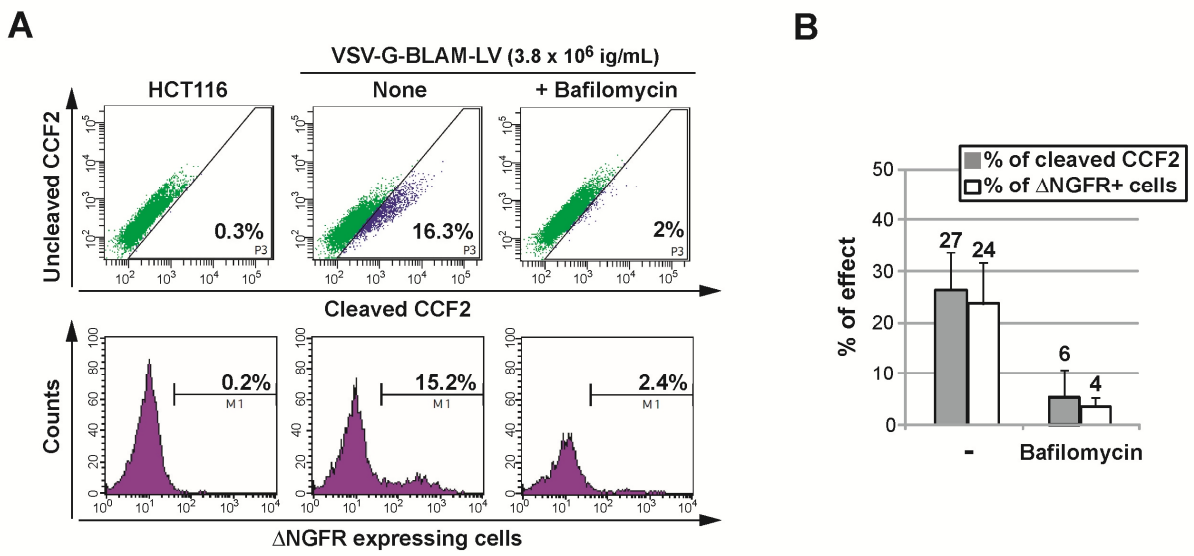


Figure 2. Concurrent study of VSV-G-BLAM-LV fusion/transduction with a non-hematopoietic cell line (**A**) Analysis of VSV-G-BLAM-LV fusion in the HCT116 human colorectal cancer cell line (Upper panels). Analysis of the cell transduction (day 5) with VSV-G-BLAM-LVs following ΔNGFR expression at the surface of HCT116 cells (Lower panels). (**B**) Histograms are representing the average fusion (gray) and transduction (white) efficiency obtained for HCT116 cells ± Standard Deviations (SD) (n=3).

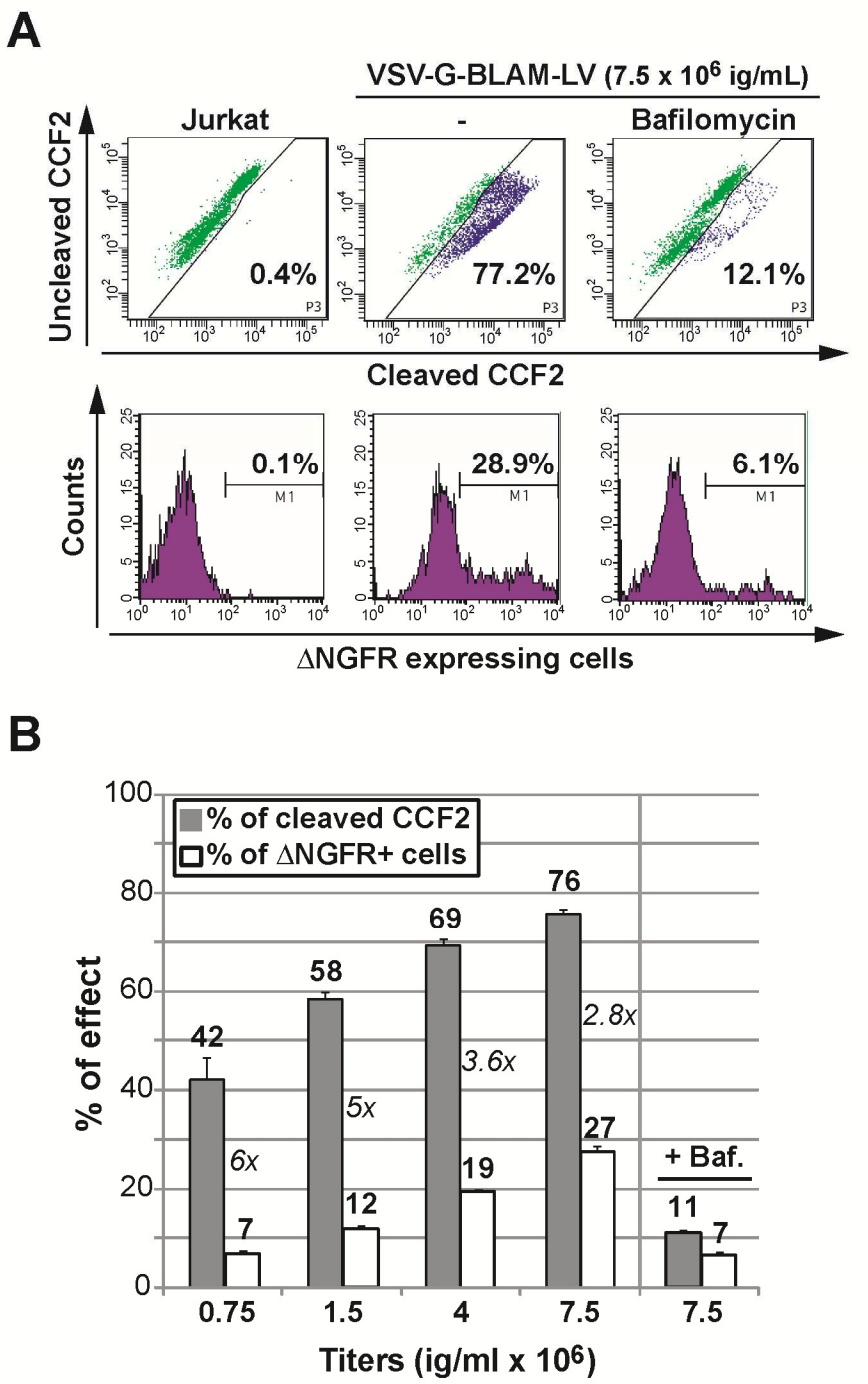


Figure 3. Concurrent study of VSV-G-BLAM-LV fusion/transduction with an immortalized human T cell line (**A**) Analysis of the fusion and the transduction of Jurkat T cells with VSV-G-BLAM-LV. The fusion positive cell gate was established based on untransduced living cells loaded with the CCF2 substrate (upper left panel). In 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 ΔNGFR 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.

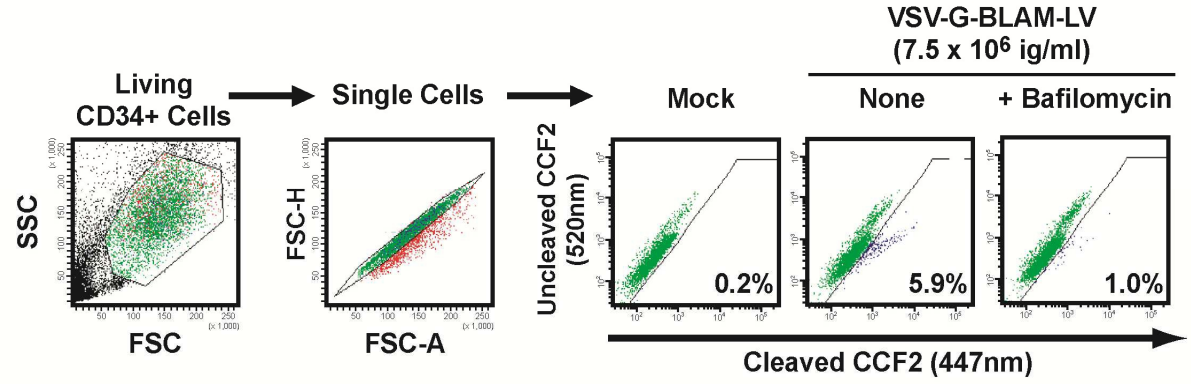


Figure 4. Gating strategy for analysis of hCD34$^+$ cells transduced with VSV-G-BLAM-LVs. Pre-activated hCD34$^+$ cells were left untransduced (Mock) or were transduced with VSV-G-BLAM-LVs for 2 h at 37°C in the absence (None) or presence of a fusion inhibitor (Bafilomycin A1, 150nM). Subsequently, the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

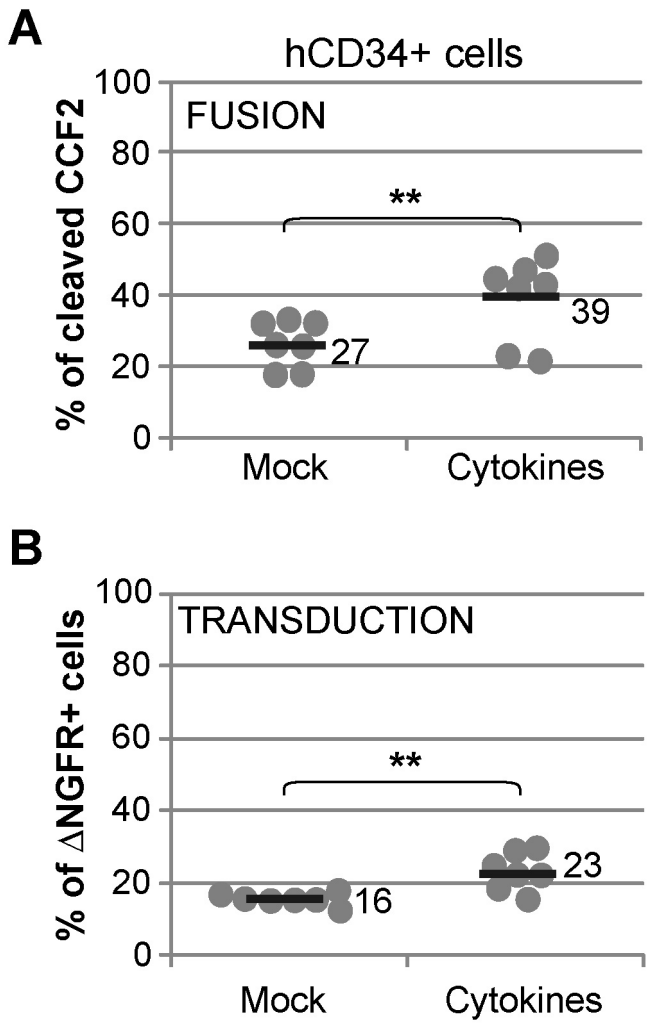


Figure 5. Effect of hCD34+ cells prestimulation on the efficiency of lentiviral fusion and transduction. hCD34+ cells, cultured overnight in absence (Mock) or presence of a cocktail of cytokines (see material and methods section), were incubated 2.5 h with VSV-G-BLAM-LVs (10^8 ig/ml), pre-coated 2 h on plate-bound Retronectin (7 µg/cm^2). The viral fusion and transduction efficiency were estimated by measuring the level of cleaved CCF2 substrate (**A**) and the level of ΔNGFR expression (**B**) respectively. Data are obtained from 5 different cord blood donors in simplicate or duplicate. Bars indicate the mean value of the distributions (** $p<0.01$, bilateral paired student T-test).

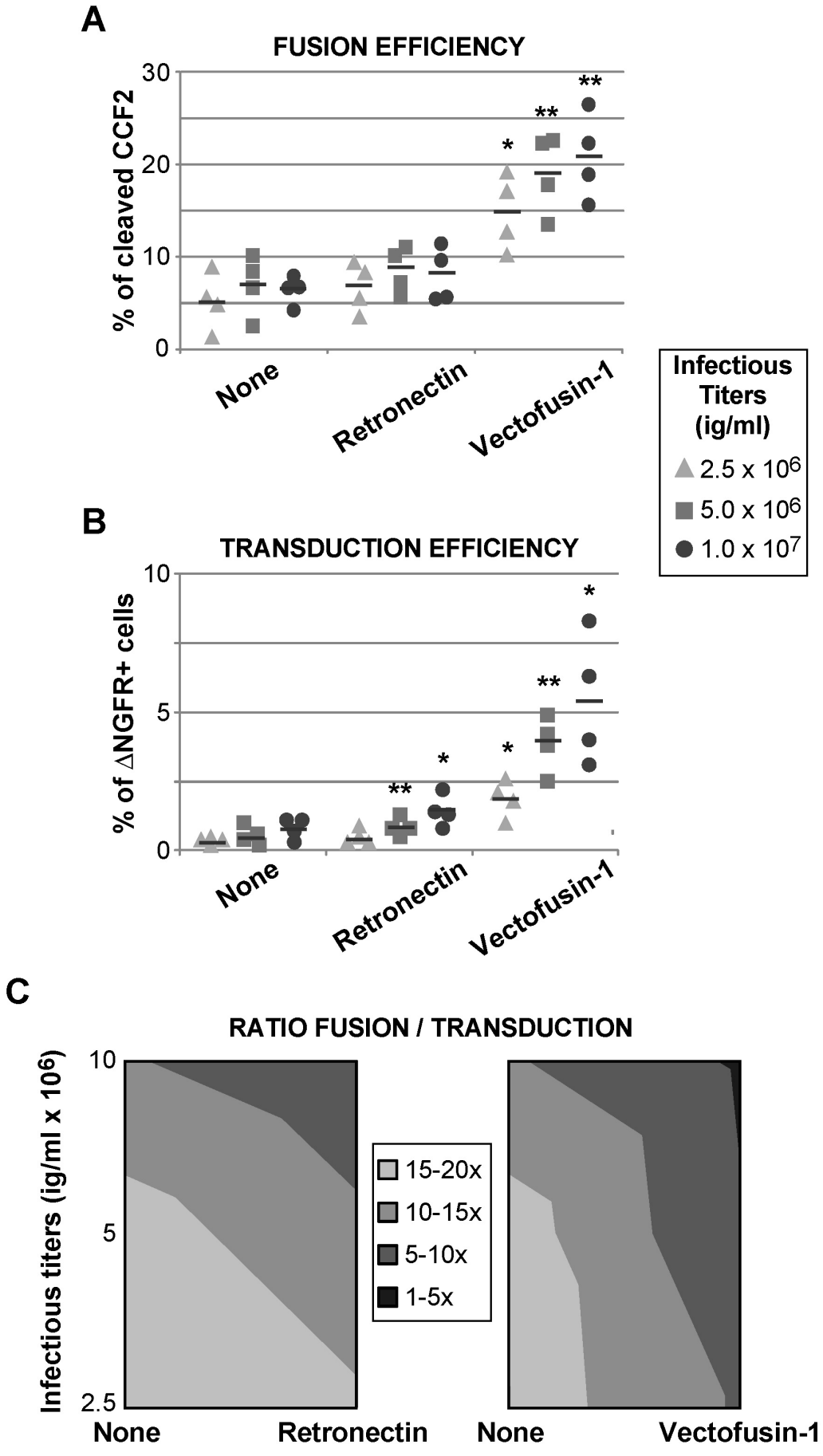

A
FUSION EFFICIENCY
% of cleaved CCF2
30
20
10
0
None
Retronectin
Vectofusin-1
Infectious Titers (ig/ml)
2.5 x 10^6
5.0 x 10^6
1.0 x 10^7
B
TRANSDUCTION EFFICIENCY
% of ΔNGFR+ cells
10
5
0
None
Retronectin
Vectofusin-1
C
RATIO FUSION / TRANSDUCTION
Infectious titers (ig/ml x 10^6)
10
5
2.5
15-20x
10-15x
5-10x
1-5x
None
Retronectin
None
Vectofusin-1

Figure 6. Influence of the infectious titers and the transduction enhancers on the fusion/transduction ratio in hCD34+ cells. Fusion (**A**) and transduction efficiencies (**B**) obtained for hCD34+ HSPCs isolated from 4 independent cord blood donors in presence of three vector doses of VSV-G-BLAM-LVs and in absence (none) or presence of Retronectin (7µg/cm^2) or Vectofusin-1 (12 µg/ml). Bars indicate the mean value of the distributions. (**C**) The average F/T ratio obtained for each condition from panel A and B have been plotted on a 2-D contour chart (2-D view of the surface chart from above obtained with the 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 T-test).

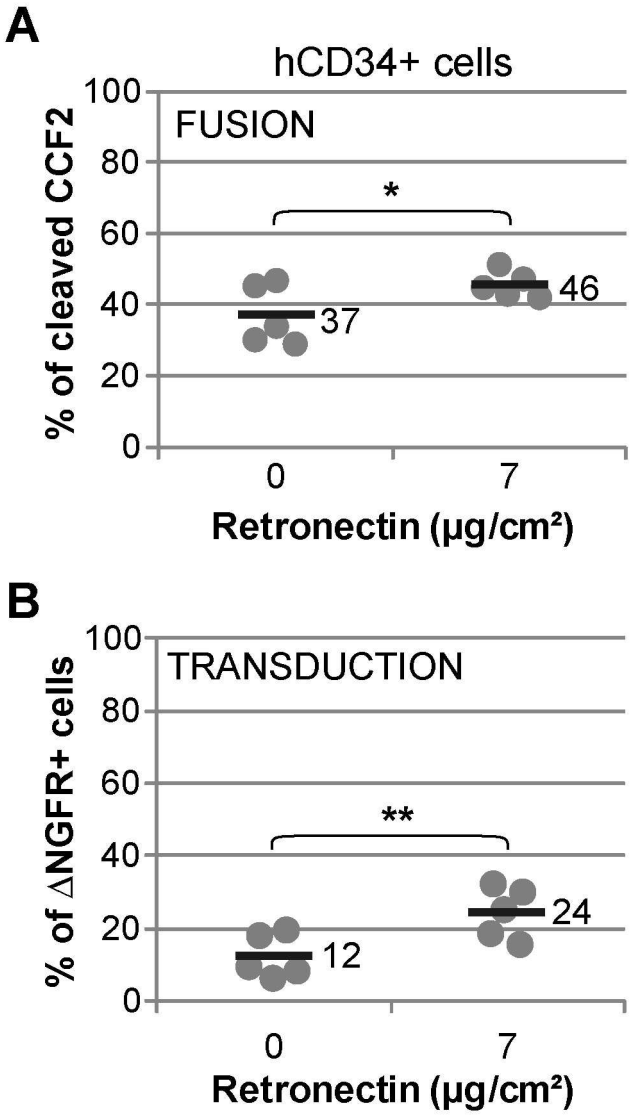
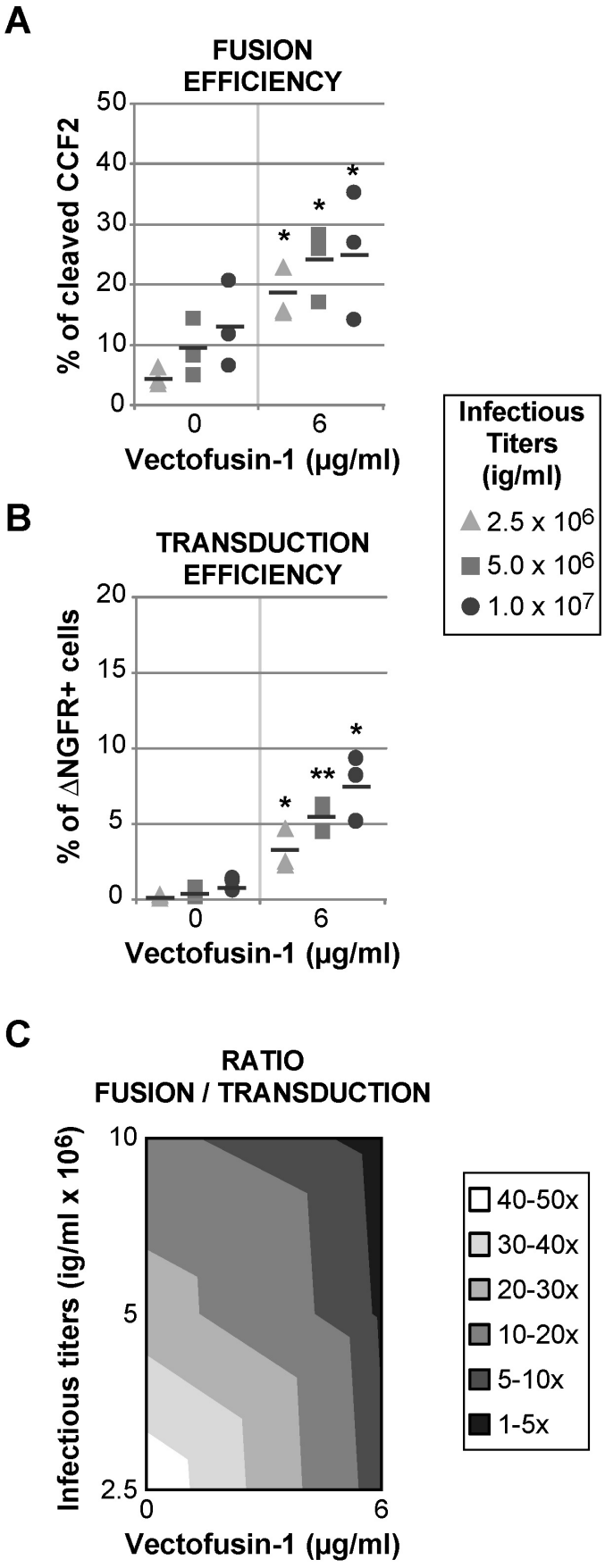


Figure 7. Influence of plate-bound Retronectin on the lentiviral fusion/transduction ratio using high titers of VSV-G-BLAM-LVs. Study of the fusion (**A**) and transduction (**B**) efficiencies of hCD34+ cells with high titers of VSV-G-BLAM-LVs (10^8 ig/ml) in absence or presence of plate-bound Retronectin (7 µg/cm^2) during 2 h. Data are obtained from 5 different cord blood donors. Bars indicate the mean value of the distributions (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, bilateral paired student T-test).

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGEND



Supplemental Figure 1. Influence of the infectious titers and Vectofusin-1 (6µg/ml) on the fusion/transduction ratio in hCD34+ cells. Fusion (**A**) and transduction efficiencies (**B**) obtained for hCD34+ HSCs isolated from 3 independent cord blood donors in presence of three vector doses of VSV-G-BLAM-LVs and in absence or presence of 6µg/ml of Vectofusin-1. Bars indicate the mean value of the distributions. (**C**) The average F/T ratio obtained for each condition from panel A and B have been plotted on a 2-D contour chart as in Figure 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 T-test).

Supplemental Table 1.
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

[a]Plasmids ratio (µg) used for the production of VSV-G-BLAM-LV in 293 T cells for a cell culture monolayer of 175 cm^2

II.C- Résultats préliminaires

II.C.- Etude Structure/Fonction des peptides de la famille LAH4-L1, les Vectofusin® : Test de l'agrégation des particules virales

Dans le cadre des études structures/fonction menés au laboratoire sur les peptides de la famille LAH4-L1, j'ai mis au point un essai qui permet d'estimer le degré d'agrégation des particules virales en absence ou en présence d'additifs de culture, un essai précédemment utilisé pour étudier l'additif agrégeant appelé SEVI (Roan *et al.* 2009b).

Méthode

Une quantité de 50 ng de p24 de vecteurs lentiviraux pseudotypés avec la VSV-G produits et purifiés selon les bonnes pratiques de fabrications est incubée en présence ou en absence d'additifs de culture dans un tube Eppendorf pendant 3h à 37°C. Les peptides de la famille Vectofusin® sont testés à une concentration de 12µg/mL ; le polybrene est testé à une concentration de 6µg/mL et le peptide SEVI est testé à une concentration de 20µg/mL. Le polybrene est testé à la concentration recommandée d'utilisation. Le peptide Vectofusin® et la Retronectin® sont testés avec une quantité équimolaire. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 5 min. à 13000 rpm à température ambiante. Cette centrifugation douce permet de retrouver uniquement les particules virales agrégées dans le culot. En effet, la concentration de particules lentivirales nécessite la réalisation d'une ultracentrifugation. Le culot est resuspendu dans 100 µL de DMEM. La quantification de la quantité de p24 contenu dans le culot est réalisée avec le kit commercial « HIV-p24 ELISA » (Perkin-Elmer).

Résultats

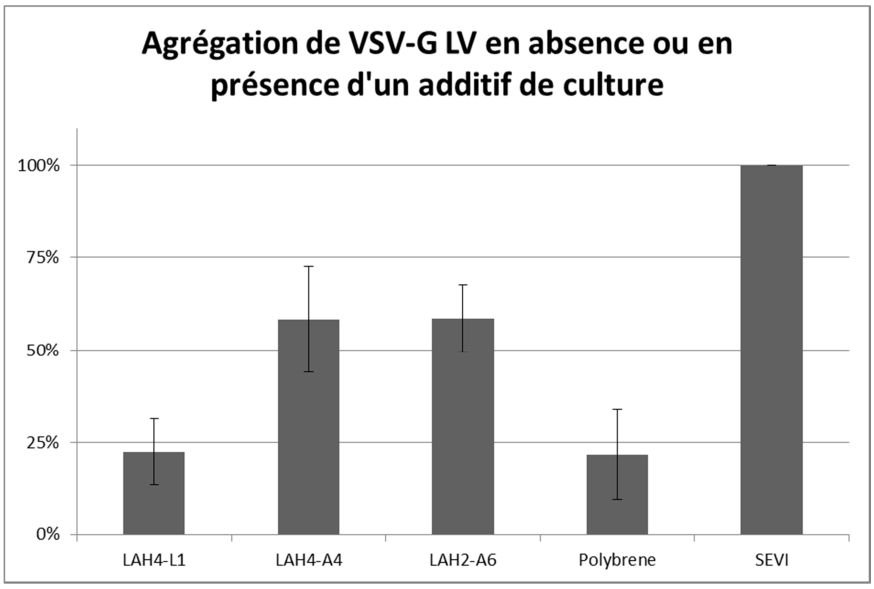


Figure 20. Etude Structure/Fonction des peptides de la famille LAH4-L1, les Vectofusin® : Test de l'agrégation des particules virales. Résultats de l'agrégation de VSV-G-LV en présence de LAH4-L1 (12µg/mL), LAH4-A4 (12µg/mL), LAH2-A6 (12µg/mL), Polybrene (6µg/mL) ou de SEVI (20µg/mL). Les résultats sont exprimés en pourcentage avec le peptide SEVI à 100%.

En comparaison avec la condition en présence du peptide SEVI qui sert de contrôle positif, les peptides LAH4-A4 et LAH2-A6 permettent d'agréger environs 60 % de vecteurs alors que le peptide LAH4-L1 et le Polybrene permettent d'agréger environs 22% de vecteurs. Les résultats obtenus avec l'essai agrégation mettent en évidence un pouvoir agrégeant des peptides testés.

II.C.2 Etude de l'effet des cytokines dans le milieu de culture sur l'entrée des vecteurs lentiviraux dans les cellules hématopoïétiques humaines

Les CSH humaines CD34+ sont habituellement pré-stimulées avec des cytokines avant la transduction avec des vecteurs lentiviraux. C'est pourquoi, nous avons testé l'effet des cytokines présentes dans le milieu sur la fusion et la transduction des CSH humaines CD34+ avec des vecteurs lentiviraux.

Méthode

Les CSH humaines CD34+ sont incubées pendant 16h dans du milieu *Xvivo* (XVivo20 10%SVF, 1%PS, 1% L-glu) ou dans du *Prestimulation medium* (X-vivo20; 1%PS; 1%L-glu; hSCF(25ng/mL); hFlt-3 (50ng/mL); hIL 3 (10ng/mL); hTPO (25ng/mL) ou dans du *Prestimulation medium* +(X-vivo20; 1%PS; 1%L-glu; hSCF(300ng/mL); hFlt-3 (300ng/mL); hIL 3 (20ng/mL); hTPO (100ng/mL). Les CSH humaines CD34+ pré-stimulées (6×10^4 cellules/puits) sont ensuite incubées avec des VSV-G-BLAM-LV pendant 2h30 à 37°C, 5% CO_2 en absence ou en présence de Retronectin® (7µg/cm^2). Une partie des cellules est mise en culture pendant 5 jours, tandis que le reste des cellules sont traitées pour réaliser la mesure de la fusion. Cinq jours après la transduction, les cellules sont lavées avec 200 µL de PBS1x. Ensuite les cellules sont incubées pendant 30 min. à 4°C avec un anticorps anti-ΔNGFR couplé au fluorochrome Allophycocyanin (APC) (Miltenyi Biotech) et analysées par cytométrie de flux.

Résultats:

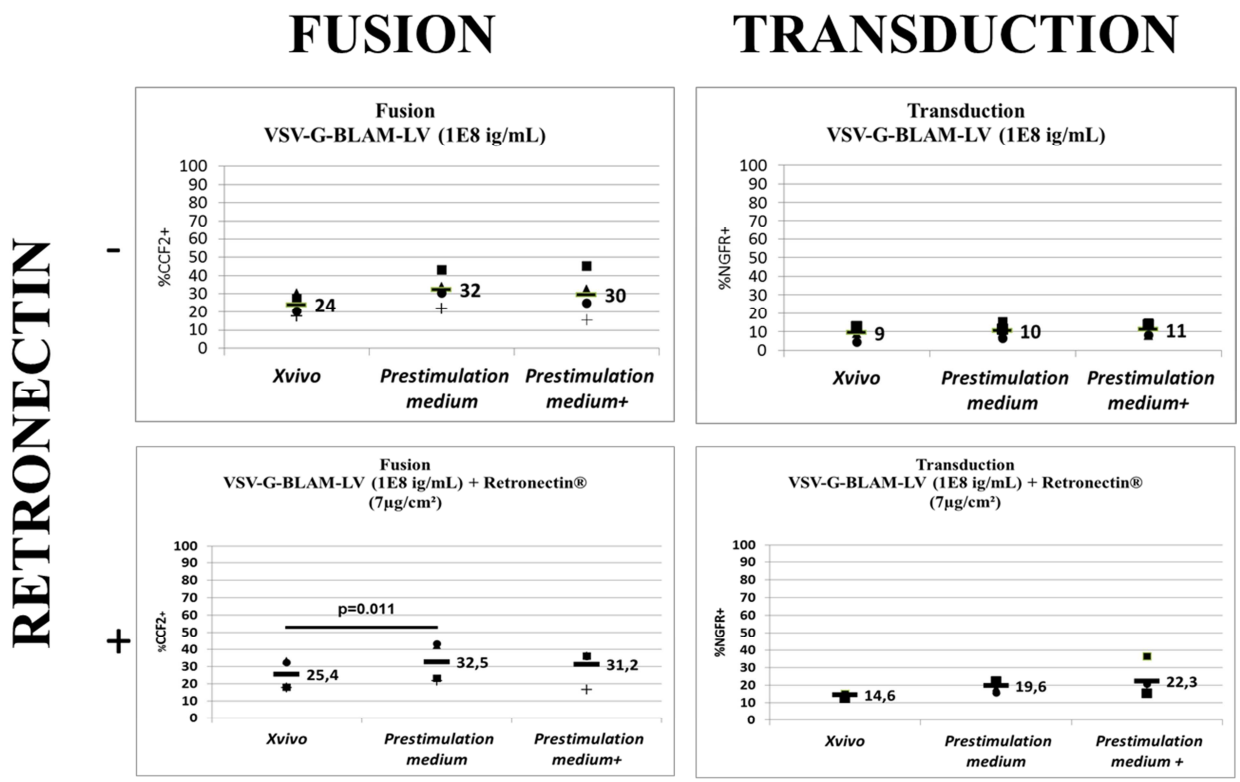


Figure 21. Etude de l'effet des cytokines dans le milieu de culture sur l'entrée des vecteurs lentiviraux dans les cellules hématopoïétiques humaines. Les résultats de fusion (à gauche) et de transduction (à droite) des cellules CSH humaines CD34+ pré-stimulées dans différents milieux de culture. Les CSH humaines CD34+ pré-stimulées sont transduites avec 1^E8 ig/mL de VSV-G-BLAM-LV pendant 2h30 en absence (en haut) ou en présence de Retronectin® (7µg/cm²) (en bas). Analyse statistique : Test de Student apparié

Une augmentation statistiquement significative est observée sur la fusion des CSH humaines CD34+ pré-stimulées mais uniquement en présence de Retronectin® (Figure 21, comparaison des graphes en haut à gauche et en bas à gauche). Les résultats de transduction (graphe de droite) montrent une absence (en haut) ou un léger effet (en bas) de la pré-stimulation des CSH humaines CD34+. Ces résultats de transduction peuvent être expliqués par les temps très court de transduction (2h à 2h30) imposés par le protocole de l'essai fusion.

Ces résultats suggèrent que dans ces conditions, l'effet des cytokines permet majoritairement d'augmenter l'entrée des vecteurs lentiviraux dans les CSH humaine CD34+. Dans nos conditions, aucun effet post-entrée des cytokines n'a pu être mis en évidence.

En présence ou en absence de Retronectin®, les pourcentages de fusion sont pratiquement identiques alors que la transduction en présence de Retronectin® est augmentée dans tous les milieux testés. Ces résultats suggèrent que l'effet de la Retronectin® agit principalement sur les restrictions post-entrée plutôt qu'au niveau de la fusion.

III- Conclusions/Perspectives

L'essai BLAM-LV a mis en évidence qu'à de faibles doses de vecteurs, le niveau d'entrée des vecteurs dans des lymphocytes T immortalisés ou dans des CSH humaines CD34+ est beaucoup plus élevé que le niveau de transduction. Cette observation met en évidence des restrictions post-entrée dans ces cellules. Nous décrivons deux additifs de culture distincts qui améliorent l'efficacité de transduction des cellules avec des vecteurs lentiviraux à travers des mécanismes d'action différents. Par exemple, la Vectofusin-1, dérivé du peptide LAH4-L1 (Mason *et al.* 2006a; Lam *et al.* 2012; Fenard *et al.* 2013a; Kichler *et al.* 2013), est un nouvel additif de culture qui augmente la fusion et la transduction des CSH humaines avec des vecteurs lentiviraux (Fenard *et al.* 2013b). Cet essai a permis de montrer que la Vectofusin-1 ® augmente l'adhésion et la fusion des vecteurs avec les membranes cellulaires. Nous avons également pu mettre en évidence qu'en présence de cet additif, les restrictions post-entrée existant dans les CSH humaines CD34+ sont levées partiellement et beaucoup plus efficacement que la stratégie consistant à augmenter uniquement la dose de vecteurs. L'étude de l'effet de la Retronectin®, qui est un additif de culture très largement utilisé, a montré qu'il agissait principalement sur les restrictions post-entrée plutôt qu'au niveau de la fusion. Cet effet peut-être la conséquence de la stimulation des intégrines VLA-4 et VLA-5 à la surface cellulaire par les domaines présent sur la Retronectin®, CS-1 et les domaines de fixation cellulaire (CBD) respectivement (Yokota *et al.* 1998; Horiuchi *et al.* 2009).

Dans la plupart des protocoles de transduction avec des vecteurs lentiviraux développés pour des applications cliniques, la quantité de vecteurs utilisées est très forte, avec parfois deux tours d'infection afin d'obtenir des niveaux élevés de greffe de cellules cibles génétiquement corrigées chez le patient. Malgré les résultats encourageants obtenus avec cette pratique, il serait très intéressant de pouvoir diminuer la quantité de vecteurs lentiviraux de grade clinique pour augmenter le nombre de patient qui pourrait être traité pour un lot clinique de vecteur et pour réduire la toxicité potentielle associée à la manipulation des cellules (en particulier avec des vecteurs lentiviraux portant une GP d'enveloppe très fusogénique). Les études ayant pour but d'améliorer les étapes post-entrée sont par conséquence de grand intérêt, pour mieux comprendre le mécanisme moléculaire impliquer dans les restrictions post-entrée ou pour développer des composés qui améliorent l'entrée des vecteurs dans les cellules ou qui saturent ou lèvent totalement les restrictions post-entrée. En effet, l'efficacité

de transduction des cellules avec des vecteurs lentiviraux dépend de l'expression de facteurs de restriction qui bloquent les étapes post-entrée. Les cellules possèdent un dispositif de défense en exprimant des protéines appartenant à la famille de TRIM5α, APOBEC, SAMHD1 ou encore p21 $^{Waf1/Cip1/Sdi1}$ (p21) qui ciblent les vecteurs lentiviraux (Goff 2004; Harris and Liddament 2004; Nisole *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2007; Malim and Emerman 2008; Santoni de Sio *et al.* 2008; St Gelais and Wu 2011). SAMHD1 semble être spécifique du lignage cellulaire myéloïde. En effet, des études ont montré une restriction du VIH-1 dans les monocytes dérivés de cellules dendritiques et dans les macrophages (Hrecka *et al.* 2011; Laguette *et al.* 2011). Ces deux études ont montré que la protéine accessoire Vpx interagit avec SAMHD1 et l'envoie au protéasome pour être dégradée (Hrecka *et al.* 2011; Laguette *et al.* 2011). Ainsi, une inhibition du protéasome empêche la dégradation protéasomale de SAMHD1(Hrecka *et al.* 2011; Laguette *et al.* 2011). Le facteur de restriction APOBEC3G identifié comme un inhibiteur de l'infection du VIH-1(Sheehy *et al.* 2002) est aussi ciblé par une protéine accessoire du VIH-1, Vif qui est responsable de sa dégradation en l'envoyant au protéasome(Conticello *et al.* 2003; Kao *et al.* 2003; Marin *et al.* 2003; Sheehy *et al.* 2003; Yu *et al.* 2003; Mehle *et al.* 2004a; Mehle *et al.* 2004b; Shirakawa *et al.* 2006; Bergeron *et al.* 2010). Aussi, il a été montré que TRIM5α cible les particules virales puis ces dernières sont envoyées vers le protéasome pour être dégradées (Stremlau *et al.* 2004). Il a également été montré que l'inhibition du protéasome n'empêche pas l'infection des cellules exprimant TRIM5α par le VIH-1(Perez-Caballero *et al.* 2005). Aussi, il a été mis en évidence que l'infectivité du VIH-1 et le transfert de gènes réalisés avec des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1 étaient améliorées en présence d'inhibiteur du protéasome (Schwartz *et al.* 1998; Groschel and Bushman 2005; Wei *et al.* 2005; Santoni de Sio *et al.* 2006; Dueck and Guatelli 2007; Goujon *et al.* 2007; Leuci *et al.* 2011). Plus particulièrement pour les cellules souches hématopoïétiques qui sont très peu permissives aux vecteurs lentiviraux, Santoni *et al.* concluent que l'inhibition du protéasome avec le virion a permis de lever cette inhibition post-entrée (Santoni de Sio *et al.* 2006; Santoni de Sio *et al.* 2008). Dans leurs travaux de 2006, ils montrent que la stimulation par les cytokines permet une diminution de l'activité du protéasome dans les progéniteurs hématopoïétiques et cet effet serait un des mécanismes d'action des cytokines pour améliorer l'efficacité de transfert de gène avec les vecteurs lentiviraux (Santoni de Sio *et al.* 2006). L'essai fusion que nous avons développé permet pour la première fois, de mettre en évidence et de quantifier les restrictions post-entrée et la mettre réellement en évidence. Dans nos conditions, nous montrons un effet majoritaire des cytokines sur l'entrée des particules lentivirales dans les CSH CD34+.

Des études ont mis en évidence que des voies de réparations de l'ADN génomique sont impliquées dans les restrictions post-entrée du VIH-1 comme le facteur UNG2 (Uracil DNA glycosylase) (Fenard *et al.* 2009; Weil *et al.* 2013), les protéines de réparation de l'ADN RAD52(Lau *et al.* 2004), RAD18(Lloyd *et al.* 2006), XPB (Xeroderma Pigmentosum B) et XPD (Xeroderma Pigmentosum D)(Yoder *et al.* 2006).

En conclusion, cet essai fusion BLAM est un outil utile pour : i) évaluer le degrés de la restriction lentivirale post-entrée dans des cellules cibles attractives (e.g. CSH, lymphocytes) ; ii) déterminer quelles cellules sont ciblées pendant le processus d'entrer en comparaison avec les cellules correctement transduites dans la même population cellulaire ; iii) mieux caractériser les additifs de cultures qui sont capables d'améliorer l'adhésion et la fusion des vecteurs lentiviraux ; iv) mieux définir et développer des composés qui peuvent atténuer ou lever les restrictions post-entrée. L'essai fusion BLAM pourra être utilisé pour l'étude et la modulation de différentes voies de signalisation intracellulaire, en particulier les voies de réparation de l'ADN génomique de type BER (rôle antiviral de l'uracil DNA glycosylase) mais également le rôle du protéasome et de la voie autophagique antivirale, dans le but d'identifier le ou les facteurs de restriction post-entrée dans les CSH. Les résultats de ces études apporteront des informations essentielles sur les différents paramètres influençant l'entrée des vecteurs lentiviraux dans les CSH. Toutes ces applications de l'essai fusion BLAM aideront à améliorer notre connaissance de la transduction avec des vecteurs lentiviraux et mèneront au développement de nouveaux protocoles cliniques de transduction de CSH plus performant pour la thérapie génique.

ANNEXE

J'ai débuté ma thèse en octobre 2009 dans le laboratoire INSERM U951 Genethon sous la direction du Pr. Javier Perea et du Dr. Nathalie Holic-Barlet. Mon projet de thèse portait alors sur « l'utilisation d'introns mobiles pour le ciblage génomique en vue de leur utilisation comme vecteurs de thérapie génique dans des cellules humaines ». Fin 2010, il a été décidé d'arrêter ce projet de recherche pour l'ensemble de l'équipe de recherche. Cette décision a été motivée par l'obtention de résultats qui attestent de l'impossibilité d'utiliser ces introns à des fins thérapeutiques, limitant ainsi l'intérêt de poursuivre plus avant ces recherches. Avec l'accord de mon comité de thèse, j'ai poursuivi ma thèse sur un nouveau projet de recherche : l'«Etude de l'étape d'entrée des vecteurs lentiviraux dans les cellules cibles» projet récemment initié au sein de l'unité UMR951 par le Dr. David Fenard.

Dans les essais de thérapie génique actuels utilisant des vecteurs rétroviraux comme outil de transfert de gène, le transgène ne s'intègre pas dans un site spécifique du génome de la cellule hôte. L'expression du transgène peut donc être perturbée par des éléments régulateurs en *cis* présents à proximité du site d'intégration. Les insertions à proximité d'oncogènes présentent un risque d'activation de ceux-ci par les promoteurs et les éléments « enhancers » apportés par le vecteur. Ces évènements indésirables pourraient être évités par une intégration ciblée dans le génome et plus particulièrement au niveau du gène à corriger. La copie sauvage serait sous le contrôle des séquences cis-régulatrices originales. Aujourd'hui, il existe des stratégies de modification ciblée du génome qui consistent à fournir une matrice d'homologie et à réaliser des cassures doubles brins (DSB) de l'ADN dans des sites d'intérêt qui sont ensuite réparées par recombinaison homologue. Cette stratégie permet une modification ciblée du génome mais il existe un risque de ciblage non désiré d'un ou plusieurs sites ailleurs dans le génome, dont la séquence est très proche de celle du site d'intérêt et est donc reconnue à tort. Le laboratoire d'Immunologie Moléculaire et Biothérapies Innovantes s'est intéressé à l'utilisation de l'intron de groupe II comme une approche alternative afin d'éviter la génotoxicité causée par les cassures doubles brins de l'ADN pouvant se produire ailleurs dans le génome.

Les introns de groupe I et de groupe II sont des éléments mobiles retrouvés dans les procaryotes et les organelles eucaryotes, qui sont capables de s'auto-épisser et de s'intégrer de façon spécifique entre deux exons dans un génome sans intron (Saldanha *et al.* 1993; Lambowitz and Zimmerly 2004; Toor *et al.* 2009). Cette propriété, appelée « homing », contribue à propager les introns et a été utilisée pour réaliser des modifications précises du génome *in vivo* (Guo *et al.* 2000; Mohr *et al.* 2000; Karberg *et al.* 2001; Alwin *et al.* 2005;

Urnov *et al.* 2005; Arnould *et al.* 2007; Grizot *et al.* 2009; Garcia-Rodriguez *et al.* 2011) (Hockemeyer *et al.* 2011; Mussolino *et al.* 2011). Deux mécanismes de « homing » ont été décrits selon le type d'intron. Les introns de groupe I codent une nucléase très spécifique (méganucléase) pour produire une cassure double brin à la jonction entre deux exons dans un génome dépourvu d'intron. La recombinaison se fait avec les parties exoniques entourant l'intron (Haugen *et al.* 2005). Les introns de groupe I et de groupe II sont des ribozymes qui s'auto-épissent à partir de l'ARN précurseur. L'ARN épissé reconnait la jonction d'ADN entre deux exons du génome sans intron et s'intègre dans le génome conduisant à une forme hybride ADN-ARN. Après la transcription inverse, l'ARN intronique ayant servi de matrice est dégradé. Malgré des mécanismes de « homing » différents, les introns de groupe I et de groupe II requièrent l'expression d'une protéine codée par l'intron lui-même (IEP, Intron-Encoded Protein) pour réaliser le « homing » (Lambowitz and Zimmerly 2004). Ces IEP ont souvent différentes activités : maturase (pour aider la réaction d'épissage de l'intron) (Delahodde *et al.* 1989) (Wenzlau *et al.* 1989; Mohr *et al.* 1993; Schafer *et al.* 1994; Szczepanek *et al.* 2000; Belfort 2003; Cui *et al.* 2004), endonucléase double brin (pour les introns de groupe I) (Delahodde *et al.* 1989; Wenzlau *et al.* 1989; Ho *et al.* 1997; Belfort 2003), endonucléase simple brin et transcriptase inverse (pour les introns de groupe II) (Kennell *et al.* 1993; Guo *et al.* 1997; Matsuura *et al.* 1997; Wank *et al.* 1999; Singh and Lambowitz 2001) (San Filippo and Lambowitz 2002). Le « homing » résulte toujours en l'incorporation d'une copie de l'intron dans le génome sans intron.

Des introns de groupe II modifiés sont des outils très utilisés pour réaliser des modifications génomiques dans des cellules procaryotes mais pas dans des cellules eucaryotes. Contrairement aux autres introns de groupe II qui ne réalisent l'auto épissage *in vitro* qu'à fortes concentrations salines (Saldanha et al. 1999), l'intron de groupe II de l'algue brune *Pylaiella littoralis* Pl.LSU/2 est capable de s'auto-épisser *in vitro* à des concentrations physiologiques en magnésium (Costa et al. 1997b A group II self splicing) mais il est très peu caractérisé. Au laboratoire, les résultats des travaux de thèse réalisés par Melle Madeleine Zerbato ont permis de mettre en évidence pour la première fois que la protéine IEP codée par l'intron de groupe II Pl.LSU/2 (Pl.LSU/2 IEP) a une activité reverse transcriptase quand elle est complexée à l'ARN intronique sous la forme de ribonucléoparticule et également *in vitro* en absence de l'ARN de l'intron. De plus, l'intron Pl.LSU/2 peut être modifié afin d'obtenir un épissage dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* et il a été montré que l'efficacité d'épissage est augmentée par l'activité maturase de la protéine IEP. Pendant ma première

année de thèse, j'ai participé à l'étude de l'épissage de l'intron de groupe II PL.LSU/2 dans les cellules eucaryotes humaines. Une partie de mon travail a consisté à réaliser des constructions plasmidiques contenant différentes formes de l'intron et aussi de la protéine IEP. Malheureusement, les travaux réalisés n'ont pas permis de détecter l'épissage de l'intron dans les cellules humaines.

L'ensemble de ces résultats est présenté dans l'article 3.

ARTICLE 3

"The Brown Algae Pl.LSU/2 Group II Intron-Encoded Protein Has Functional Reverse Transcriptase and Maturase Activities"

M. Zerbato, N. Holic, S. Moniot-Frin, D. Ingrao, A. Galy and J. Perea

Plos ONE (2013). 8(3) : e58263; doi:10.1371/journal.pone.0058263

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

The Brown Algae Pl.LSU/2 Group II Intron-Encoded Protein Has Functional Reverse Transcriptase and Maturase Activities

Madeleine Zerbato[1,2,3], Nathalie Holic[1,2,3], Sophie Moniot-Frin[1,2,3], Dina Ingrao[1,2,3], Anne Galy[1,2,3], Javier Perea[1,2,3]*

1 Inserm, U951 Evry, France, **2** University of Evry Val d'Essonne, UMR S_951, Evry, France, **3** Genethon, Evry, France

Abstract

Group II introns are self-splicing mobile elements found in prokaryotes and eukaryotic organelles. These introns propagate by homing into precise genomic locations, following assembly of a ribonucleoprotein complex containing the intron-encoded protein (IEP) and the spliced intron RNA. Engineered group II introns are now commonly used tools for targeted genomic modifications in prokaryotes but not in eukaryotes. We speculate that the catalytic activation of currently known group II introns is limited in eukaryotic cells. The brown algae *Pylaiella littoralis* Pl.LSU/2 group II intron is uniquely capable of *in vitro* ribozyme activity at physiological level of magnesium but this intron remains poorly characterized. We purified and characterized recombinant Pl.LSU/2 IEP. Unlike most IEPs, Pl.LSU/2 IEP displayed a reverse transcriptase activity without intronic RNA. The Pl.LSU/2 intron could be engineered to splice accurately in *Saccharomyces cerevisiae* and splicing efficiency was increased by the maturase activity of the IEP. However, spliced transcripts were not expressed. Furthermore, intron splicing was not detected in human cells. While further tool development is needed, these data provide the first functional characterization of the Pl.LSU/2 IEP and the first evidence that the Pl.LSU/2 group II intron splicing occurs *in vivo* in eukaryotes in an IEP-dependent manner.

Citation: Zerbato M, Holic N, Moniot-Frin S, Ingrao D, Galy A, et al. (2013) The Brown Algae Pl.LSU/2 Group II Intron-Encoded Protein Has Functional Reverse Transcriptase and Maturase Activities. PLoS ONE 8(3): e58263. doi:10.1371/journal.pone.0058263

Editor: Richard Cordaux, University of Poitiers, France

Received September 14, 2012; **Accepted** February 1, 2013; **Published** March 11, 2013

Copyright: © 2013 Zerbato et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Association Française contre les myopathies (AFM, http://www.afm-telethon.fr/); the Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM http://www.inserm.fr); the University of Evry Val d'Essonne (www.univ-evry.fr); and by the 7th European Commission Framework Program (FP7) "PERSIST" (agreement 222878). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: perea@genethon.fr

Introduction

Prokaryotic and eukaryotic organelle introns are mobile elements able to integrate specifically in the exon junction of an intronless genome [1–3]. This property, called "homing", contributes to the spreading of introns and has been used for precise *in vivo* genome engineering [4–13]. Two general homing mechanisms have been described depending on the type of intron: group I introns encode a very specific nuclease (meganuclease) to produce a double-strand break (DSB) in the intronless genome at the junction of exons. The DSB is then repaired by homologous recombination (HR) with a template DNA coming from the "invader" genome [14]. Group II introns are ribozymes that self-splice from precursor RNA yielding excised intron lariat RNAs. The lariat splicing intermediate recognizes the DNA junction between the exons of the intronless genome and integrates the genome forming a DNA-RNA hybrid. After reverse transcription, the template intronic RNA is degraded and the gap is repaired by a DNA polymerase. In spite of very divergent mechanisms used for homing, both group I or group II introns rely on the expression of a protein coded by the intron itself (IEP, Intron-Encoded Protein) for the homing process [2]. These IEPs often carry different activities: maturase (to help the proper splicing of the intron) [15–22], double strand endonuclease (in group I introns) [17,18,20,22], single strand endonuclease and reverse transcriptase (in group II introns) [23–28]. Homing always results in the incorporation of a copy of the intron into the intronless genome.

The ability of group I and group II introns to recognize and to integrate into a specific genomic site has been exploited to generate various knock-out or knock-in models in mammalian cells [4,12,13,29,30], plants [31–33], and bacteria [5,34–38]. Specific genomic targeting is obtained by changing the native target recognition sequences using rational engineering or directed molecular evolution [13,39]. At present, group II intron-derived genomic targeting strategies are only used in bacteria. However, using group II introns in mammalian cells could represent some advantages over the currently existing technologies. In mammalian cells, meganucleases and strategies based on FokI restriction endonuclease coupled to engineered Zinc fingers [32] or Transcription Activator-Like Effectors [40,41] are used for specific genomic insertion. Both of these approaches utilize DSB repair processes which occur mainly by non-homologous end joining (NHEJ) or by HR in the presence of a DNA template [42–44]. These approaches are limited by safety concerns and by low efficiency in some cell types. The radically different homing mechanism of group II introns could be an alternative to DSB mediated gene engineering.

There are only a few examples of the use of group II introns in eukaryotes. An initial proof of concept in mammalian cells has been reported by Guo *et al.* [4] using the *Lactococcus lactis* Ll.LtrB intron to target two genes carried into plasmids in HEK 293 human cells. These initial experiments showed homing into the plasmid as detected by PCR with specific oligonucleotides but efficacy was not measured. The splicing of the Ll.LtrB intron inside the HEK 293 cells was also not demonstrated since the authors introduced directly the purified LtrA-lariat ribonucleoparticles into the cell to obtain homing. However, it is known that the Ll.LtrB intron can acquire its correct tertiary structure in bacteria with the help of LtrA as used in commercial gene knockout systems [5,45–47].

Several elements may contribute to the limitations in the use of group II introns in eukaryotes. Ribozyme activity of group II introns depends on the correct folding of RNA into a specific tertiary structure [48]. This activity is necessary for both the intron splicing and its insertion into target DNA. Most of group II introns are able to self-splice *in vitro* in the absence of proteins but have to be "chaperoned" by proteins *in vivo* [48,49]. These proteins may not function optimally in eukaryotic cells. Self-splicing of group II introns depends on the correct tertiary structure folding of the intronic RNA, and Mg^{2+} cations contribute to this folding by stabilizing the RNA tertiary structure [48,50]. Mg^{2+} is also required for catalysis of group II introns [51] and its concentration is critical for proper self-splicing *in vitro*. It is therefore possible that most group II intron cannot function optimally in eukaryotic cells where the free Mg^{2+} concentration is estimated to be around 1–2 mM [52]. For example, the optimal *in vitro* reaction conditions for the well-known bacterial *Lactococcus lactis* Ll.LtrB intron IEP-assisted RNA splicing use 5 mM Mg^{2+} and 10 mM of Mg^{2+} are required for an optimal reverse splicing reaction of RNPs into DNA target site [53]. The importance of Mg^{2+} concentration is emphasized by a recent study showing that Ll.LtrB RNP particles were able to insert efficiently into a plasmid target in eukaryotic nuclei by providing $MgCl_2$ during the microinjection of RNPs in *Xenopus laevis* oocytes, and *Drosophilia melanogaster* and zebrafish (*Danio renio*) embryos [29]. In this work, we have chosen to study the Pl.LSU/2 intron from the mitochondrial large subunit rRNA gene of the brown algae *Pylaiella littoralis* because of its ability to self-splice *in vitro* at unusually low Mg^{2+} concentrations (0.1 mM) [54]. We reasoned that this characteristic could make the Pl.LSU/2 intron a good candidate to be used as a tool for genome manipulation in eukaryotic cells. The Pl.LSU/2 intron structure presents a highly canonical secondary structure model consisting in six helical domains (I to VI) radiating from a central wheel [55,56]. Although the Pl.LSU/2 intron tertiary structure has been characterized [57–59], there is no report on the homing property of this intron nor on its potential biochemical activities *in vivo*. Moreover, the putative intron-encoded protein of Pl.LSU/2 has not been described. The fact that the Pl.LSU/2 intron sequence presents in its domain IV an open reading frame containing putative domains of most group II intron IEPs [56] suggests that at least one of the Pl.LSU/2 IEP putative activities has been preserved by evolution.

We have therefore characterized the biochemical activities of the Pl.LSU/2 IEP as well as the Pl.LSU/2 intron activity *in vivo* in eukaryotic cells in order to evaluate the possibility of using this intron in genome engineering. Here, we show that active recombinant Pl.LSU/2 IEP can be produced and purified in *Escherichia coli*. The purified IEP shows a reverse transcriptase activity *in vitro* both alone or when expressed together with the intronic RNA. The Pl.LSU/2 intron is able to splice properly in yeast cells helped by the maturase activity of its IEP.

Materials and Methods

Strains and Human Cell Lines

Pl.LSU/2 intron and Pl.LSU/2 intron-encoded protein were expressed in *E. coli* strain Rosetta-gami B(DE3) F^- *ompT hsdS*$_B$ (r_B^- m_B^-) *gal dcm lacY1 ahpC* (DE3) *gor522*::Tn*10 trxB* pRARE (Cam^R, Kan^R, Tet^R) (EMD4Biosciences, Novagen). This strain was grown in LB (Luria-Bertoni) medium with 50 µg/ml of carbenicilin and/or 25 µg/ml of chloramphenicol. *In vivo* splicing of Pl.LSU/2 intron was evaluated in *S. cerevisiae* BY4742 *MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0* (S288C) [60]. This strain was grown in YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) and/or in SD (Synthetic Dextose) medium containing dropout supplement mix (according to Molecular Cloning, A Laboratory Manual, by Sambrook J. & Russell D.). HEK 293T and HCT 116 human cells (obtained from ATCC (CRL-11268 and CCL-247 respectively, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (PS) (Life technologies, Invitrogen). Cells were passaged with TrypLE express 1X (Life technologies, Invitrogen).

Plasmids and Oligonucleotides

Plasmids and oligonucleotides used in this study are listed in Supplemental information (Table S1 A and Table S1 B, respectively).

Structure Analysis

Pl.LSU/2 intron secondary structure has already been described [55,56]. The secondary structure of the intron RNA domain IV was predicted with the sFold 2.2 software (http://sfold.wadsworth.org) [61,62] (Fig. S2).

Expression of the Pl.LSU/2 Intron-encoded Protein (IEP) in *E. coli*

E. coli strain Rosetta-gami B (DE3) was transformed with the appropriate expression plasmid and single colonies were inoculated into 4 ml of LB containing appropriate antibiotics. Precultures were shaken at 170 rpm at 32°C overnight, inoculated into 100 ml of LB medium without antibiotics and grown at 32°C for 3–6 hr, until $OD_{600\ nm}$ reached 0.4–0.8. Induction was started by addition of IPTG (1 mM final), and the incubation was continued for 3 hr at 30°C. Cells were then collected by centrifugation (1,900 *g* for 10 min at 4°C), and washed once with 20 ml of 150 mM NaCl. The washed cell pellet was stored at −80°C overnight.

Purification of the Pl.LSU/2 IEP and RNP Particles by Sucrose Cushion Centrifugation

The IEP, tagged in N-terminus with an histidine stretch (6xHis) and a V5 epitope (GKPIPNPLLGLDST) was purified by sucrose cushion centrifugation, as described [23]. The washed cell pellet was resuspended in 4 ml of ice-cold buffer A (50 mM Tris-HCl at pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% (v/v) glycerol), and lysozyme was added to a final concentration of 4 mg/ml. After 45 min of incubation on ice, cells were lysed by three cycles of freeze/thawing between −70°C and 37°C, followed by addition of 2.5 volumes of HKCTD buffer (25 mM Tris-HCl at pH 7.4, 500 mM KCl, 50 mM $CaCl_2$, 5 mM DTT). Lysate was then centrifuged (14,000 *g* for 15 min at 4°C), and supernatant was layered over 5 ml of 1.85 M sucrose containing HKCTD and centrifuged in a Beckman Type 70 Ti rotor (50,000 *g* for 17 h at 4°C). The resulting pellet was gently washed with 1 ml of ice-cold Milli-Q water and then dissolved in 25 µl of ice cold 10 mM Tris-

HCl at pH 8.0, and 1 mM DTT. IEP mtDD- and RNP particles containing IEP WT or IEP mtDD- were purified according to the same procedure. Purified proteins and RNPs preparations were stored at −80°C. The yield of RNP particles was 25–90 $OD_{260\ nm}$ units per 100 ml of culture, with 1 $OD_{260\ nm}$ unit of RNP containing 0.84±0.12 µg of IEP. The yield of purified proteins was 55–150 µg per 100 ml of culture. Quantification of proteins was performed by using Bio-Rad DC Protein Assay Kit 1 (BioRad Laboratories) according to the manufacturer's instructions. All protein fractions were analyzed by Coomassie-blue staining of SDS-PAGE and western blotting. Nucleic acids in IEP and RNPs (WT and mtDD-) purified fractions were quantified by spectrophotometry (NanoDrop 8000) and analyzed by electrophoresis on agarose gel.

RNA Extraction

Total cellular RNA from yeast cells was extracted from 5 ml of mid-log phase cultures in SD minimal medium (minimal SD base or minimal SD base Gal/Raf, Clontech). After centrifugation (3,800 *g* for 5 min at 4°C), the cell pellet was washed with 1 ml of Milli-Q water and resuspended in 2 ml of buffer Y1 (1 M sorbitol, 0.1 M EDTA) supplemented with 0.1% β-mercaptoethanol and 300 U of lyticase (from *Arthrobacter luteus*, >2,000 units/mg protein, Sigma). After 30 min of incubation at 30°C on a rotary shaker, total cellular RNA was extracted from the resulting spheroplasts using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Total cellular RNA from human cells was also isolated with RNeasy Mini Kit (Qiagen). In both cases, a DNase I treatment (RNase-free DNase set, Qiagen) was performed on-column during RNA purification according to the manufacturer's instructions.

Protein Extraction

To obtain yeast total proteins, 20 ml of culture were centrifuged (3,800 *g* for 5 min at 4°C). The cell pellet was washed with 5 ml of Milli-Q water, resuspended in CelLytic Y reagent (2.5 ml/g cell pellet, Sigma-Aldrich) supplemented with 7 mM DTT and incubated at 25°C for 20 min on a rotary shaker. The resulting lysate was centrifuged at 18,000 *g* for 10 min at 4°C. Proteins were then precipitated with 2 volumes of acetone for 1 hr at 4°C and recovered by centrifugation at 18,000 *g* for 15 min at 4°C. Protein pellet was then washed with ethanol and resuspended in 0.5 volume of 50 mM Tris-HCl at pH 8.5, 8 M Urea, and 10 mM DTT.

Yeast nuclear proteins were extracted from 200 ml of culture after centrifugation (4,000 *g* for 5 min at 4°C). Cell pellets were washed first with 25 ml of Milli-Q water and then with 3 ml of spheroplasting buffer (1 M Sorbitol, 50 mM K_2HPO_4 at pH 6.5, 0.018% β-mercaptoethanol). Cells were resuspended in 3 ml of spheroplasting buffer containing 500 U of lyticase and incubated 30 min at 30°C on a rotary shaker. The spheroplasts were collected by centrifugation (4,500 *g* for 5 min at 4°C), washed with 3 ml of ice-cold spheroplasting buffer, resuspended in 8 ml of ice-cold buffer L (18% Ficoll 400, 20 mM K_2HPO_4 at pH 6.8, 1 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EDTA, 2 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin) and lysed on ice by 20 strokes of a dounce homogeneizer. The resulting lysate was then centrifuged (3,500 *g* for 10 min at 4°C). Supernatant was then centrifuged in a Beckman SW 55 Ti rotor (58,000 *g* for 35 min at 4°C) and pelleted nuclei were resuspended in 200 µl of ice-cold buffer NP (0.34 M sucrose, 20 mM Tris-HCl at pH 7.4, 50 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM PMSF, 1 mg/ml aprotinin). Nuclear protein extracts were stored at −80°C.

Human total protein extracts were prepared following washing of cells and lysis of the pellets in buffer containing 50 mM Tris-HCl pH7.5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, and 10% glycerol supplemented with protease inhibitors cocktail.

Protein concentrations were determined with the Bio-Rad DC Protein Assay kit 1.

Western Blot Analyses

Proteins were resolved on a denaturing 10% polyacrylamide-SDS gel (Criterion XT Bis-Tris gels, Biorad), transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond ECL, Amersham) and probed with the appropriate antibodies.

Immunoblots of the 6xHis/V5-tagged Pl.LSU/2 IEP expressed in *E. coli* were probed with mouse anti-V5 antibody (1:5,000 dilution, Life technologies, Invitrogen) followed by IRDye 680-conjugated goat anti-mouse antibody (1:8,000 dilution, LI-COR Biosciences) and immunoreactive bands were detected with the Odyssey infrared scanner (Li-Cor).

Yeast total proteins (30 µg/lane) were immunoblotted with mouse anti-HA antibody (1:200 dilution, Santa Cruz Biotechnologies) and rat anti-Tub1p antibody (1:5,000 dilution, Abcam) to detect respectively the expressed IEP and Tubulin 1 protein (Tub1p), then with Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse antibody (1:25,000 dilution, Jackson ImmunoResearch) and HRP-conjugated rabbit anti-rat antibody (1:1,000 dilution, Dako). Bands were revealed by chemiluminescence (Supersignal West Dura Extended Duration Substrate, Thermoscientific).

Yeast nuclear proteins (80 µg/lane) and human total proteins (30 µg/lane) were probed with an HRP-conjugated mouse anti-c-Myc antibody (1:3,000 dilution, Life technologies, Invitrogen) to detect the myc-tagged NLS-IEP. For yeast nuclear proteins, a mouse anti-TATA binding protein (TBP) antibody (final concentration of 2 µg/ml, Abcam) was added and HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (1:20,000 dilution) was used as secondary antibody. Bands were revealed by chemiluminescence.

RT Assays

RT activity was assayed for 45 min at 37°C in 14 µl of reaction medium containing 10 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris-HCl at pH 8.0, 5 mM DTT, 0.05% NP40, 1 µg of poly(rA)-oligo$(dT)_{12-18}$ (Amersham), 10 µCi of [α-^{32}P]dTTP (3,000 Ci/mmole, Perkin-Elmer) and 1 µg of RNase A (Sigma Aldrich), as described [23]. Reactions were started by the addition of either IEP or RNPs preparations and stopped by addition of EDTA (50 mM final). Radioactive products were spotted on a DE81 filter (Whatman) which was washed twice in 2X SSC. After an overnight exposure on a phosphor screen (Molecular Dynamics PhosphorImager System; GE Healthcare Bio-Sciences), radioactive spots were detected by the Storm system (GE-Healthcare Bio-Sciences) and data were analyzed with ImageQuant software (GE Healthcare Life Sciences).

Reverse Transcription

Reverse transcription of yeast or human cellular RNA was carried out in 20 µl of reaction medium using the Verso cDNA Kit (Thermo Scientific). One microgram of total RNA was incubated for 5 min at 70°C and then mixed with 1X reverse transcription buffer, 0.5 mM of each dNTPs, 2 µM of RM-R oligonucleotide (yeast RNA; Table S1 B) or 300 ng of random hexamers and 125 ng of anchored oligo dT (human RNA), 1 µl of RT Enhancer enzyme, and 1 µl of Verso reverse transcriptase. After incubation at 42°C for 1 hr, reaction was stopped by heating 2 min at 95°C. A control reaction without Verso reverse transcriptase was

performed to ensure the absence of DNA contamination in the RNA samples (minus-Verso RT samples).

PCR

Two µl of yeast cDNA were used as a template for PCR in 50 µl of reaction medium containing 1 unit of Phusion high-fidelity DNA polymerase (Thermoscientific), 62.5 µM of each dNTPs, PCR buffer, and 0.2 µM of each p1 and p2 or p3 and p4 primers. The amplification consisted of 30 cycles at 98°C for 30 sec, 70°C for 30 sec and 72°C for 30 sec. PCR products were analyzed on 12% polyacrylamide gels.

Two µl of human cDNA were used as a template for PCR in 40 µl of reaction medium containing 0.8 unit of Phusion high-fidelity DNA polymerase, 200 µM of each dNTPs, PCR buffer, and 0.25 µM of each p5 and p6 primers. The amplification consisted of 30 cycles at 98°C for 10 sec, 58°C for 20 sec and 72°C for 1 min 30 sec. PCR products were analyzed on 1.2% agarose gels.

Quantitative PCR

The qPCR consisted of a SYBR Green-based detection of cDNA with specific primers hybridizing E2 and the E2–E3 junction or primers hybridizing E2 and the E2-Intron junction. Amplification reactions (25 µl) contained 5 µl of a 1/10 dilution of cDNA and 12.5 µl of qPCR buffer (Power SYBR Green PCR master mix, Applied Biosystems), 0.3 µM of each primers and consisted of 40 cycles at 95°C for 15 sec then at 65°C for 1 min on a 7900 HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems). To ensure the absence of non-specific amplifications, a dissociation step was added consisting in a final cycle at 95°C (15 sec) then 65°C (15 sec) and finally 95°C (15 sec). To quantify cDNA copy number obtained respectively from spliced or precursor mRNA, standard amplification curves were made by serial dilutions of appropriate linearized plasmids. All PCR measures were performed at least in duplicate. All qPCR experiments include samples from mock vector-transformed cells and minus-Verso RT samples as negative controls.

Data were edited using the Sequence Detection Systems 2.3 software (Applied Biosystems) and interpreted in the linear portion of the standard curve. The following test acceptability criteria were used: linear regression coefficient of the standard curve >0.98; less than 0.5 CT variation for duplicate samples; CT comprised between 35 and 40 for H_2O; mock vector-transformed cells and minus-Verso RT samples.

Generation and Titration of Lentiviral Vectors

Recombinant lentiviral vectors (LVs) using the pRRL backbone plasmid [63] (Table S1 A) were constructed to express the indicated transgenes under the control of the human phosphoglycerate kinase (PGK) promoter. VSV-G-pseudotyped particles were produced by quadritransfection of HEK 293 T cells (Table S1 A) as previously described [63,64]. Harvested virus particles were concentrated by ultracentrifugation and titered in infectious genome particles (IG) as previously described [64].

Lentiviral Vector Transduction of Human Cell Lines

HCT 116 cells were seeded at 10^5 cells per well in 12-well plates 16–24 hrs prior transduction. Cells were transduced with LVs using concentrations ranging from 10^6 to 10^8 IG/ml in the presence of 6 µg/ml of polybrene. Transduction medium was replaced with fresh medium 6 hrs after transduction. A second hit of transduction was performed the following morning in the same conditions using LVs encoding proteins. Cells were removed and analyzed 48 hrs later. For LVs stably expressing different forms of Pl.LSU/2 intron, cells were expanded for about 10 days. Vector copy numbers per cell were calculated by quantitative PCR on cell lines genomic DNA as previously described [64] (0.9 for intron-ΔDIV; 0.3 for intron-DIVa; 4.7 for intron-DIVab, and 1.2 for full length intron).

Results

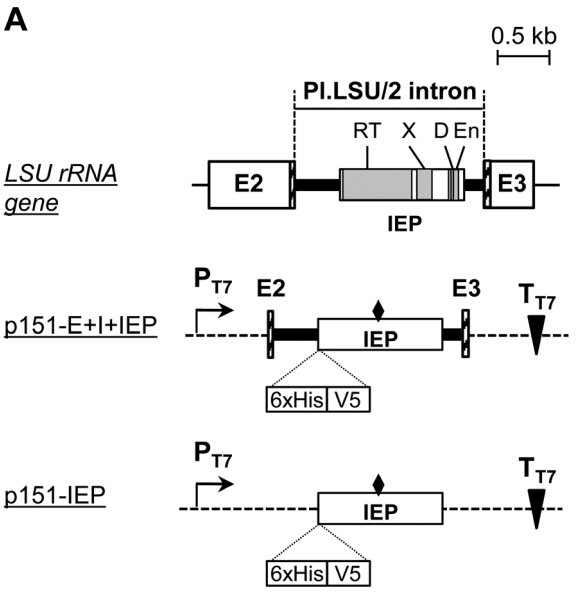
Pl.LSU/2 IEP Contained in RNP Particles Presents an RT Activity *in vitro*

The *Pylaiella littoralis* Pl.LSU/2 group II intron is located in the mitochondrial gene encoding the large ribosomal RNA (Fig. 1A; LSU rRNA gene). This intron contains in its domain IV an open-reading frame presenting the predicted conserved domains of group II intron-encoded proteins which are the reverse transcriptase (RT), DNA-binding domain (D), maturase (X) and endonuclease (En) [15,23,25,28,53] (Fig. 1A). Subsequently, recombinant Pl.LSU/2 intron-encoded protein (IEP) was expressed and purified in order to measure its predicted biochemical activities.

Expression of IEP in RNP particles. Some group II intron-encoded proteins are known to be fully active either alone [53,65] or when intron RNA is copurified with the expressed IEP [23]. To express the Pl.LSU/2 IEP in RNP particles, we designed the plasmid p151-E+I+IEP for the induction of both the Pl.LSU/2 intron and IEP expression in *E. coli* (Fig. 1A). This plasmid contains the Pl.LSU/2 intron and its flanking exons (50 last nucleotides of exon 2 and 71 first nucleotides of exon 3) [54] cloned downstream of the phage T7 promoter in the expression vector pET151/D-TOPO (Table S1 A). The IEP ORF is fused to a 6xHis and a V5 epitope tags in its N-terminus used to the detection of the protein by western blot. This vector could potentially allow the expression of both the intron RNA and the wild-type IEP ORF (IEP WT) with its own Shine-Dalgarno sequence for translation. We also constructed a derivative negative control plasmid (p151-E+I+IEPmtDD-) in which the catalytic YADD motif of the IEP RT domain is mutated to YAAA (Fig. 1A, position indicated by a diamond; Table S1 A) [66]. This plasmid is expected to express a mutant RT-defective IEP (IEP mtDD-).

The expression plasmids p151-E+I+IEP and p151-E+I+IEPmtDD- were transformed in *E. coli* Rosetta-gami B (DE3). After induction, soluble protein fractions were used to purify RNP particles by sucrose cushion centrifugation [23]. Bands at the expected size of IEP WT and mtDD- are observed in the Coomassie-stained SDS-PAGE gel (Fig. 2A; Coomassie, 69 kDa, black arrow). Other bands are also detected by Coomassie staining and correspond to *E. coli* contaminant proteins and/or IEP (WT and mtDD-) degradation products. The western blot analysis confirms the presence of IEP WT and mtDD- at the expected size (Fig. 2A; WB) and shows the presence of some degradation products. A non-specific band is also detected by western blot at 150-kDa in RNPs WT and mtDD- preparations (Fig. 2A; WB). The analysis of these RNPs fractions by agarose gel electrophoresis shows the presence of ribosomal RNAs (Fig. S1). RNP particles containing either IEP WT or IEP mtDD- can thus be partially purified using sucrose cushion centrifugation.

RT activity. The open reading frame of the intron Pl.LSU/2 contains a conserved RT domain. The RT activity of Pl.LSU/2 IEP (WT and mtDD-) in RNP particle preparations was assayed with the artificial template-primer substrate poly(rA)-oligo$(dT)_{12-18}$. We show that RNP particles from cells expressing p151-E+I+IEP and purified by sucrose cushion centrifugation have an RT activity (Fig. 2B; RNP WT). Quantitatively, the RT activity of 0.1 $OD_{260\ nm}$ units of RNP particles is similar to that of 0.03 units



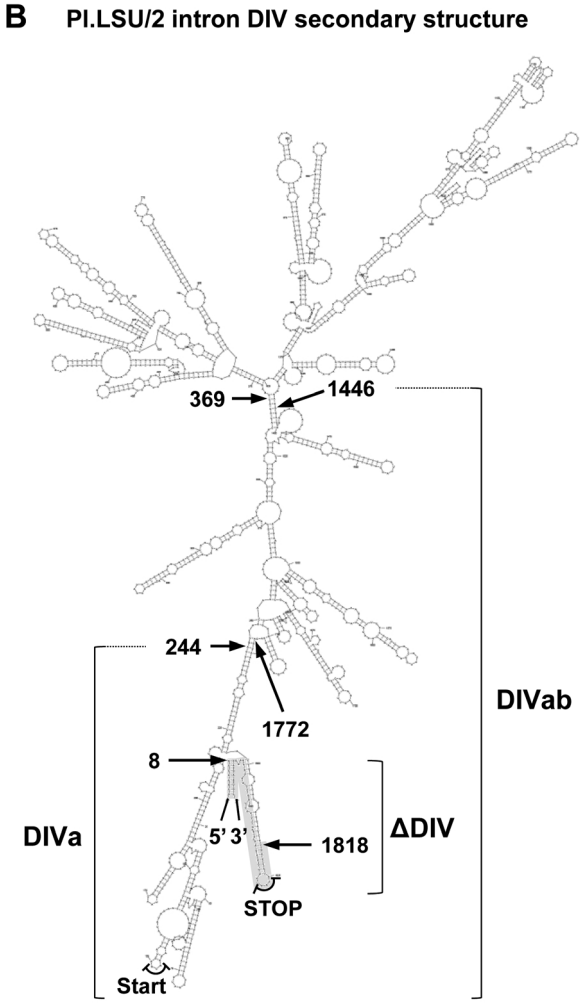


Figure 1. Schematic representation of plasmids and Pl.LSU/2 intron domain IV used. (*A*) Gray rectangles: Predicted protein domains shared by other group II intron ORFs; E2 and E3: exons flanking the Pl.LSU/2 group II intron [56]; bold line: Pl.LSU/2 group II intron; broken line: vector sequences; PT7: Specific promoter of the T7 bacteriophage RNA polymerase; TT7: T7 bacteriophage RNA polymerase transcription terminator; 6xHis: histidine tag; V5: V5 epitope; hatched rectangles: 50 last nt of E2 and 71 first nt of E3; diamond: position in which the RT catalytic motif YADD is mutated in YAAA on negative control plasmids (p151-E+I+IEPmtDD- and p151-IEPmtDD-). (*B*) Predicted RNA secondary structure of Pl.LSU/2 intron domain IV (DIV). Start and Stop codons of the IEP ORF are indicated. DIVa: section conserved in the intron-DIVa form (deletion from 244 to 1772 nt of DIV). DIVab: section conserved in the intron-DIVab form (deletion from 369 to 1446 nt of DIV). ΔDIV : section conserved in the intron-ΔDIV form (section highlighted in gray); the section from 8 to 1818 nt of DIV is replaced by the sequence CCTAGGATCT [54]. The detailed putative secondary structure is available in Fig. S2.
doi:10.1371/journal.pone.0058263.g001

of the commercial SuperScript® II reverse transcriptase (SSII RT; Life technologies, Invitrogen). The time course of RT reactions shows that the RT activity of WT IEP-containing RNPs increases over incubation time (Fig. 2C) and is positively correlated with the amount of RNP particles (Fig. 2D). As expected, the RT activity of the Pl.LSU/2 IEP is abolished by point mutations in the conserved YADD motif (Fig. 2B, 2C and 2D; RNP mtDD- conditions) and is similar to that of the background condition (Fig. 2C; No protein). The 6xHis tag was also used to purify RNP particles by immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) on a Ni^{2+}-charged column but no RT activity was ever detected in those RNP particle preparations (data not shown), suggesting that this purification process destabilizes the complex. These results indicate that the Pl.LSU/2 IEP in RNPs particles can be expressed in *E. coli* and purified by sucrose centrifugation thereby preserving its RT activity and thus its active conformation.

Pl.LSU/2 IEP is Active *in vitro* without the Help of the Intron RNA

Isolated Pl.LSU/2 IEP has *in vitro* RT activity. To analyze the intrinsic property of the Pl.LSU/2 IEP, we expressed the IEP in *E. coli* without coexpressing the intron RNA. We used the plasmid p151-IEP (Fig. 1A) which places the IEP ORF fused to the 6xHis and V5 epitope tags immediately downstream of the phage T7 promoter and Shine-Dalgarno sequence of the vector. This plasmid version was also constructed with a mutation of the YADD motif (Fig. 1A; indicated by a diamond). Both WT and mutant proteins were expressed in *E. coli* and then purified by sucrose cushion centrifugation. SDS-PAGE shows that the WT and the RT-defective IEPs (mtDD-) are successfully purified from *E. coli* lysates (Fig. 3A; Coomassie). The identity of the purified proteins is verified by western blot (Fig. 3A; WB) and by mass spectrometry (data not shown). It is worth noting that these purified protein fractions contain substantial amount of nucleic acids, in particular ribosomal RNAs (Fig. S1).

RT assays with Pl.LSU/2 IEP purified by sucrose cushion centrifugation show that the protein displays an intrinsic *in vitro* RT activity (Fig. 3B; IEP WT). This activity is abolished by mutations in the RT domain as expected (Fig. 3B; IEP mtDD-). The positive control SuperScript® II Reverse transcriptase (0.03 U) shows a number of pixels per spot of 18.1 x $10^6 \pm 5.78$ (not shown). It is noteworthy that no RT activity is detected following IMAC purification of IEP (WT and mtDD-, data not shown), which is consistent with previous findings obtained with RNPs. These data suggest that purification in sucrose cushion preserves the activity of the IEP and thereby its correct folding. It also demonstrates that recombinant IEP has intrinsic RT activity and does not necessarily require the help of intron RNA to become active.

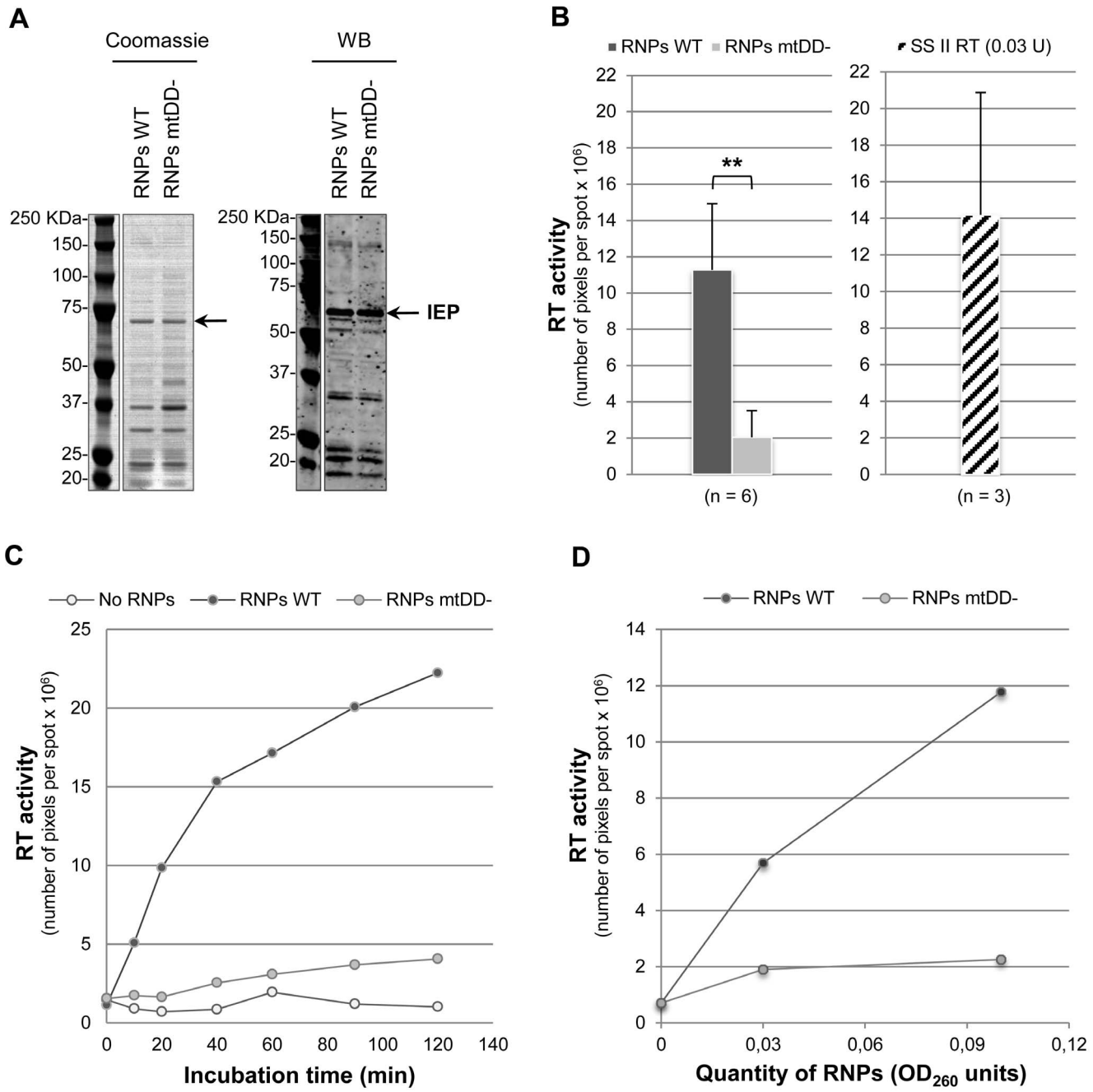


Figure 2. RT activity of Pl.LSU/2 IEP in RNP particles purified from *E. coli*. (*A*) SDS-PAGE analysis of IEP-containing RNPs preparations by Coomassie-blue staining (Coomassie) and western blot (WB). Quantities of RNPs used were 9 $OD_{260\ nm}$ units for RNPs with IEP WT (RNP WT) and 18 $OD_{260\ nm}$ units for RNPs with IEP mtDD- (RNP mtDD-). A monoclonal mouse anti-V5 antibody was used to detect the IEP by western blot. The IEP is indicated by the black arrow. Numbers at *left* indicate molecular mass markers in kilodaltons (KDa). (*B*) RT assays with 0.1 $OD_{260\ nm}$ units of RNPs. Dark gray bar: RNPs containing IEP WT; Light gray bar: RNPs containing IEP mtDD-; Hatched bar: control SuperScript® II reverse transcriptase (SS II RT). Data represent the number of pixels per spot indicating the [α-^{32}P]dTTP incorporation for each reaction. Data are the means of at least three independent experiments with the standard deviation indicated by thin lines. Data were subjected to a *t*-test using a unilateral pair-wise comparison procedure. A highly significant difference is indicated by asterisks ($p<6 \times 10^{-4}$). (*C*) Time course of RT reaction. RT activity of RNPs containing IEP (RNPs WT, dark gray dots) was assayed with 0.1 $OD_{260\ nm}$ units of RNPs. Reactions were performed using various incubation times. Experiments were also performed without RNP particles (No RNPs, light gray dots) or with RNP particles containing the mutant Pl.LSU/2 IEP mt DD- (RNPs mtDD-, gray dots). (*D*) Dose-dependent effect on RT activity. RT activity of RNPs containing IEP (RNPs WT, dark gray dots) or mutant IEP (RNPs mtDD-, light gray dots) was assayed with different quantities of RNPs for 45 min.
doi:10.1371/journal.pone.0058263.g002

Splicing Assay of Pl.LSU/2 Intron in *S. cerevisiae*

In vitro self-splicing of Pl.LSU/2 has been demonstrated [54] using a deleted form of the intron in the domain IV (See Fig. 1B; intron-ΔDIV). However, most group II introns need the maturase activity of their IEP to achieve *in vivo* splicing. In *Lactococcus lactis* Ll.LtrB group II intron, the LtrA intron-encoded protein interacts

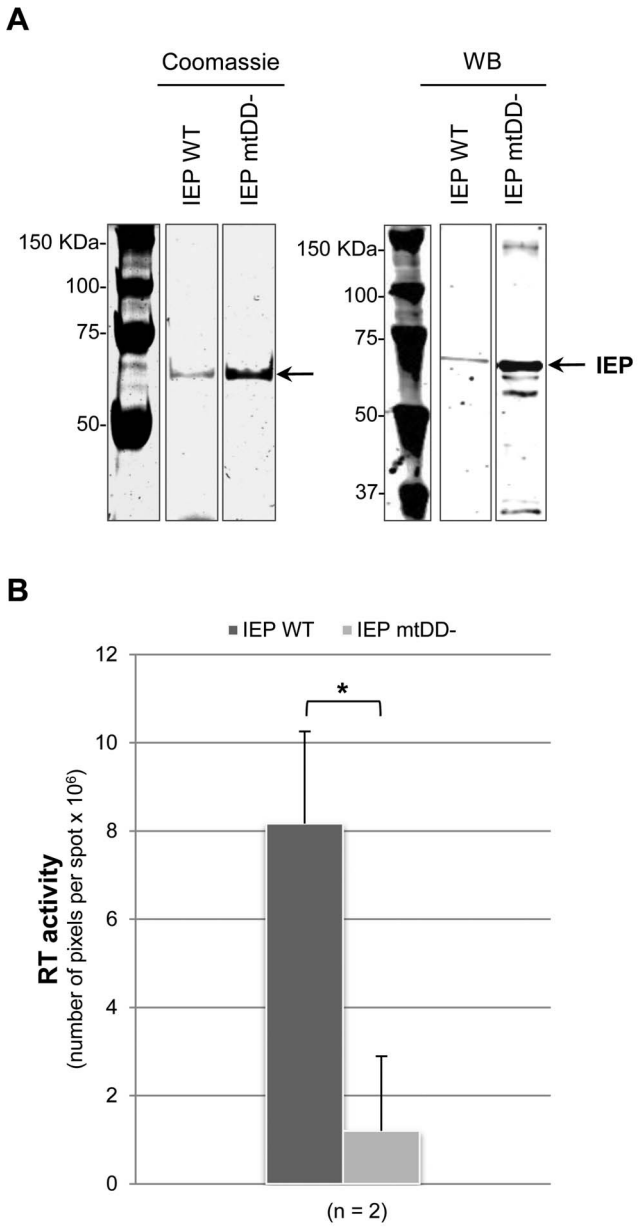


Figure 3. RT activity of Pl.LSU/2 IEP purified from *E. coli*. (*A*) Analysis of IEP purification by SDS-PAGE with Coomassie-blue staining (Coomassie) and western blot (WB). Volumes loaded contain 5–10 µg of purified protein fraction. A monoclonal mouse anti-V5 antibody was used to detect the IEP by western blot. The IEP is indicated by the black arrow. Numbers at *left* indicate molecular mass markers in kilodaltons (KDa). (*B*) RT assays with 100 ng of IEP. Dark gray bar: IEP WT; Light gray bar: IEP mtDD-. Data are the mean of two independent experiments with the standard deviation indicated by thin lines. Data were subjected to a *t*-test using a unilateral pair-wise comparison procedure. A significant difference is indicated by asterisk ($p<0.036$).
doi:10.1371/journal.pone.0058263.g003

with a substructure located in the beginning of the domain IV, and other contacts are made with the conserved core regions of the intron [27,67]. In order to evaluate the influence of the IEP on the splicing of the Pl.LSU/2 intron in yeast, we included a part of the domain IV in our construction. This domain corresponds to DIVab indicated in the secondary structure of the domain IV (1870 nucleotides) predicted by the S-fold software (See Fig. 1B; Fig. S2). This DIVab domain retains putatively most of the predicted secondary structure of domain IV (S-fold prediction, not shown).

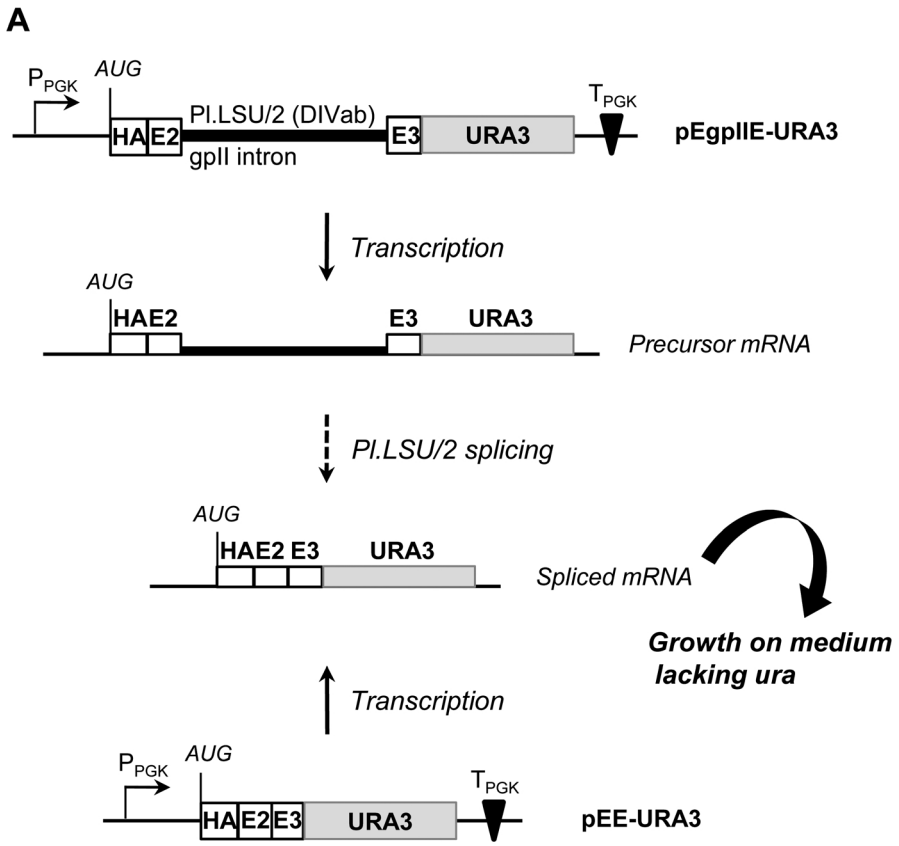
To study the expression and splicing of the Pl.LSU/2 intron in yeast, we developed a *URA3*-based intron-splicing reporter expressed from a 2-µ plasmid (Fig. 4A; pEgpIIE-URA3; Table S1 A). The Pl.LSU/2 (DIVab) intron flanked by its natural exons (50 last nucleotides of exon 2 and 71 first nucleotides of exon 3) [54] was fused to the coding sequence of URA3, which encodes a orotidine 5-phosphate decarboxylase (Ura3p). The *URA3* gene is read in-frame only upon precise Pl.LSU/2 splicing, which should lead to Ura3p expression and growth of an ura3- (*ura3Δ0*) strain of *S. cerevisiae* on minimal media lacking uracil (Fig. 4A). Expression of the Ura3p can be detected with an HA tag added upstream of the exon 2, generating the fusion HA-E2-E3-Ura3p. A control plasmid (pEE-URA3) was also used in this assay to ensure that the hybrid HA-E2-E3-URA3 protein is able to complement the ura3- mutation.

Previous studies have shown that optimal splicing of the bacterial Ll.LtrB group II intron in bacteria and yeast requires the maturase activity of its encoded protein, LtrA, by promoting the folding of the intron RNA into its catalytically active structure. The open reading frame of Pl.LSU/2 intron contains a conserved X domain similar to that of LtrA. Therefore, to determine if Pl.LSU/2 IEP has maturase activity facilitating the splicing of its intron, we first attempted to demonstrate intron splicing through functional restoration of yeast growth in the *URA3*-based intron-splicing reporter assay. In this system, the IEP protein was conditionally expressed using an inducible GAL10 promoter plasmid (Fig. 4B; pNLS-IEP^{co}) and intron sequences were delivered *in trans*. For these experiments, we used an IEP sequence that was codon-optimized for translation in human cells (IEP^{co}) tagged in C-terminus with c-Myc epitopes, and containing nuclear localization signals (NLS) of the SV-40 T-antigen (Fig. 4B) to address the protein to the nucleus. The inducible/repressible expression of the NLS-IEP^{co} was confirmed respectively in galactose (Gal) and glucose (Glc) media and nuclear localization of the protein was verified by western blot analysis on yeast nuclear protein extracts (data not shown).

Yeasts were thus transformed with either the control pEE-URA3 plasmid or the pEgpIIE-URA3 plasmid. Subsequently, the NLS-IEP^{co} expressing plasmid was transformed or not in yeast carrying pEgpIIE-URA3 and the number of colonies on medium containing or not uracil was determined for each condition (Fig. 4C). Functional restoration of growth could not be demonstrated in the *URA3*-based intron splicing reporter assay. Yeasts expressing the EgpIIE-URA3 cassette repeatedly fail to grow on the –ura selective medium, even when EgpIIE-URA3 is coexpressed with NLS-IEP^{co} (Fig. 4C). However, yeasts grow on minimal medium lacking uracil when the cells are transformed with the pEE-URA3 plasmid encoding the hybrid E2-E3-URA3 protein proving the orotidine 5-phosphate decarboxylase activity of the hybrid protein, as it confers the ability to complement the ura- mutation (Fig. 4C). Thus, the splicing of the Pl.LSU/2 intron could not be demonstrated through this assay into yeast cells.

Pl.LSU/2 Group II Intron can Splice in Yeast in an IEP-dependent Manner

Since the assay reads-out both RNA splicing and translation of the spliced mRNA, further investigation was conducted to determine if RNAs were transcribed, spliced and translated. To determine if the Pl.LSU/2 intron was spliced from the precursor mRNA, an RT-PCR analysis was performed on RNA extracted from yeast cells harboring either pEE-URA3 or pEgpIIE-URA3





C

	Number of colonies / ml	
	+ ura	*- ura*
pEE-URA3	> 3.10^3	> 3.10^3
pEgpIIE-URA3	> 3.10^3	0
pEgpIIE-URA3 +pNLS-IEPco	> 3.10^3	0

Figure 4. ***In vivo*** **splicing assay of Pl.LSU/2 intron in** ***Saccharomyces cerevisiae.*** (*A*) Schematic representation of the group II intron splicing reporter assay. PPGK: Phosphoglycerate kinase gene promoter; TPGK: Phosphoglycerate kinase gene transcription terminator; E2 and E3:50 last nt of exon 2 and 71 first nt of exon 3; bold line: Pl.LSU/2 intron-DIVab; light gray rectangle: URA3 ORF; HA: HA epitope; AUG: Translation start codon. See text for detailed description of the assay. (*B*) Schematic representation of the NLS-IEP^{co} expressing plasmid. PGAL10: UDP-Galactose epimerase gene promoter; TGAL10: UDP-Galactose epimerase gene transcription terminator; dark gray rectangle: human codon-optimized Pl.LSU/2 IEP ORF (IEP^{co}); 3xNLS: nuclear localization signals; Myc: stretch of 3 c-Myc epitopes. (*C*) Numbers of yeast colonies growing on appropriate minimal medium containing (+ura) or not (−ura) uracil. Strain carrying pEE-URA3 was used as a control. Strain carrying pEgpIIE-URA3 splicing reporter was transformed or not with the NLS-IEP^{co} expressing plasmid (pNLS-IEP^{co}). Three resulting transformants were cultured until $OD_{600\ nm}$ reached 2.5 and applied on the appropriate minimal medium using a 10^{-4} dilution of the culture. Data indicate the numbers of yeast colonies on the plate per ml of the dilution.
doi:10.1371/journal.pone.0058263.g004

expressed in the presence or absence of NLS-IEP^{co}. Two different pairs of primers were used to specifically amplify cDNA obtained from precursor or spliced mRNA (Fig. 5A; Table S1 B). We first show that the pEgpIIE-URA3 splicing reporter allows the expression of precursor mRNA in all conditions (Fig. 5B; precursor cDNA, pEgpIIE-URA3). As expected, the control plasmid pEE-URA3 allows the expression only of a mRNA corresponding to the spliced mRNA (Fig. 5B; pEE-URA3). In absence of NLS-IEP^{co}, a poorly efficient splicing of Pl.LSU/2 can be detected from yeast harbouring the pEgpIIE-URA3 reporter (Fig. 5B; spliced cDNA, pEgpIIE-URA3). It is worth noting that splicing efficiency is significantly increased when NLS-IEP^{co} is expressed into yeast cells (Fig. 5B; spliced cDNA, Glucose−/Galactose+). Accurate Pl.LSU/2 splicing was verified by sequencing across the splice junction of the RT-PCR spliced products (data not shown). These results were quantified using an RT-qPCR analysis performed on four independent experiments (Fig. 5C). Precursor and spliced cDNA copy numbers were calculated and ratios of spliced/precursor cDNA were determined to measure splicing efficiency. We confirm that in absence of NLS-IEP^{co} expression (Glc+/Gal−), the splicing of Pl.LSU/2 is poorly efficient while the Pl.LSU/2 intron splicing efficiency in yeast cells is significantly increased upon NLS-IEP^{co} expression (Fig. 5C; Glc−/Gal+; between 2.1 and 7.9 fold change compared to background; $p<0{,}032$, *t*-test using a unilateral pair-wise comparison). These results indicate first that the Pl.LSU/2 intron can be expressed in yeast and also that the IEP presents a maturase activity *in vivo*.

Spliced Pl.LSU/2 Group II Transcripts are not Translated

The results of the phenotypic analysis showing an absence of clones on medium lacking uracil (Fig. 4C) and the level of splicing observed in yeast harboring the pEgpIIE-URA3 reporter and expressing the NLS-IEP^{co} (Fig. 5C) suggested a blockade in expression of the spliced messenger. Indeed, we had not been able to detect by western blot the Ura3p hybrid protein resulting theoretically from the Pl.LSU/2 spliced mRNA (Fig. 5D; pEgpIIE-URA3, Ura3p), even upon robust NLS-IEP^{co} expression (Fig. 5D). In contrast, high levels of Ura3p hybrid protein are expressed in yeast harboring pEE-URA3 (Fig. 5D). The absence of detectable level of Ura3p in yeast carrying pEgpIIE-URA3 thus explains the failure of functional growth restoration in the *URA3*-based intron splicing reporter assay.

Splicing Assay of Pl.LSU/2 Intron in Human Cells

To study if the splicing of the Pl.LSU/2 intron could also occur in human cells, we first aimed to determine if the Pl.LSU/2 intron could be expressed in the colon carcinoma HCT 116 cell line. We tested various forms of the intron in which the domain IV was more or less extensively deleted (See Fig. 1B; ΔDIV, DIVa, DIVab and full length intron). To stably express the various intron sequences in human cells, we transduced HCT 116 cells with lentiviral gene transfer vectors (LVs) expressing the different forms of the PI.LSU/2 intron flanked by the last 50 nucleotides of exon 2 and the first 71 nucleotides of exon 3 (Fig. 6A; upper panel; pRRL-intron +/−DIV). Transduced HCT 116 cells were expanded for at least ten days to establish stable cell lines expressing the different forms of the intron. RT-PCR using primers p5 and p6 hybridizing E2 and E3, respectively (Fig. 6A; upper panel; Table S1 B) shows expression of the appropriate precursor transcripts in each stable cell lines (Fig. 6A; lower panel; amplicons of 736 bp for ΔDIV intron, 1020 bp for DIVa intron, 1472 bp for DIVab intron and 2534 bp for full length intron). Nevertheless, we did not find any trace of spliced mRNA in any of the stable cell lines analyzed (data not shown). These results suggest that Pl.LSU/2 intron RNA can be expressed but does not splice in human cells.

To determine if the intron-encoded protein could promote splicing of Pl.LSU/2 intron in human cells, we induced the expression of Pl.LSU/2 IEP^{co} or GFP-IEP^{co} fusion protein in human HCT 116 cells by transduction with protein-expressing LVs (Fig. 6B; upper panel). Forty eight hours following transduction of HCT 116 cells with the LV, western blot analysis demonstrates expression of the IEP^{co} or GFP-IEP^{co} in the cells (Fig. 6B; lower panel). GFP expression was also confirmed by western blot using an anti-GFP antibody and by evidence of nuclear localization following microscopy analysis (data not shown).

The previously described Pl.LSU/2 intron expressing stable lines were then transduced by these LVs. Western blot analysis showed the expression of IEP^{co} and GFP-IEP^{co} in these cells (data not shown). To determine the Pl.LSU/2 intron splicing capacity in the presence of IEP, RNAs were extracted and analyzed by RT-qPCR. Primers p7 and p4 (Table S1 B), hybridizing E2 and E2–E3 junction respectively, were used to detect the spliced mRNA. Primers p1 and p2 (Table S1 B), hybridizing E2 and E2-Intron junction respectively, were used to detect the precursor mRNA. Ratios of spliced/precursor cDNA copy number, which determine the splicing efficiency, are less than 2.10^{-4} in every condition tested and for every form of the Pl.LSU/2 intron tested (data not shown). This result shows that, in contrast to yeast, the Pl.LSU/2 intron is unable to splice efficiently in human cells in this context, even in presence of the intron-encoded protein that was codon-optimized for translation in human cells.

Discussion

This study provides the first functional description of the ribozyme activity of the Pl.LSU/2 group II intron *in vivo*. A catalytically-active recombinant PI.LSU/2 intron-encoded protein can be produced in *E. coli* and purified. This protein presents a reverse transcriptase activity *in vitro* both alone or when coexpressed with the intronic RNA. It also displays a maturase activity which facilitates the splicing of the Pl.LSU/2 intron *in vivo* in yeast in a IEP dose-dependent manner.

These results contribute to characterize the poorly studied Pl.LSU/2 intron. Prior to our study, no information was yet available on the *in vivo* properties of this intron, neither in its natural environment nor in experimental systems. The description of the RT and maturase activities of the IEP confirms some of the predicted properties encoded by the domain IV of the intron which was known to contain an open reading frame theoretically encoding a protein presenting the four characteristic domains (RT, X/maturase, D and En) of other group II intron-encoded proteins [55,56].

One limitation of the use of group II introns in eukaryotes could be the requirement for a correct folding of both the IEP and the intron RNA, therefore it is important to assess the cooperation between the intron and IEP. Here, we show for the first time that the Pl.LSU/2 IEP displays a RT activity when complexed as RNP. In addition, the PI.LSU/2 IEP has an intrinsic RT activity *in vitro* in the absence of the intron RNA. However, one can postulate that the presence of nucleic acids in the sucrose cushion purification fractions may participate in the Pl.LSU/2 IEP stabilization and activity. In previous studies of the Lambowitz group [23,53,65], the *Lactococcus lactis* Ll.LtrB IEP (LtrA) correct folding was demonstrated by its RT activity either alone or when coexpressed with its intron RNA. Moreover, highly active LtrA

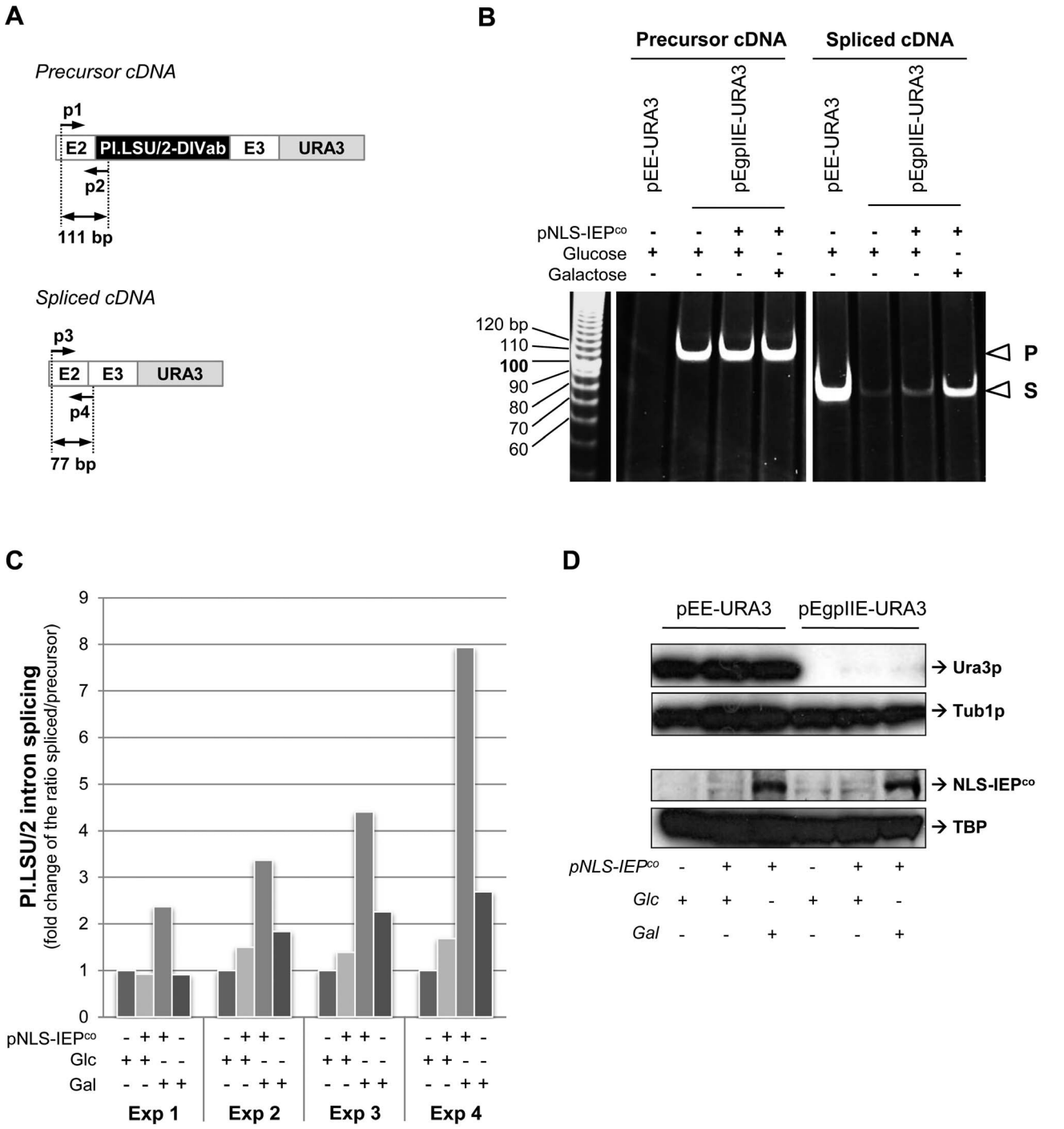


Figure 5. IEP-mediated PI.LSU/2 splicing *in vivo*. (*A*) Schematic representation of amplification products from precursor and spliced cDNA obtained by RT-PCR. Black rectangle: PI.LSU/2 intron-DIVab; E2 and E3:50 last nt of exon 2 and 71 first nt of exon 3; gray rectangle: URA3 ORF; black arrow: primer; p1 and p2: forward and reverse primers amplifying cDNA derived from the precursor mRNA (111 bp product); p3 and p4: forward and reverse primers amplifying cDNA derived from the spliced mRNA (77 bp product). (*B*) Acrylamide electrophoresis of RT-PCR products.Total RNA were extracted from yeast carrying pEE-URA3 or pEgpIIE-URA3 and transformed (+) or not (−) with the NLS-IEP^{co} expressing plasmid (pNLS-IEP^{co}). Cells were grown in presence (+) or absence (−) of glucose or galactose (inducer of the NLS-IEP^{co} expression). P: amplification product from precursor cDNA; S: amplification product from spliced cDNA. Numbers at *left* indicate molecular mass marker in base pair (bp). (*C*) Quantification of the PI.LSU/2 *in vivo* splicing by RT-qPCR. cDNA copy number obtained from spliced and precursor mRNA were calculated using standard amplification curves made by serial dilutions of SphI-linearized pEE-URA3 and pEgpIIE-URA3 plasmids, respectively. Ratios of spliced/precursor cDNA copy number were determined and data were normalized on condition 1 (pNLS-IEPco (−); Glc+; Gal−). Four independent experiments are represented (Exp 1 to Exp 4). (*D*) Western blot analysis of Ura3p made from pEE-URA3 or pEgpIIE-URA3. Yeast strains were cultivated in glucose (Glc+; Gal−) or in galactose (Glc−; Gal+) and in absence (−) or presence (+) of pNLS-IEP^{co}. Tubulin 1 protein (Tub1p) expression was also determined, as well as nuclear expression of NLS-IEP^{co} and TATA-Binding protein (TBP).

doi:10.1371/journal.pone.0058263.g005

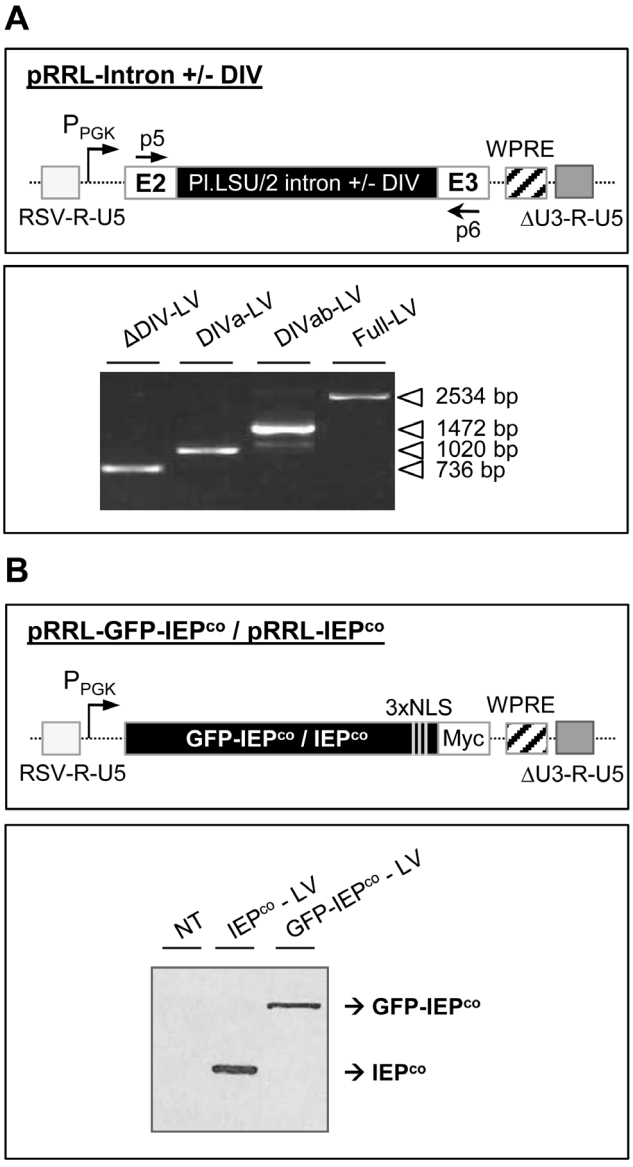


Figure 6. *In vivo* splicing assay of PI.LSU/2 intron in human cell lines. (*A*) *Upper panel.* Schematic representation of PI.LSU/2 intron transfer cassettes (pRRL-Intron +/− DIV) used in this study. Several sizes of the intron domain IV are used (See Fig. 1B; ΔDIV, DIVa, DIVab and full length DIV; Table S1 A). HCT 116 cells were transduced by the corresponding VSV-G-pseudotyped lentiviral vectors (LVs) to establish stable cell lines expressing the four different forms of PI.LSU/2 intron. Light gray rectangle : chimeric 5′ LTR (RSV-R-U5); P_{PGK}: phosphoglycerate kinase gene promoter; E2 and E3:50 last nt of exon 2 and 71 first nt of exon 3; black rectangle : PI.LSU/2 intron with various size of the DIV (See Fig. 1B); WPRE: Woodchuck hepatitis post-transcriptional regulation element; p5 and p6: forward and reverse primers amplifying cDNA derived from precursor and spliced RNA; dark gray rectangle : 3′ LTR (ΔU3-R-U5). *Lower panel.* Agarose electrophoresis of RT-PCR products. HCT 116 cells were transduced with PI.LSU/2 intron-expressing LVs (ΔDIV-LV, DIVa-LV, DIVab-LV or Full-LV) and stable cell lines were established. Total RNAs were extracted from the four stable cell lines expressing the different forms of the intron and precursor mRNAs were detected by RT-PCR. (*B*) *Upper panel.* Schematic representation of PI.LSU/2 IEP gene transfer cassettes used in this study. Black rectangle: codon-optimized sequence of PI.LSU/2 IEP for translation in human cells, in frame with GFP encoding sequence (GFP-IEP^{co}) or not (IEP^{co}); 3xNLS: nuclear localization signals; Myc: stretch of 3 c-Myc epitopes. *Lower panel.* Western blot analysis. HCT 116 cell line was either untransduced (NT) or transduced with either IEP^{co}-LV or GFP-IEP^{co}-LV. Total proteins were extracted from lysates 48 h after transduction and a monoclonal mouse anti-c-myc antibody was used to detect the IEP^{co} and the GFP-IEP^{co}.
doi:10.1371/journal.pone.0058263.g006

was recently obtained after nucleic acids removal prior to purification [65], showing that this protein does not require bounded nucleic acids to be stabilized. Similarly, Vellore et al. expressed in *E. coli* the G.st.I1 intron-encoded protein (called *trt*) from *Geobacillus stearothermophilus* fused to a 6xHis tag without co-expressing the intron RNA [68]. The authors showed an RT activity using partially purified protein fraction. In the case of Pl.LSU/2, the IEP reverse transcriptase activity could be clearly demonstrated in the absence of intronic RNA, showing the PI.LSU2 IEP self-activation properties.

The biochemical properties of this IEP may also facilitate its use *in vivo*. The PI.LSU/2 intron can be engineered to splice *in vivo* in yeast and this is facilitated in a dose-dependent manner by the Pl.LSU/2 IEP. Although the Pl.LSU/2 IEP encoding gene used here is a codon-optimized sequence for translation in human cells, IEP translation in yeast is enough efficient to improve splicing of Pl.LSU/2. Presumably the maturase activity of the PI.LSU/2 IEP promotes the folding of the intron RNA into its catalytic tertiary structure *in vivo*. Interestingly, a residual splicing could be detected by RT-PCR and RT-qPCR using RNA extracts from yeasts that do not express the IEP. This IEP-independent splicing could have occur *in vivo* (which would be consistent with the ability of this intron to splice *in vitro* even under not optimal Mg^{2+} conditions [54]) or *in vitro* during the RT-PCR reactions precisely because this ribozyme is highly active *in vitro*.

In spite of evidence of functional properties of the PI.LSU/2 intron, we failed to develop a productive system for genomic targeting at this stage. While we demonstrated the presence of a spliced mRNA in yeast cells, there was no translation of the spliced mRNA since restoration of the URA3 ORF did not lead to the expected growth on a minimal medium without uracil. It is possible that the yield of spliced mRNA in yeast cells is not sufficient to the expression of a detectable amount of Ura3p proteins by western blot and that the yield of expressed Ura3p does not reach the required threshold for yeast growth on medium lacking uracil. However, the possibility of a translation blockade is reminiscent of results already reported by Chalamcharla et al. with the Ll.LtrB intron using different reporter genes [69]. The authors demonstrated that Ll.LtrB intron splicing occured predominantly in the cytoplasm of yeast cells and that precursor mRNA was subjected to nonsense-mediated mRNA decay (NMD). They also showed that the spliced mRNA was subjected to an NMD-independent translation blockade. However, the mechanism involved remains unknown. The authors speculated that the pairing mechanism between the intron lariat and the spliced mRNA via EBS (exon binding sites)/IBS (intron binding sites) interactions [6] could impede the spliced mRNA translation [69]. One would also postulate that the translation blockade could result from RNA sequestration to cytoplasmic microdomains such as P-bodies or stress granules that play important role in mRNA processing, including repression of translation and mRNA decay [70–72]. Anyway, the fact that this translation blockade also occurs through the use of Pl.LSU/2 group II intron supports the Chalamcharla et al. hypothesis that the mechanism involved is transposable to other group II introns and may has impeded their spread in eukaryotic nuclear genes.

We then tested the ability of the intron to splice in human cells. Here, we used different forms of the Pl.LSU/2 intron with deletions of various sizes of the domain IV in order to determine if one of these parts are required for intron high-affinity binding to

the IEP. The domain IV of the Ll.LtrB intron is known to bind its IEP [73], but is not needed for *in vitro* splicing, as in absence of it, a residual splicing occurs [27,67]. In the same way, the domain IV of the yeast *coxI*-I2 intron is required for stable binding of its IEP and additional contacts with the catalytic core of the intron promote the splicing [74]. The domain IV of group II introns appears to guide the interactions or anchor the IEP to catalytic core regions of the intron. In spite of the use of various domain IV coding regions, in spite of using a humanized codon-optimized IEP, in spite of evidence of expression of the IEP and intron in human cells and in spite of the expected nuclear localization of the recombinant IEP in human cells, we failed to detect any splicing of Pl.LSU/2 intron in human cells. Misfolding of IEP and/or intron RNA could explain this splicing defect, but alternatively, defective nuclear/cytoplasmic compartimentalization or inadapted environnement could also be implicated.

The adaptation of group II introns homing mechanism could be considered in the context of a gene repair strategy approach in gene therapy. In current gene therapy assays, the transgene integration with retroviral vectors is not site-specific. Expression of therapeutic transgenes is sometimes unregulated due to *cis*-acting elements present in the neighbouring of the insertion site. Insertions near oncogenes also present a risk of activation by promoters or enhancers carried by the vector [75–80]. All of these issues could be circumvented by targeting the insertion into the original site (gene repairing). The repaired wild type copy will be under the control of original cis-regulating sequences. Today, strategies based on genome double strand breaks (DSB) in order to achieved reparation by homologous recombination are thouroughly investigated. The use of group II intron could be an alternative approache avoiving the putative genotoxicity due to off-target DSB.

We present encouraging data that suggest that PI.LSU/2 group II intron could have advantageaous qualities for engineering genomic targeting strategies. This intron and its IEP function *in vivo* in yeast. However, the use of Pl.LSU/2 and other group II introns in human genomic engineering will require further optimizations.

Supporting Information

Figure S1 Nucleic acids in IEP and RNPs purified fractions. Agarose gel electrophoresis of 1 µg and 250 ng of nucleic acids in IEP and RNPs purified fractions (WT and mtDD-) respectively, obtained after ultracentrifugation in sucrose cushion. Numbers at *left* indicate size of DNA ladder in base pair (bp).
(TIF)

Figure S2 Secondary structure of the Pl.LSU/2 intron domain IV predicted by sFold. Pl.LSU/2 intron domain IV (DIV; 1870 nts) predicted RNA secondary structure obtained with the sFold software (http://sfold.wadsworth.org). The domain IV used is from nucleotide 494 to nucleotide 2363 of the Pl.LSU/2 intron.
(TIF)

Table S1 Plasmid and oligonucleotids used in this work. (*A*) Relevant characteristics of plasmids used in this work. References cited in the last column are listed at the end of the table. (*B*) DNA sequence of oligonucleotides used in this work.
(DOCX)

Acknowledgments

We are very grateful for technical help from Damien Mansard, Cécile K. Lopez, Alexandrine Garnier, Khalil Seye, Stéphanie Matrat and Marie-Noëlle Monier in our group at Genethon. We also thank François Michel and Maria Costa (Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, Gif-sur-Yvette) for providing plasmids containing the Pl.LSU/2 intron and for helpful discussions, Guillaume Sirantoine for sequencing, Stéphanie Bucher and the molecular biology development group for titrating vectors batches and Thierry Larmonier and Lucia Braga-Vacherie from the Genethon Biological Resources Center for help with human cell line banking. We also are very grateful to Fedor Svinartchouk and the Biomarkers group for their significant input with mass spectrometry analyses of purified proteins.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JP NH MZ. Performed the experiments: MZ NH DI SF. Analyzed the data: JP NH AG MZ. Contributed reagents/materials/analysis tools: SF DI. Wrote the paper: JP NH MZ AG.

References

1. Saldanha R, Mohr G, Belfort M, Lambowitz AM (1993) Group I and group II introns. FASEB J 7: 15–24.
2. Lambowitz AM, Zimmerly S (2004) Mobile group II introns. Annu Rev Genet 38: 1–35.
3. Toor N, Keating KS, Pyle AM (2009) Structural insights into RNA splicing. Curr Opin Struct Biol 19: 260–266.
4. Guo H, Karberg M, Long M, Jones JP 3rd, Sullenger B, et al. (2000) Group II introns designed to insert into therapeutically relevant DNA target sites in human cells. Science 289: 452–457.
5. Karberg M, Guo H, Zhong J, Coon R, Perutka J, et al. (2001) Group II introns as controllable gene targeting vectors for genetic manipulation of bacteria. Nat Biotechnol 19: 1162–1167.
6. Mohr G, Smith D, Belfort M, Lambowitz AM (2000) Rules for DNA target-site recognition by a lactococcal group II intron enable retargeting of the intron to specific DNA sequences. Genes Dev 14: 559–573.
7. Garcia-Rodriguez FM, Barrientos-Duran A, Diaz-Prado V, Fernandez-Lopez M, Toro N (2011) Use of RmInt1, a group IIB intron lacking the intron-encoded protein endonuclease domain, in gene targeting. Appl Environ Microbiol 77: 854–861.
8. Urnov FD, Miller JC, Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, et al. (2005) Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. Nature 435: 646–651.
9. Alwin S, Gere MB, Guhl E, Effertz K, Barbas CF 3rd, et al. (2005) Custom zinc-finger nucleases for use in human cells. Mol Ther 12: 610–617.
10. Mussolino C, Morbitzer R, Lutge F, Dannemann N, Lahaye T, et al. (2011) A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. Nucleic Acids Res 39: 9283–9293.
11. Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, Lai CS, Gao Q, et al. (2011) Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. Nat Biotechnol 29: 731–734.
12. Grizot S, Smith J, Daboussi F, Prieto J, Redondo P, et al. (2009) Efficient targeting of a SCID gene by an engineered single-chain homing endonuclease. Nucleic Acids Res 37: 5405–5419.
13. Arnould S, Perez C, Cabaniols JP, Smith J, Gouble A, et al. (2007) Engineered I-CreI derivatives cleaving sequences from the human XPC gene can induce highly efficient gene correction in mammalian cells. J Mol Biol 371: 49–65.
14. Haugen P, Simon DM, Bhattacharya D (2005) The natural history of group I introns. Trends Genet 21: 111–119.
15. Mohr G, Perlman PS, Lambowitz AM (1993) Evolutionary relationships among group II intron-encoded proteins and identification of a conserved domain that may be related to maturase function. Nucleic Acids Res 21: 4991–4997.
16. Cui X, Matsuura M, Wang Q, Ma H, Lambowitz AM (2004) A group II intron-encoded maturase functions preferentially in cis and requires both the reverse transcriptase and X domains to promote RNA splicing. J Mol Biol 340: 211–231.
17. Delahodde A, Goguel V, Becam AM, Creusot F, Perea J, et al. (1989) Site-specific DNA endonuclease and RNA maturase activities of two homologous intron-encoded proteins from yeast mitochondria. Cell 56: 431–441.
18. Wenzlau JM, Saldanha RJ, Butow RA, Perlman PS (1989) A latent intron-encoded maturase is also an endonuclease needed for intron mobility. Cell 56: 421–430.
19. Schafer B, Wilde B, Massardo DR, Manna F, Del Giudice L, et al. (1994) A mitochondrial group-I intron in fission yeast encodes a maturase and is mobile in crosses. Curr Genet 25: 336–341.

20. Ho Y, Kim SJ, Waring RB (1997) A protein encoded by a group I intron in Aspergillus nidulans directly assists RNA splicing and is a DNA endonuclease. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 8994–8999.
21. Szczepanek T, Jamoussi K, Lazowska J (2000) Critical base substitutions that affect the splicing and/or homing activities of the group I intron bi2 of yeast mitochondria. Mol Gen Genet 264: 137–144.
22. Belfort M (2003) Two for the price of one: a bifunctional intron-encoded DNA endonuclease-RNA maturase. Genes Dev 17: 2860–2863.
23. Matsuura M, Saldanha R, Ma H, Wank H, Yang J, et al. (1997) A bacterial group II intron encoding reverse transcriptase, maturase, and DNA endonuclease activities: biochemical demonstration of maturase activity and insertion of new genetic information within the intron. Genes Dev 11: 2910–2924.
24. Guo H, Zimmerly S, Perlman PS, Lambowitz AM (1997) Group II intron endonucleases use both RNA and protein subunits for recognition of specific sequences in double-stranded DNA. EMBO J 16: 6835–6848.
25. Kennell JC, Moran JV, Perlman PS, Butow RA, Lambowitz AM (1993) Reverse transcriptase activity associated with maturase-encoding group II introns in yeast mitochondria. Cell 73: 133–146.
26. Singh NN, Lambowitz AM (2001) Interaction of a group II intron ribonucleoprotein endonuclease with its DNA target site investigated by DNA footprinting and modification interference. J Mol Biol 309: 361–386.
27. Wank H, SanFilippo J, Singh RN, Matsuura M, Lambowitz AM (1999) A reverse transcriptase/maturase promotes splicing by binding at its own coding segment in a group II intron RNA. Mol Cell 4: 239–250.
28. San Filippo J, Lambowitz AM (2002) Characterization of the C-terminal DNA-binding/DNA endonuclease region of a group II intron-encoded protein. J Mol Biol 324: 933–951.
29. Mastroianni M, Watanabe K, White TB, Zhuang F, Vernon J, et al. (2008) Group II intron-based gene targeting reactions in eukaryotes. PLoS One 3: e3121.
30. Barzel A, Privman E, Peeri M, Naor A, Shachar E, et al. (2011) Native homing endonucleases can target conserved genes in humans and in animal models. Nucleic Acids Res 39: 6646–6659.
31. Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKelver RC, Moehle EA, et al. (2009) Precise genome modification in the crop species Zea mays using zinc-finger nucleases. Nature 459: 437–441.
32. Durai S, Mani M, Kandavelou K, Wu J, Porteus MH, et al. (2005) Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. Nucleic Acids Res 33: 5978–5990.
33. Porteus MH (2009) Plant biotechnology: Zinc fingers on target. Nature 459: 337–338.
34. Yao J, Lambowitz AM (2007) Gene targeting in gram-negative bacteria by use of a mobile group II intron ("Targetron") expressed from a broad-host-range vector. Appl Environ Microbiol 73: 2735–2743.
35. Chen Y, McClane BA, Fisher DJ, Rood JI, Gupta P (2005) Construction of an alpha toxin gene knockout mutant of Clostridium perfringens type A by use of a mobile group II intron. Appl Environ Microbiol 71: 7542–7547.
36. Yao J, Zhong J, Fang Y, Geisinger E, Novick RP, et al. (2006) Use of targetrons to disrupt essential and nonessential genes in Staphylococcus aureus reveals temperature sensitivity of Ll.LtrB group II intron splicing. RNA 12: 1271–1281.
37. Zarschler K, Janesch B, Zayni S, Schaffer C, Messner P (2009) Construction of a gene knockout system for application in Paenibacillus alvei CCM 2051T, exemplified by the S-layer glycan biosynthesis initiation enzyme WsfP. Appl Environ Microbiol 75: 3077–3085.
38. Zhuang F, Karberg M, Perutka J, Lambowitz AM (2009) EcI5, a group IIB intron with high retrohoming frequency: DNA target site recognition and use in gene targeting. RNA 15: 432–449.
39. Smith J, Grizot S, Arnould S, Duclert A, Epinat JC, et al. (2006) A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. Nucleic Acids Res 34: e149.
40. Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, et al. (2010) Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. Genetics 186: 757–761.
41. Li T, Huang S, Jiang WZ, Wright D, Spalding MH, et al. (2011) TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. Nucleic Acids Res 39: 359–372.
42. Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D (2002) Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in Drosophila using zinc-finger nucleases. Genetics 161: 1169–1175.
43. Jeggo PA (1998) DNA breakage and repair. Adv Genet 38: 185–218.
44. van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. Nat Rev Genet 2: 196–206.
45. Frazier CL, San Filippo J, Lambowitz AM, Mills DA (2003) Genetic manipulation of Lactococcus lactis by using targeted group II introns: generation of stable insertions without selection. Appl Environ Microbiol 69: 1121–1128.
46. Zhong J, Karberg M, Lambowitz AM (2003) Targeted and random bacterial gene disruption using a group II intron (targetron) vector containing a retrotransposition-activated selectable marker. Nucleic Acids Res 31: 1656–1664.
47. Perutka J, Wang W, Goerlitz D, Lambowitz AM (2004) Use of computer-designed group II introns to disrupt Escherichia coli DExH/D-box protein and DNA helicase genes. J Mol Biol 336: 421–439.
48. Michel F, Ferat JL (1995) Structure and activities of group II introns. Annu Rev Biochem 64: 435–461.
49. Huang HR, Rowe CE, Mohr S, Jiang Y, Lambowitz AM, et al. (2005) The splicing of yeast mitochondrial group I and group II introns requires a DEAD-box protein with RNA chaperone function. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 163–168.
50. Qin PZ, Pyle AM (1998) The architectural organization and mechanistic function of group II intron structural elements. Curr Opin Struct Biol 8: 301–308.
51. Toor N, Keating KS, Taylor SD, Pyle AM (2008) Crystal structure of a self-spliced group II intron. Science 320: 77–82.
52. Romani AM, Maguire ME (2002) Hormonal regulation of Mg2+ transport and homeostasis in eukaryotic cells. Biometals 15: 271–283.
53. Saldanha R, Chen B, Wank H, Matsuura M, Edwards J, et al. (1999) RNA and protein catalysis in group II intron splicing and mobility reactions using purified components. Biochemistry 38: 9069–9083.
54. Costa M, Fontaine JM, Loiseaux-de Goer S, Michel F (1997) A group II self-splicing intron from the brown alga Pylaiella littoralis is active at unusually low magnesium concentrations and forms populations of molecules with a uniform conformation. J Mol Biol 274: 353–364.
55. Fontaine JM, Goux D, Kloareg B, Loiseaux-de Goer S (1997) The reverse-transcriptase-like proteins encoded by group II introns in the mitochondrial genome of the brown alga Pylaiella littoralis belong to two different lineages which apparently coevolved with the group II ribosyme lineages. J Mol Evol 44: 33–42.
56. Fontaine JM, Rousvoal S, Leblanc C, Kloareg B, Loiseaux-de Goer S (1995) The mitochondrial LSU rDNA of the brown alga Pylaiella littoralis reveals alpha-proteobacterial features and is split by four group IIB introns with an atypical phylogeny. J Mol Biol 251: 378–389.
57. Costa M, Christian EL, Michel F (1998) Differential chemical probing of a group II self-splicing intron identifies bases involved in tertiary interactions and supports an alternative secondary structure model of domain V. RNA 4: 1055–1068.
58. Costa M, Michel F (1999) Tight binding of the 5′ exon to domain I of a group II self-splicing intron requires completion of the intron active site. EMBO J 18: 1025–1037.
59. Costa M, Michel F, Westhof E (2000) A three-dimensional perspective on exon binding by a group II self-splicing intron. EMBO J 19: 5007–5018.
60. Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, et al. (1998) Designer deletion strains derived from Saccharomyces cerevisiae S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. Yeast 14: 115–132.
61. Ding Y, Chan CY, Lawrence CE (2005) RNA secondary structure prediction by centroids in a Boltzmann weighted ensemble. RNA 11: 1157–1166.
62. Ding Y, Lawrence CE (2003) A statistical sampling algorithm for RNA secondary structure prediction. Nucleic Acids Res 31: 7280–7301.
63. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, et al. (1998) A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. J Virol 72: 8463–8471.
64. Charrier S, Dupre L, Scaramuzza S, Jeanson-Leh L, Blundell MP, et al. (2007) Lentiviral vectors targeting WASp expression to hematopoietic cells, efficiently transduce and correct cells from WAS patients. Gene Ther 14: 415–428.
65. White TB, Lambowitz AM (2012) The retrohoming of linear group II intron RNAs in Drosophila melanogaster occurs by both DNA ligase 4-dependent and -independent mechanisms. PLoS Genet 8: e1002534.
66. Xiong Y, Eickbush TH (1990) Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. EMBO J 9: 3353–3362.
67. Matsuura M, Noah JW, Lambowitz AM (2001) Mechanism of maturase-promoted group II intron splicing. EMBO J 20: 7259–7270.
68. Vellore J, Moretz SE, Lampson BC (2004) A group II intron-type open reading frame from the thermophile Bacillus (Geobacillus) stearothermophilus encodes a heat-stable reverse transcriptase. Appl Environ Microbiol 70: 7140–7147.
69. Chalamcharla VR, Curcio MJ, Belfort M (2010) Nuclear expression of a group II intron is consistent with spliceosomal intron ancestry. Genes Dev 24: 827–836.
70. Olszewska M, Bujarski JJ, Kurpisz M (2012) P-bodies and their functions during mRNA cell cycle: mini-review. Cell Biochem Funct 30: 177–182.
71. Thomas MG, Loschi M, Desbats MA, Boccaccio GL (2011) RNA granules: the good, the bad and the ugly. Cell Signal 23: 324–334.
72. Buchan JR, Parker R (2009) Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. Mol Cell 36: 932–941.
73. Rambo RP, Doudna JA (2004) Assembly of an active group II intron-maturase complex by protein dimerization. Biochemistry 43: 6486–6497.
74. Huang HR, Chao MY, Armstrong B, Wang Y, Lambowitz AM, et al. (2003) The DIVa maturase binding site in the yeast group II intron aI2 is essential for intron homing but not for in vivo splicing. Mol Cell Biol 23: 8809–8819.
75. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, et al. (2003) A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. N Engl J Med 348: 255–256.
76. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, et al. (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. Science 302: 415–419.
77. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, et al. (2008) Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. J Clin Invest 118: 3132–3142.

78. Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, Picard C, Wang GP, et al. (2010) Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. N Engl J Med 363: 355–364.
79. Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, Stein S, Siler U, et al. (2006) Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. Nat Med 12: 401–409.
80. Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, Jauch A, Burwinkel B, et al. (2010) Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. Nat Med 16: 198–204.

Figure S1.

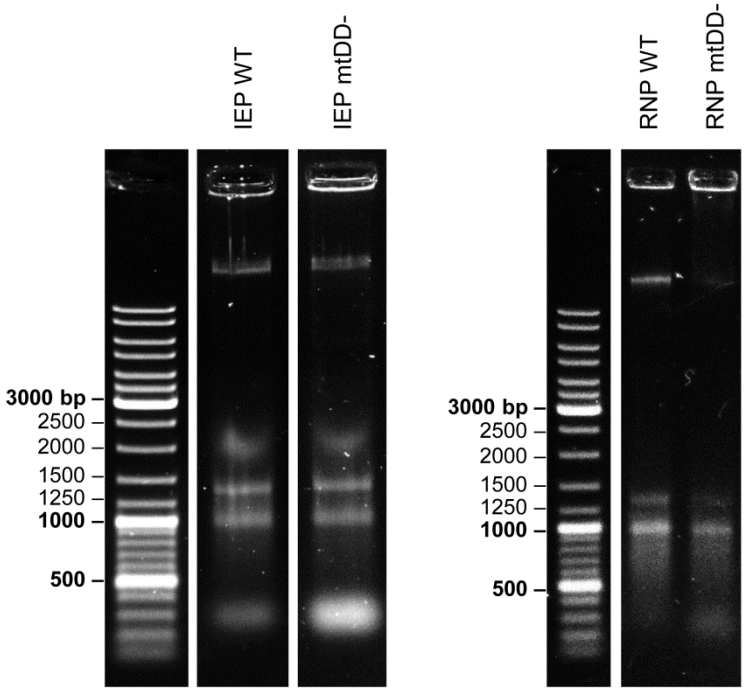
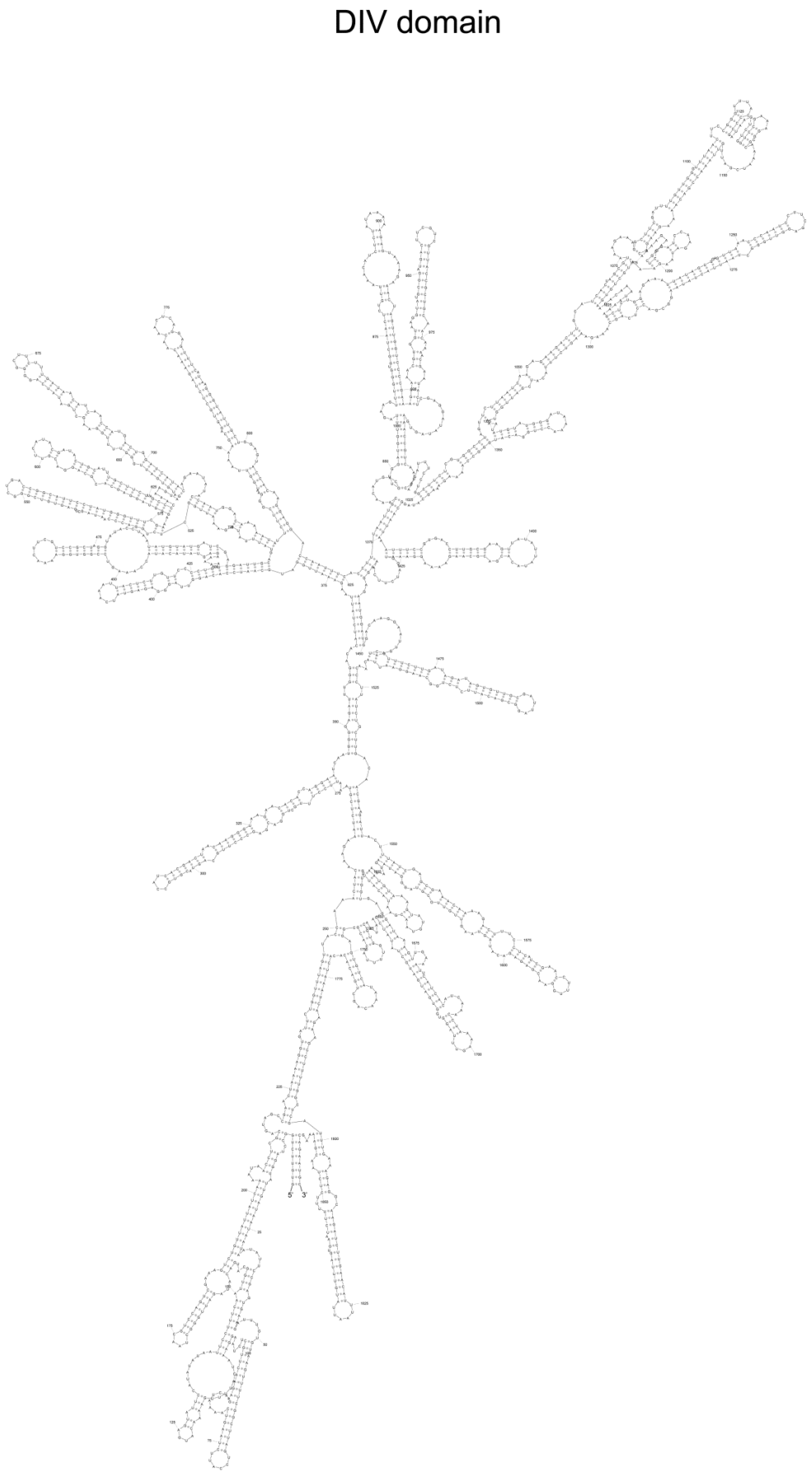

IEP WT
IEP mtDD-
RNP WT
RNP mtDD-
3000 bp
2500
2000
1500
1250
1000
500
3000 bp
2500
2000
1500
1250
1000
500

Figure S2.



Supplemental Table S1. Plasmids and oligonucleotides used in this work

A. Plasmids

Plasmid	Relevant characteristics	Reference
pET151/D-TOPO	*E. coli* T7 expression vector allowing a directional TOPO cloning in frame of a 6xHis/V5 tag.	Invitrogen
p151-IEP	Pl.LSU/2 IEP fused to a 6xHis/V5 tag in its N-terminus and expressed from a T7 promoter on the pET151 plasmid.	This work
p151-IEPmtDD-	p151-IEP derivative vector in which the conserved YADD motif of the IEP RT domain is changed in YAAA. The resulting IEP mtDD- protein should be RT-defective.	This work
p151-E+I+IEP	Pl.LSU/2 full length group II intron expressed from a T7 promoter on the pET151 plasmid and containing the IEP fused to a 6xHis/V5 tag in its N-terminus.	This work
p151-E+I+IEPmtDD-	p151-E+I+IEP derivative in which the conserved YADD motif of the IEP RT domain is changed in YAAA.	This work
pBFG1	2µ plasmid containing the LEU2 gene selection marker, 3 HA epitopes and a PGK promoter.	(Yelin et al. 1999)
pCI-neo	Mammalian expression vector containing a neomycin phosphotransferase gene.	Promega
pCIneo-E2E3mGFP	In frame Pl.LSU/2 flanking exons E2 (the last 50 nt) and E3 (the first 71 nt) containing a mutation that converts a STOP codon in E3 in tyrosine (E3m) and fused to the 5'-end of the GFP ORF on the pCI-neo plasmid.	This work
pCIneo-E2IntronDIVabE3mGFP	pCIneo derived plasmid containing a Pl.LSU/2 intron deleted form in which section from nucleotide 369 to nucleotide 1446 of DIV domain was removed (intron DIVab), flanked by the last 50 nt of E2 and the first 71 nt of E3 with a mutation that converts a STOP codon in tyrosine (E3m) and fused to the 5'-end of the GFP ORF.	This work
pEE-URA3	Pl.LSU/2 flanking exons (the last 50 nt of E2 and the first 71 nt of E3m) fused to 3 HA epitopes in its N-terminus and to a URA3 gene lacking the start codon in its C-terminus expressed from a PGK promoter on the pBFG1 plasmid.	This work
pEgpIIE-URA3	URA3-based PL.LSU/2 intron splicing reporter. The last 50 nt of E2, the Pl.LSU/2 intron DIVab form, see above) and the first 71 nt of E3 with a mutation that converts a STOP codon in tyrosine (E3m) are cloned just downstream of a URA3 gene lacking the start codon. The whole cassette is expressed from a PGK promoter on the pBFG1 plasmid.	This work
pNLS-IEP^{co}	Codon-optimized Pl.LSU/2 NLS-IEP fused to a c-myc epitope in its C-terminus and expressed from the GAL10 promoter of the pYEF1 plasmid on the pRS413 plasmid.	This work
pPl.LSU/2	Cloning plasmid containing the Pl.LSU/2 group II intron flanked by the last 50 nt of exon 2 and the first 71 nt of exon 3.	(Costa et al. 1997)
pPl.LSU/2-ΔDIV	pPl.LSU/2 derivative construct in which most of the intron DIV domain was removed : section from nucleotide 8 to nucleotide 1818 of the DIV domain was replaced by CCTAGGATCT.	(Costa et al. 1997)

pRRL-backbone	Advanced generation SIN Tat-independent HIV lentiviral vector system.	(Charrier et al. 2007)
pRRL-intron-ΔDIV	pRRL-backbone derived plasmid containing containing the Pl.LSU/2 group II intron with ΔDIV deletion (see above) flanked by the last 50 nt of exon 2 and the first 71 nt of exon 3.	This work
pRRL-intron-DIVa	pRRL-backbone derived plasmid containing the last 50 nt of exon 2, a Pl.LSU/2 intron deleted form in which section from nucleotide 244 to nucleotide 1772 of DIV domain was removed, and the first 71 nt of exon 3.	This work
pRRL-intron-DIVab	pRRL-backbone derived plasmid containing the last 50 nt of exon 2, the Pl.LSU/2 intron DIVab form (See above) and the first 71 nt of exon 3.	This work
pRRL-intron-Full	pRRL-backbone derived plasmid containing Pl.LSU/2 group II intron flanked by the last 50 nt of exon 2 and the first 71 nt of exon 3.	This work
pRRL-GFP	pRRL-backbone derived plasmid containing GFP ORF	This work
pRRL-GFP-IEP^{co}	pRRL-backbone derived plasmid containing codon-optimized Pl.LSU/2 IEP ORF fused to the GFP ORF in its N-terminus and to3 NLS and a c-myc epitope in its C-terminus.	This work
pRRL-IEP^{co}	pRRL-backbone derived plasmid containing codon-optimized Pl.LSU/2 IEP fused to 3 NLS and a c-myc epitope in its C-terminus.	This work
pRS413	ARS-CEN plasmid with the HIS3 gene selection marker.	(Sikorski and Hieter 1989; Christianson et al. 1992)
pRS426	2μ plasmid containing the URA3 gene selection marker.	(Christianson et al. 1992)
pUC57	*E. coli* cloning plasmid.	Genescript
pUC57-NLS-IEP^{co}	Codon-optimized Pl.LSU/2 IEP with 3 NLS and a c-myc epitope in its C-terminus.	This work
pYEF1	2μ plasmid containing the GAL10 promoter and terminator.	(Cullin and Minvielle-Sebastia 1994)

B. Oligonucleotides

Oligonucleotide	**Sequence (5' to 3')**	**Use**
BamHI-K-IEP	GGGATCCACCATGAGTATTCCTTACATAATTCCG	Amplification of IEP^{co} ORF
DM2	GTAGCTTTCGAAGCTTTACCTGCCGGCACC	Amplification of E2E3m and E2-IntronDIVab-E3m
DM3	GGTAAAGCTTCGAAAGCTACATATAAGGAA	Amplification of URA3 ORF
DM4	GAATTCAGTTTTTTAGTTTTGCTGG	Amplification of URA3 ORF
EcoRI-Stop-Myc	AGAATTCCTAGGCAGCGCCGTTCAG	Amplification of IEP^{co} ORF
p1	CTTTTATCTTTGACACAAAATCGGGGG	Amplification of the precursor cDNA (qPCR)

p2	TCCTGAACTTCTTGTCGCACTTTTTA	Amplification of the precursor cDNA (qPCR)
p3	AGGATCCCAGCTTTTATCTTTGACACA	Amplification of E2E3m, E2-IntronDIVab-E3m, and the spliced cDNA (qPCR)
p4	CGAGTTAGCAGAGACCTGTGTTTTTA	Amplification of the spliced cDNA (qPCR)
p5	CTTTTATCTTTGACACAAAATCG	Amplification of the precursor cDNA (PCR)
p6	GCAGGTGTCAGTCCCTATACA	Amplification of the precursor cDNA (PCR)
p7	ATTCACGCGTGGTACCTCTAGAA	Amplification of the spliced cDNA (qPCR)
PlLSU2-AS2	TTAAATGTTCAAGATCTTGC	Amplification of IEP ORF
PlLSU2-S2	CACCATGAGTATTCCATATATA	Amplification of IEP ORF
PlLSU2-SacI-AS	CGAGCTCTCGATAAGCTTTACCTGCCG	Amplification of Intron (domains IVb, V and VI)-E3
PlLSU2-XbaI-AS	GCTCTAGAGTTTTCAAAATGATTTCCTTAGAGCAAG	Amplification of E2-Intron (domains I, II, III and IVa)
PlLSU2-XbaI-S	GCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCA	Amplification of E2-Intron (domains I, II, III and IVa)
PlLSU2-XhoI-S	AAACGAATACTCGAGGATATAGTGAAACCG	Amplification of Intron (domains IVb, V and VI)-E3
RM-R	GTGTGCATTCGTAATGTCTGCCCATTCT	Reverse transcription of total yeast RNA
Sal-GAL-F	GTCGACCTAAACTCACAAATTAGAGCTTC	Amplification of the GAL10 promoter and terminator
Xba-GAL-R	TCTAGATGTGAGTTAGCTCACTCATTAG	Amplification of the GAL10 promoter and terminator
YAAA_F	TGGTAAGGTATGCGGCTGCCTTCGTCGTTACCGC	Site-directed mutagenesis of the YADD motif in the RT domain of IEP
YAAA_R	GCGGTAACGACGAAGGCAGCCGCATACCTTACCA	Site-directed mutagenesis of the YADD motif in the RT domain of IEP

Supplemental references

Charrier S, Dupre L, Scaramuzza S, Jeanson-Leh L, Blundell MP, et al. 2007. Lentiviral vectors targeting WASp expression to hematopoietic cells, efficiently transduce and correct cells from WAS patients. *Gene Ther* **14**: 415-428.

Christianson TW, Sikorski RS, Dante M, Shero JH, Hieter P. 1992. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* **110**: 119-122.

Costa M, Fontaine JM, Loiseaux-de Goer S, Michel F. 1997. A group II self-splicing intron from the brown alga Pylaiella littoralis is active at unusually low magnesium concentrations and forms populations of molecules with a uniform conformation. *J Mol Biol* **274**: 353-364.

Cullin C, Minvielle-Sebastia L. 1994. Multipurpose vectors designed for the fast generation of N- or C-terminal epitope-tagged proteins. *Yeast* **10**: 105-112.

Sikorski RS, Hieter P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* **122**: 19-27.

Yelin R, Rotem D, Schuldiner S. 1999. EmrE, a small Escherichia coli multidrug transporter, protects Saccharomyces cerevisiae from toxins by sequestration in the vacuole. *Journal of bacteriology* **181**: 949-956.

BIBLIOGRAPHIE

(2006). Index of Viruses - Retroviridae, The Universal Virus Database. Columbia University, New York.

Aiuti, A., R. Bacchetta, R. Seger, A. Villaand M. Cavazzana-Calvo (2012). "Gene therapy for primary immunodeficiencies: Part 2." Curr Opin Immunol **24**(5): 585-91.

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 *et al.* (2013). "Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome." Science **341**(6148): 1233151.

Aiuti, A., B. Cassani, G. Andolfi, M. Mirolo, L. Biasco, A. Recchia, F. Urbinati, C. Valacca, S. Scaramuzza, M. Aker, S. Slavin, M. Cazzola, D. Sartori, A. Ambrosi, C. Di Serio, M. G. Roncarolo, F. Mavilioand C. Bordignon (2007). Multilineage hematopoietic reconstitution without clonal selection in ADA-SCID patients treated with stem cell gene therapy. J Clin Invest. **117:** 2233-40.

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. Bordignonand M. G. Roncarolo (2009). "Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency." N Engl J Med **360**(5): 447-58.

Aiuti, A., S. Slavin, M. Aker, F. Ficara, S. Deola, A. Mortellaro, S. Morecki, G. Andolfi, A. Tabucchi, F. Carlucci, E. Marinello, F. Cattaneo, S. Vai, P. Servida, R. Miniero, M. G. Roncaroloand C. Bordignon (2002). "Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning." Science **296**(5577): 2410-3.

Akkina, R. K., R. M. Walton, M. L. Chen, Q. X. Li, V. Planellesand I. S. Chen (1996). "High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G." J Virol **70**(4): 2581-5.

al Yacoub, N., M. Romanowska, N. Haritonovaand J. Foerster (2007). "Optimized production and concentration of lentiviral vectors containing large inserts." J Gene Med **9**(7): 579-84.

Almarza, D., G. Bussadori, M. Navarro, F. Mavilio, F. Larcherand R. Murillas (2011). "Risk assessment in skin gene therapy: viral-cellular fusion transcripts generated by proviral transcriptional read-through in keratinocytes transduced with self-inactivating lentiviral vectors." Gene Ther **18**(7): 674-81.

Aloia, R. C., H. Tianand F. C. Jensen (1993). "Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(11): 5181-5.

Alwin, S., M. B. Gere, E. Guhl, K. Effertz, C. F. Barbas, 3rd, D. J. Segal, M. D. Weitzmanand T. Cathomen (2005). "Custom zinc-finger nucleases for use in human cells." Mol Ther **12**(4): 610-7.

Anderson, W. F. (1992). "Human gene therapy." Science **256**(5058): 808-13.

Andreadis, S. T., C. M. Roth, J. M. Le Doux, J. R. Morganand M. L. Yarmush (1999). "Large-scale processing of recombinant retroviruses for gene therapy." Biotechnol Prog **15**(1): 1-11.

Anliker, B., T. Abel, S. Kneissl, J. Hlavaty, A. Caputi, J. Brynza, I. C. Schneider, R. C. Munch, H. Petznek, R. E. Kontermann, U. Koehl, I. C. Johnston, K. Keinanen, U. C. Muller, C. Hohenadl, H. Monyer, K. Cichutekand C. J. Buchholz (2010). "Specific gene transfer to neurons, endothelial cells and hematopoietic progenitors with lentiviral vectors." Nat. Methods **7**(11): 929-35.

Ansorge, S., S. Lanthier, J. Transfiguracion, Y. Durocher, O. Henryand A. Kamen (2009). "Development of a scalable process for high-yield lentiviral vector production by transient transfection of HEK293 suspension cultures." J Gene Med **11**(10): 868-76.

Arcasoy, S. M., J. D. Latoche, M. Gondor, B. R. Pittand J. M. Pilewski (1997). "Polycations increase the efficiency of adenovirus-mediated gene transfer to epithelial and endothelial cells in vitro." Gene Ther **4**(1): 32-8.

Arnold, F., J. Schnell, O. Zirafi, C. Sturzel, C. Meier, T. Weil, L. Standker, W. G. Forssmann, N. R. Roan, W. C. Greene, F. Kirchhoffand J. Munch (2012). "Naturally occurring fragments from two distinct regions of the prostatic acid phosphatase form amyloidogenic enhancers of HIV infection." J Virol **86**(2): 1244-9.

Arnould, S., C. Perez, J. P. Cabaniols, J. Smith, A. Gouble, S. Grizot, J. C. Epinat, A. Duclert, P. Duchateauand F. Paques (2007). "Engineered I-CreI derivatives cleaving sequences from the human XPC gene can induce highly efficient gene correction in mammalian cells." J Mol Biol **371**(1): 49-65.

Aubin, R. J., M. Weinfeldand M. C. Paterson (1988). "Factors influencing efficiency and reproducibility of polybrene-assisted gene transfer." Somat Cell Mol Genet **14**(2): 155-67.

Azzouz, M. (2006). "Gene Therapy for ALS: progress and prospects." Biochim Biophys Acta **1762**(11-12): 1122-7.

Bacchetti, S.and F. L. Graham (1977). "Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(4): 1590-4.

Baekelandt, V., K. Eggermont, M. Michiels, B. Nuttinand Z. Debyser (2003). "Optimized lentiviral vector production and purification procedure prevents immune response after transduction of mouse brain." Gene Ther **10**(23): 1933-40.

Bartosch, B., J. Dubuissonand F. L. Cosset (2003). "Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes." J Exp Med **197**(5): 633-42.

Bauer, T. R., Jr., J. M. Allen, M. Hai, L. M. Tuschong, I. F. Khan, E. M. Olson, R. L. Adler, T. H. Burkholder, Y. C. Gu, D. W. Russelland D. D. Hickstein (2008). "Successful treatment of canine leukocyte adhesion deficiency by foamy virus vectors." Nat Med **14**(1): 93-7.

Bechinger, B., V. Vidovic, P. Bertaniand A. Kichler (2010). "A new family of peptide-nucleic acid nanostructures with potent transfection activities." J. Pept. Sci. **17**(2): 88-93.

Belfort, M. (2003). "Two for the price of one: a bifunctional intron-encoded DNA endonuclease-RNA maturase." Genes Dev **17**(23): 2860-3.

Bergeron, J. R., H. Huthoff, D. A. Veselkov, R. L. Beavil, P. J. Simpson, S. J. Matthews, M. H. Malimand M. R. Sanderson (2010). "The SOCS-box of HIV-1 Vif interacts with ElonginBC by induced-folding to recruit its Cul5-containing ubiquitin ligase complex." PLoS Pathog **6**(6): e1000925.

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." J Virol **66**(1): 139-49.

Berkowitz, R., H. Ilves, W. Y. Lin, K. Eckert, A. Coward, S. Tamaki, G. Veresand I. Plavec (2001). "Construction and molecular analysis of gene transfer systems derived from bovine immunodeficiency virus." J Virol **75**(7): 3371-82.

Beyer, W. R., M. Westphal, W. Ostertagand D. von Laer (2002). "Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range." J Virol **76**(3): 1488-95.

Bianchi, M., A. Hakkim, V. Brinkmann, U. Siler, R. A. Seger, A. Zychlinskyand J. Reichenbach (2009). "Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis." Blood **114**(13): 2619-22.

Biffi, A., P. Aubourgand N. Cartier (2011). "Gene therapy for leukodystrophies." Hum Mol Genet **20**(R1): R42-53.

Biffi, A., M. De Palma, A. Quattrini, U. Del Carro, S. Amadio, I. Visigalli, M. Sessa, S. Fasano, R. Brambilla, S. Marchesini, C. Bordignonand L. Naldini (2004). "Correction of metachromatic leukodystrophy in the mouse model by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells." J Clin Invest **113**(8): 1118-29.

Bischoff, J. R., D. H. Kirn, A. Williams, C. Heise, S. Horn, M. Muna, L. Ng, J. A. Nye, A. Sampson-Johannes, A. Fattaeyand F. McCormick (1996). "An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells." Science **274**(5286): 373-6.

Bodine, D. M., K. T. McDonagh, S. J. Brandt, P. A. Ney, B. Agricola, E. Byrneand A. W. Nienhuis (1990). "Development of a high-titer retrovirus producer cell line capable of gene transfer into rhesus monkey hematopoietic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(10): 3738-42.

Boviatsis, E. J., J. S. Park, M. Sena-Esteves, C. M. Kramm, M. Chase, J. T. Efird, M. X. Wei, X. O. Breakefieldand E. A. Chiocca (1994). "Long-term survival of rats harboring brain neoplasms treated with ganciclovir and a herpes simplex virus vector that retains an intact thymidine kinase gene." Cancer Res **54**(22): 5745-51.

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 Kalleand C. Klein (2010). "Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome." N Engl J Med **363**(20): 1918-27.

Bragonzi, A., G. Dina, A. Villa, G. Calori, A. Biffi, C. Bordignon, B. M. Assaeland M. Conese (2000). "Biodistribution and transgene expression with nonviral cationic vector/DNA complexes in the lungs." Gene Ther **7**(20): 1753-60.

Brandt, S., M. Blissenbach, B. Grewe, R. Konietzny, T. Grunwaldand K. Uberla (2007). "Rev proteins of human and simian immunodeficiency virus enhance RNA encapsidation." PLoS Pathog **3**(4): e54.

Brenner, S.and H. L. Malech (2003). "Current developments in the design of onco-retrovirus and lentivirus vector systems for hematopoietic cell gene therapy." Biochim Biophys Acta **1640**(1): 1-24.

Brentjens, R. J., M. L. Davila, I. Riviere, J. Park, X. Wang, L. G. Cowell, S. Bartido, J. Stefanski, C. Taylor, M. Olszewska, O. Borquez-Ojeda, J. Qu, T. Wasielewska, Q. He, Y. Bernal, I. V. Rijo, C. Hedvat, R. Kobos, K. Curran, P. Steinherz, J. Jurcic, T. Rosenblat, P. Maslak, M. Frattiniand M. Sadelain (2013). "CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia." Sci Transl Med **5**(177): 177ra38.

Bressanelli, S., K. Stiasny, S. L. Allison, E. A. Stura, S. Duquerroy, J. Lescar, F. X. Heinzand F. A. Rey (2004). "Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation." Embo J **23**(4): 728-38.

Broussau, S., N. Jabbour, G. Lachapelle, Y. Durocher, R. Tom, J. Transfiguracion, R. Gilbertand B. Massie (2008). "Inducible packaging cells for large-scale production of lentiviral vectors in serum-free suspension culture." Mol. Ther. **16**(3): 500-7.

Brown, P. O., B. Bowerman, H. E. Varmusand J. M. Bishop (1989). "Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(8): 2525-9.

Bukrinsky, M. I., N. Sharova, T. L. McDonald, T. Pushkarskaya, W. G. Tarpleyand M. Stevenson (1993). "Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(13): 6125-9.

Cao, J., I. W. Park, A. Cooperand J. Sodroski (1996). "Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1." J Virol **70**(3): 1340-54.

Caplen, N. J., E. W. Alton, P. G. Middleton, J. R. Dorin, B. J. Stevenson, X. Gao, S. R. Durham, P. K. Jeffery, M. E. Hodson, C. Coutelleand et al. (1995). "Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis." Nat Med **1**(1): 39-46.

Carbonell, L. F., M. J. Klowdenand L. K. Miller (1985). "Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells." J Virol **56**(1): 153-60.

Carneiro, F. A., M. L. Bianconi, G. Weissmuller, F. Staufferand A. T. Da Poian (2002). "Membrane recognition by vesicular stomatitis virus involves enthalpy-driven protein-lipid interactions." J Virol **76**(8): 3756-64.

Carter, R. F., A. C. Abrams-Ogg, J. E. Dick, S. A. Kruth, V. E. Valli, S. Kamel-Reidand I. D. Dube (1992). "Autologous transplantation of canine long-term marrow culture cells genetically marked by retroviral vectors." Blood **79**(2): 356-64.

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-Calvoand P. Aubourg (2009). "Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy." Science **326**(5954): 818-23.

Case, S. S., M. A. Price, C. T. Jordan, X. J. Yu, L. Wang, G. Bauer, D. L. Haas, D. Xu, R. Stripecke, L. Naldini, D. B. Kohnand G. M. Crooks (1999). "Stable transduction of quiescent CD34(+)CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 2988-93.

Cattoglio, C., G. Facchini, D. Sartori, A. Antonelli, A. Miccio, B. Cassani, M. Schmidt, C. von Kalle, S. Howe, A. J. Thrasher, A. Aiuti, G. Ferrari, A. Recchiaand F. Mavilio (2007). "Hot spots of retroviral integration in human CD34+ hematopoietic cells." Blood **110**(6): 1770-8.

Cattoglio, C., D. Pellin, E. Rizzi, G. Maruggi, G. Corti, F. Miselli, D. Sartori, A. Guffanti, C. Di Serio, A. Ambrosi, G. De Bellisand F. Mavilio (2010). "High-definition mapping of retroviral integration sites identifies active regulatory elements in human multipotent hematopoietic progenitors." Blood **116**(25): 5507-17.

Cavazzana-Calvo, M.and A. Fischer (2007). "Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet?" J Clin Invest **117**(6): 1456-65.

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. Deistand A. Fischer (2000). "Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease." Science **288**(5466): 669-72.

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-Abinaand P. Leboulch (2010). "Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia." Nature **467**(7313): 318-22.

Cavrois, M., C. De Noronhaand W. C. Greene (2002). "A sensitive and specific enzyme-based assay detecting HIV-1 virion fusion in primary T lymphocytes." Nat Biotechnol **20**(11): 1151-4.

Charneau, P.and F. Clavel (1991). "A single-stranded gap in human immunodeficiency virus unintegrated linear DNA defined by a central copy of the polypurine tract." J Virol **65**(5): 2415-21.

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. Roncaroloand A. Galy (2007). "Lentiviral vectors targeting WASp expression to hematopoietic cells, efficiently transduce and correct cells from WAS patients." Gene Ther **14**(5): 415-28.

Chen, J., J. J. Skeheland D. C. Wiley (1999). "N- and C-terminal residues combine in the fusion-pH influenza hemagglutinin HA(2) subunit to form an N cap that terminates the triple-stranded coiled coil." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 8967-72.

Chen, Y. D.and R. Blumenthal (1989). "On the use of self-quenching fluorophores in the study of membrane fusion kinetics. The effect of slow probe redistribution." Biophys Chem **34**(3): 283-92.

Chernomordik, L., M. M. Kozlovand J. Zimmerberg (1995). "Lipids in biological membrane fusion." J Membr Biol **146**(1): 1-14.

Chernomordik, L. V., V. A. Frolov, E. Leikina, P. Bronkand J. Zimmerberg (1998). "The pathway of membrane fusion catalyzed by influenza hemagglutinin: restriction of lipids, hemifusion, and lipidic fusion pore formation." J Cell Biol **140**(6): 1369-82.

Chernomordik, L. V.and M. M. Kozlov (2005). "Membrane hemifusion: crossing a chasm in two leaps." Cell **123**(3): 375-82.
Chinen, J., J. Davis, S. S. De Ravin, B. N. Hay, A. P. Hsu, G. F. Linton, N. Naumann, E. Y. Nomicos, C. Silvin, J. Ulrick, N. L. Whiting-Theobald, H. L. Malechand J. M. Puck (2007). "Gene therapy improves immune function in preadolescents with X-linked severe combined immunodeficiency." Blood **110**(1): 67-73.
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." J. Virol. **75**(9): 4129-38.
Cladera, J., I. Martinand P. O'Shea (2001). "The fusion domain of HIV gp41 interacts specifically with heparan sulfate on the T-lymphocyte cell surface." Embo J **20**(1-2): 19-26.
Clague, M. J., C. Schochand R. Blumenthal (1991). "Delay time for influenza virus hemagglutinin-induced membrane fusion depends on hemagglutinin surface density." J Virol **65**(5): 2402-7.
Clapham, P. R.and R. A. Weiss (1997). "Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors." Nature **388**(6639): 230-1.
Cockrell, A. S., H. Ma, K. Fu, T. J. McCownand T. Kafri (2006). "A trans-lentiviral packaging cell line for high-titer conditional self-inactivating HIV-1 vectors." Mol Ther **14**(2): 276-84.
Coffin JM, H. S., Varmus HE (eds). (1997). Development and application of retroviral vectors. New York, Retroviruses. Cold Spring Harbor.
Cohen, F. S.and G. B. Melikyan (2004). "The energetics of membrane fusion from binding, through hemifusion, pore formation, and pore enlargement." J Membr Biol **199**(1): 1-14.
Coil, D. A.and A. D. Miller (2004). "Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus." J Virol **78**(20): 10920-6.
Coll, J. M. (1997). "Synthetic peptides from the heptad repeats of the glycoproteins of rabies, vesicular stomatitis and fish rhabdoviruses bind phosphatidylserine." Arch Virol **142**(10): 2089-97.
Conticello, S. G., R. S. Harrisand M. S. Neuberger (2003). "The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G." Curr Biol **13**(22): 2009-13.
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." J. Virol. Methods **23**(2): 187-94.
Correll, P. H., S. Colilla, H. P. Daveand S. Karlsson (1992). "High levels of human glucocerebrosidase activity in macrophages of long-term reconstituted mice after retroviral infection of hematopoietic stem cells." Blood **80**(2): 331-6.
Cui, X., M. Matsuura, Q. Wang, H. Maand A. M. Lambowitz (2004). "A group II intron-encoded maturase functions preferentially in cis and requires both the reverse transcriptase and X domains to promote RNA splicing." J Mol Biol **340**(2): 211-31.
Davis, H. E., J. R. Morganand M. L. Yarmush (2002). "Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes." Biophys Chem **97**(2-3): 159-72.
Davis, H. E., M. Rosinski, J. R. Morganand M. L. Yarmush (2004). "Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation." Biophys. J. **86**(2): 1234-42.
Delahodde, A., V. Goguel, A. M. Becam, F. Creusot, J. Perea, J. Banroquesand C. Jacq (1989). "Site-specific DNA endonuclease and RNA maturase activities of two homologous intron-encoded proteins from yeast mitochondria." Cell **56**(3): 431-41.
Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littmanand N. R. Landau (1996). "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1." Nature **381**(6584): 661-6.

DePolo, N. J., J. D. Reed, P. L. Sheridan, K. Townsend, S. L. Sauter, D. J. Jollyand T. W. Dubensky, Jr. (2000). "VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum." Mol Ther **2**(3): 218-22.

Dezzutti, C. S., Heneine, W., Boneva, R.S, Folks, T.M. (2007). Retroviruses and associated human diseases. Hodder Arnold, London., Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections: Virology.

Diaz, R. M., A. Bateman, L. Emiliusen, A. Fielding, D. Trono, S. J. Russelland R. G. Vile (2000). "A lentiviral vector expressing a fusogenic glycoprotein for cancer gene therapy." Gene Ther **7**(19): 1656-63.

Dick, J. E., M. C. Magli, D. Huszar, R. A. Phillipsand A. Bernstein (1985). "Introduction of a selectable gene into primitive stem cells capable of long-term reconstitution of the hemopoietic system of W/Wv mice." Cell **42**(1): 71-9.

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. Hardingand A. H. Baker (2003). "Third-generation lentivirus vectors efficiently transduce and phenotypically modify vascular cells: implications for gene therapy." J Mol Cell Cardiol **35**(7): 739-48.

Dismuke, D. J.and C. Aiken (2006). "Evidence for a functional link between uncoating of the human immunodeficiency virus type 1 core and nuclear import of the viral preintegration complex." Journal of Virology **vol.80 no.8 3712-3720**.

Doranz, B. J., J. Rucker, Y. Yi, R. J. Smyth, M. Samson, S. C. Peiper, M. Parmentier, R. G. Collmanand R. W. Doms (1996). "A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors." Cell **85**(7): 1149-58.

Drabick, J. J., J. Glasspool-Malone, A. Kingand R. W. Malone (2001). "Cutaneous transfection and immune responses to intradermal nucleic acid vaccination are significantly enhanced by in vivo electropermeabilization." Mol Ther **3**(2): 249-55.

DuBridge, R. B., P. Tang, H. C. Hsia, P. M. Leong, J. H. Millerand M. P. Calos (1987). "Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system." Mol Cell Biol **7**(1): 379-87.

Dueck, M.and J. Guatelli (2007). "Evidence against a direct antiviral activity of the proteasome during the early steps of HIV-1 replication." Virology **361**(1): 1-8.

Dull, T., R. Zufferey, M. Kelly, R. J. Mandel, M. Nguyen, D. Tronoand L. Naldini (1998). "A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system." J Virol **72**(11): 8463-71.

Dupre, L., F. Marangoni, S. Scaramuzza, S. Trifari, R. J. Hernandez, A. Aiuti, L. Naldiniand M. G. Roncarolo (2006). "Efficacy of gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome using a WAS promoter/cDNA-containing lentiviral vector and nonlethal irradiation." Hum Gene Ther **17**(3): 303-13.

Dupuy, F. P., E. Mouly, M. Mesel-Lemoine, C. Morel, J. Abriol, M. Cherai, C. Baillou, D. Negre, F. L. Cosset, D. Klatzmannand F. M. Lemoine (2005). "Lentiviral transduction of human hematopoietic cells by HIV-1- and SIV-based vectors containing a bicistronic cassette driven by various internal promoters." J. Gene Med. **7**(9): 1158-71.

Durand, S.and A. Cimarelli (2011). "The inside out of lentiviral vectors." Viruses **3**(2): 132-59.

Durcan, N., C. Murphyand S. A. Cryan (2008). "Inhalable siRNA: potential as a therapeutic agent in the lungs." Mol Pharm **5**(4): 559-66.

Duzgunes, N., S. Majumdarand M. B. Goren (1993). "Fluorescence methods for monitoring phagosome-lysosome fusion in human macrophages." Methods Enzymol **221**: 234-8.

Duzgunes, N.and J. Wilschut (1993). "Fusion assays monitoring intermixing of aqueous contents." Methods Enzymol **220**: 3-14.

Dvorin, J. D., P. Bell, G. G. Maul, M. Yamashita, M. Emermanand M. H. Malim (2002). "Reassessment of the roles of integrase and the central DNA flap in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import." J Virol **76**(23): 12087-96.

Einerhand, M. P., T. A. Bakx, A. Kuklerand D. Valerio (1993). "Factors affecting the transduction of pluripotent hematopoietic stem cells: long-term expression of a human adenosine deaminase gene in mice." Blood **81**(1): 254-63.
Engelman, A.and P. Cherepanov (2008). "The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication." PLoS Pathog **4**(3): e1000046.
Engelman, A.and P. Cherepanov (2012). "The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights." Nat Rev Microbiol **10**(4): 279-90.
Enkirch, T., S. Kneissl, B. Hoyler, G. Ungerechts, W. Stremmel, C. J. Buchholzand C. Springfeld (2013). "Targeted lentiviral vectors pseudotyped with the Tupaia paramyxovirus glycoproteins." Gene Ther. **20**(1): 16-23.
Erlwein, O.and M. O. McClure (2010). "Progress and prospects: foamy virus vectors enter a new age." Gene Ther **17**(12): 1423-9.
Esko, J. D.and U. Lindahl (2001). "Molecular diversity of heparan sulfate." J Clin Invest **108**(2): 169-73.
Fassati, A.and S. P. Goff (1999). "Characterization of intracellular reverse transcription complexes of Moloney murine leukemia virus." J Virol **73**(11): 8919-25.
Fassati, A.and S. P. Goff (2001). "Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1." J Virol **75**(8): 3626-35.
Felice, B., C. Cattoglio, D. Cittaro, A. Testa, A. Miccio, G. Ferrari, L. Luzi, A. Recchiaand F. Mavilio (2009). "Transcription factor binding sites are genetic determinants of retroviral integration in the human genome." PLoS One **4**(2): e4571.
Fenard, D., S. Genries, D. Scherman, A. Galy, S. Martinand 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**(2): 375-8.
Fenard, D., L. Houzet, E. Bernard, A. Tupin, S. Brun, M. Mougel, C. Devaux, N. Chazaland L. Briant (2009). "Uracil DNA Glycosylase 2 negatively regulates HIV-1 LTR transcription." Nucleic Acids Res. **37**(18): 6008-18.
Fenard, D., D. Ingrao, A. Seye, J. Buisset, S. Genries, S. Martin, A. Kichlerand A. Galy (2013b). "Vectofusin-1, a new viral entry enhancer, strongly promotes lentiviral transduction of human hematopoietic stem cells." Mol Ther Nucleic Acids **2**: e90.
Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedyand E. A. Berger (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." Science **272**(5263): 872-7.
Ferlenghi, I., M. Clarke, T. Ruttan, S. L. Allison, J. Schalich, F. X. Heinz, S. C. Harrison, F. A. Reyand S. D. Fuller (2001). "Molecular organization of a recombinant subviral particle from tick-borne encephalitis virus." Mol Cell **7**(3): 593-602.
Ferrer-Miralles, N., E. Vazquezand A. Villaverde (2008). "Membrane-active peptides for non-viral gene therapy: making the safest easier." Trends Biotechnol. **26**(5): 267-75.
Fields, B. N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (2007). Fields' Virology. Philadelphia, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams and Wilkins.
Finston, W. I.and J. J. Champoux (1984). "RNA-primed initiation of Moloney murine leukemia virus plus strands by reverse transcriptase in vitro." J Virol **51**(1): 26-33.
Fischer, D., T. Bieber, Y. Li, H. P. Elsasserand T. Kissel (1999). "A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity." Pharm Res **16**(8): 1273-9.
Follenzi, A., L. E. Ailles, S. Bakovic, M. Geunaand L. Naldini (2000). "Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences." Nat Genet **25**(2): 217-22.
Frecha, C., C. Costa, C. Levy, D. Negre, S. J. Russell, A. Maisner, G. Salles, K. W. Peng, F. L. Cossetand 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**(15): 3173-80.

Frecha, C., C. Costa, D. Negre, E. Gauthier, S. J. Russell, F. L. Cossetand E. Verhoeyen (2008). "Stable transduction of quiescent T cells without induction of cycle progression by a novel lentiviral vector pseudotyped with measles virus glycoproteins." Blood **112**(13): 4843-52.

Frecha, C., C. Levy, F. L. Cossetand E. Verhoeyen (2012). "Advances in the field of lentivector-based transduction of T and B lymphocytes for gene therapy." Mol Ther **18**(10): 1748-57.

Fukunaka, Y., K. Iwanaga, K. Morimoto, M. Kakemiand Y. Tabata (2002). "Controlled release of plasmid DNA from cationized gelatin hydrogels based on hydrogel degradation." J Control Release **80**(1-3): 333-43.

Funke, S., A. Maisner, M. D. Muhlebach, U. Koehl, M. Grez, R. Cattaneo, K. Cichutekand C. J. Buchholz (2008). "Targeted cell entry of lentiviral vectors." Mol. Ther. **16**(8): 1427-36.

Funke, S., I. C. Schneider, S. Glaser, M. D. Muhlebach, T. Moritz, R. Cattaneo, K. Cichutekand C. J. Buchholz (2009). "Pseudotyping lentiviral vectors with the wild-type measles virus glycoproteins improves titer and selectivity." Gene Ther. **16**(5): 700-5.

Galy, A., M. G. Roncaroloand A. J. Thrasher (2008). "Development of lentiviral gene therapy for Wiskott Aldrich syndrome." Expert Opin Biol Ther **8**(2): 181-90.

Galy, A.and A. J. Thrasher (2011). "Gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome." Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. **11**(6): 545-50.

Gama-Norton, L., L. Botezatu, S. Herrmann, M. Schweizer, P. M. Alves, H. Hauserand D. Wirth (2011). "Lentivirus production is influenced by SV40 large T-antigen and chromosomal integration of the vector in HEK293 cells." Hum Gene Ther **22**(10): 1269-79.

Gansbacher, B. (2002). "Policy statement on the social, ethical and public awareness issues in gene therapy." J Gene Med **4**(6): 687-91.

Garcia-Rodriguez, F. M., A. Barrientos-Duran, V. Diaz-Prado, M. Fernandez-Lopezand N. Toro (2011). "Use of RmInt1, a group IIB intron lacking the intron-encoded protein endonuclease domain, in gene targeting." Appl Environ Microbiol **77**(3): 854-61.

Gaspar, H. B., S. Cooray, K. C. Gilmour, K. L. Parsley, S. Adams, S. J. Howe, A. Al Ghonaium, J. Bayford, L. Brown, E. G. Davies, C. Kinnonand A. J. Thrasher (2011a). "Long-term persistence of a polyclonal T cell repertoire after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency." Sci Transl Med **3**(97): 97ra79.

Gaspar, H. B., S. Cooray, K. C. Gilmour, K. L. Parsley, F. Zhang, S. Adams, E. Bjorkegren, J. Bayford, L. Brown, E. G. Davies, P. Veys, L. Fairbanks, V. Bordon, T. Petropoulou, C. Kinnonand A. J. Thrasher (2011b). "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**(97): 97ra80.

Gaspar, H. B., K. L. Parsley, S. Howe, D. King, K. C. Gilmour, J. Sinclair, G. Brouns, M. Schmidt, C. Von Kalle, T. Barington, M. A. Jakobsen, H. O. Christensen, A. Al Ghonaium, H. N. White, J. L. Smith, R. J. Levinsky, R. R. Ali, C. Kinnonand A. J. Thrasher (2004). "Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector." Lancet **364**(9452): 2181-7.

Gaudin, Y. (2000). "Reversibility in fusion protein conformational changes. The intriguing case of rhabdovirus-induced membrane fusion." Subcell Biochem **34**: 379-408.

Gebhart, C. L., S. Sriadibhatla, S. Vinogradov, P. Lemieux, V. Alakhovand A. V. Kabanov (2002). "Design and formulation of polyplexes based on pluronic-polyethyleneimine conjugates for gene transfer." Bioconjug Chem **13**(5): 937-44.

Gelinas, R. E., M. A. Benderand A. D. Miller (1989a). "Regulated expression of the human beta-globin gene after retroviral transfer into murine and human hematopoietic cells." Prog Clin Biol Res **316B**: 235-49.

Gelinas, R. E., M. A. Bender, A. D. Millerand U. Novak (1989b). "Long-term expression of the human beta-globin gene after retroviral transfer into pluripotent hematopoietic stem cells of the mouse." Adv Exp Med Biol **271**: 135-48.

Gennari, F., L. Lopes, E. Verhoeyen, W. Marascoand M. K. Collins (2009). "Single-chain antibodies that target lentiviral vectors to MHC class II on antigen-presenting cells." Hum Gene Ther **20**(6): 554-62.

Ghani, K., S. Cottin, A. Kamenand M. Caruso (2007). "Generation of a high-titer packaging cell line for the production of retroviral vectors in suspension and serum-free media." Gene Ther **14**(24): 1705-11.

Gibbons, D. L., M. C. Vaney, A. Roussel, A. Vigouroux, B. Reilly, J. Lepault, M. Kielianand F. A. Rey (2004). "Conformational change and protein-protein interactions of the fusion protein of Semliki Forest virus." Nature **427**(6972): 320-5.

Gill, D. R., K. W. Southern, K. A. Mofford, T. Seddon, L. Huang, F. Sorgi, A. Thomson, L. J. MacVinish, R. Ratcliff, D. Bilton, D. J. Lane, J. M. Littlewood, A. K. Webb, P. G. Middleton, W. H. Colledge, A. W. Cuthbert, M. J. Evans, C. F. Higginsand S. C. Hyde (1997). "A placebo-controlled study of liposome-mediated gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis." Gene Ther **4**(3): 199-209.

Ginn, S. L., S. H. Liao, A. P. Dane, M. Hu, J. Hyman, J. W. Finnie, M. Zheng, M. Cavazzana-Calvo, S. I. Alexander, A. J. Thrasherand I. E. Alexander (2010). "Lymphomagenesis in SCID-X1 mice following lentivirus-mediated phenotype correction independent of insertional mutagenesis and gammac overexpression." Mol Ther **18**(5): 965-76.

Goff, S. P. (2004). "Retrovirus restriction factors." Mol Cell **16**(6): 849-59.

Goujon, C., L. Riviere, L. Jarrosson-Wuilleme, J. Bernaud, D. Rigal, J. L. Darlixand A. Cimarelli (2007). "SIVSM/HIV-2 Vpx proteins promote retroviral escape from a proteasome-dependent restriction pathway present in human dendritic cells." Retrovirology **4**: 2.

Goya, R. G., J. Rowe, Y. E. Sosa, P. Tomasec, P. R. Lowensteinand M. G. Castro (1998). "Use of recombinant herpes simplex virus type 1 vectors for gene transfer into tumour and normal anterior pituitary cells." Mol Cell Endocrinol **139**(1-2): 199-207.

Greene, M. R., T. Lockey, P. K. Mehta, Y. S. Kim, P. W. Eldridge, J. T. Grayand B. P. Sorrentino (2012). "Transduction of human CD34+ repopulating cells with a self-inactivating lentiviral vector for SCID-X1 produced at clinical scale by a stable cell line." Hum Gene Ther Methods **23**(5): 297-308.

Grieger, J. C.and R. J. Samulski (2011). "Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications." Methods Enzymol **507**: 229-54.

Grizot, S., J. Smith, F. Daboussi, J. Prieto, P. Redondo, N. Merino, M. Villate, S. Thomas, L. Lemaire, G. Montoya, F. J. Blanco, F. Paquesand P. Duchateau (2009). "Efficient targeting of a SCID gene by an engineered single-chain homing endonuclease." Nucleic Acids Res **37**(16): 5405-19.

Groschel, B.and F. Bushman (2005). "Cell cycle arrest in G2/M promotes early steps of infection by human immunodeficiency virus." J Virol **79**(9): 5695-704.

Guo, H., M. Karberg, M. Long, J. P. Jones, 3rd, B. Sullengerand A. M. Lambowitz (2000). "Group II introns designed to insert into therapeutically relevant DNA target sites in human cells." Science **289**(5478): 452-7.

Guo, H., S. Zimmerly, P. S. Perlmanand A. M. Lambowitz (1997). "Group II intron endonucleases use both RNA and protein subunits for recognition of specific sequences in double-stranded DNA." Embo J **16**(22): 6835-48.

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

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. Fischerand M. Cavazzana-Calvo (2008). "Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1." J Clin Invest **118**(9): 3132-42.

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. Fischerand M. Cavazzana-Calvo (2010). "Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency." N Engl J Med **363**(4): 355-64.

Hall, M. P., K. K. Bursonand W. H. Huestis (1998). "Interactions of a vesicular stomatitis virus G protein fragment with phosphatidylserine: NMR and fluorescence studies." Biochim Biophys Acta **1415**(1): 101-13.

Hanawa, H., P. F. Kelly, A. C. Nathwani, D. A. Persons, J. A. Vandergriff, P. Hargrove, E. F. Vaninand A. W. Nienhuis (2002). "Comparison of various envelope proteins for their ability to pseudotype lentiviral vectors and transduce primitive hematopoietic cells from human blood." Mol Ther **5**(3): 242-51.

Hanawa, H., M. Yamamoto, H. Zhao, T. Shimadaand D. A. Persons (2009). "Optimized lentiviral vector design improves titer and transgene expression of vectors containing the chicken beta-globin locus HS4 insulator element." Mol Ther **17**(4): 667-74.

Hanenberg, H., K. Hashino, H. Konishi, R. A. Hock, I. Katoand D. A. Williams (1997). "Optimization of fibronectin-assisted retroviral gene transfer into human CD34+ hematopoietic cells." Hum Gene Ther **8**(18): 2193-206.

Hanenberg, H., X. L. Xiao, D. Dilloo, K. Hashino, I. Katoand D. A. Williams (1996). "Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells." Nat. Med. **2**(8): 876-82.

Hanna, E., X. Zhang, J. Woodlis, R. Breau, J. Suenand S. Li (2001). "Intramuscular electroporation delivery of IL-12 gene for treatment of squamous cell carcinoma located at distant site." Cancer Gene Ther **8**(3): 151-7.

Hannig, J., D. Zhang, D. J. Canaday, M. A. Beckett, R. D. Astumian, R. R. Weichselbaumand R. C. Lee (2000). "Surfactant sealing of membranes permeabilized by ionizing radiation." Radiat Res **154**(2): 171-7.

Harris, R. S.and M. T. Liddament (2004). "Retroviral restriction by APOBEC proteins." Nat Rev Immunol **4**(11): 868-77.

Haugen, P., D. M. Simonand D. Bhattacharya (2005). "The natural history of group I introns." Trends Genet **21**(2): 111-9.

Heldwein, E. E., H. Lou, F. C. Bender, G. H. Cohen, R. J. Eisenbergand S. C. Harrison (2006). "Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1." Science **313**(5784): 217-20.

Heller, L., M. J. Jaroszeski, D. Coppola, C. Pottinger, R. Gilbertand R. Heller (2000). "Electrically mediated plasmid DNA delivery to hepatocellular carcinomas in vivo." Gene Ther **7**(10): 826-9.

Hematti, P., B. K. Hong, C. Ferguson, R. Adler, H. Hanawa, S. Sellers, I. E. Holt, C. E. Eckfeldt, Y. Sharma, M. Schmidt, C. von Kalle, D. A. Persons, E. M. Billings, C. M. Verfaillie, A. W. Nienhuis, T. G. Wolfsberg, C. E. Dunbarand B. Calmels (2004). "Distinct genomic integration of MLV and SIV vectors in primate hematopoietic stem and progenitor cells." PLoS Biol **2**(12): e423.

Higashimoto, T., F. Urbinati, A. Perumbeti, G. Jiang, A. Zarzuela, L. J. Chang, D. B. Kohnand P. Malik (2007). "The woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element reduces readthrough transcription from retroviral vectors." Gene Ther **14**(17): 1298-304.

Ho, Y., S. J. Kimand R. B. Waring (1997). "A protein encoded by a group I intron in Aspergillus nidulans directly assists RNA splicing and is a DNA endonuclease." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(17): 8994-9.

Hockemeyer, D., H. Wang, S. Kiani, C. S. Lai, Q. Gao, J. P. Cassady, G. J. Cost, L. Zhang, Y. Santiago, J. C. Miller, B. Zeitler, J. M. Cherone, X. Meng, S. J. Hinkley, E. J. Rebar, P. D. Gregory, F. D. Urnovand R. Jaenisch (2011). "Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases." Nat Biotechnol **29**(8): 731-4.

Hodgson, C. P.and F. Solaiman (1996). "Virosomes: cationic liposomes enhance retroviral transduction." Nat. Biotechnol. **14**(3): 339-42.

Hoekstra, D.and N. Duzgunes (1993). "Lipid mixing assays to determine fusion in liposome systems." Methods Enzymol **220**: 15-32.

Hofig, I., M. J. Atkinson, S. Mall, A. M. Krackhardt, C. Thirionand N. Anastasov (2012). "Poloxamer synperonic F108 improves cellular transduction with lentiviral vectors." J Gene Med **14**(8): 549-60.

Hofmann, C., V. Sandig, G. Jennings, M. Rudolph, P. Schlagand M. Strauss (1995). "Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(22): 10099-103.

Hofmann, H., K. Hattermann, A. Marzi, T. Gramberg, M. Geier, M. Krumbiegel, S. Kuate, K. Uberla, M. Niedrigand S. Pohlmann (2004). "S protein of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus mediates entry into hepatoma cell lines and is targeted by neutralizing antibodies in infected patients." J Virol **78**(12): 6134-42.

Horiuchi, Y., M. Onodera, Y. Miyagawa, B. Sato, K. Onda, Y. U. Katagiri, H. Okita, M. Okada, M. Otsu, A. Kume, T. Okuyama, J. Fujimoto, T. Kuratsujiand N. Kiyokawa (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**(7): 777-83.

Hosseinkhani, H., T. Aoyama, O. Ogawaand Y. Tabata (2002). "Ultrasound enhancement of in vitro transfection of plasmid DNA by a cationized gelatin." J Drug Target **10**(3): 193-204.

Hosseinkhani, H.and Y. Tabata (2003). "In vitro gene expression by cationized derivatives of an artificial protein with repeated RGD sequences, Pronectin." J Control Release **86**(1): 169-82.

Howe, S. J., M. R. Mansour, K. Schwarzwaelder, C. Bartholomae, M. Hubank, H. Kempski, M. H. Brugman, K. Pike-Overzet, S. J. Chatters, D. de Ridder, K. C. Gilmour, S. Adams, S. I. Thornhill, K. L. Parsley, F. J. Staal, R. E. Gale, D. C. Linch, J. Bayford, L. Brown, M. Quaye, C. Kinnon, P. Ancliff, D. K. Webb, M. Schmidt, C. von Kalle, H. B. Gasparand A. J. Thrasher (2008). "Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients." J Clin Invest **118**(9): 3143-50.

Hrecka, K., C. Hao, M. Gierszewska, S. K. Swanson, M. Kesik-Brodacka, S. Srivastava, L. Florens, M. P. Washburnand J. Skowronski (2011). "Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein." Nature **474**(7353): 658-61.

Hsu, M., J. Zhang, M. Flint, C. Logvinoff, C. Cheng-Mayer, C. M. Riceand J. A. McKeating (2003). "Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(12): 7271-6.

Huard, J., W. F. Goinsand J. C. Glorioso (1995). "Herpes simplex virus type 1 vector mediated gene transfer to muscle." Gene Ther **2**(6): 385-92.

Ingrao, D., S. Majdoul, A. K. Seye, A. Galyand D. Fenard (2013). "Concurrent measures of fusion and transduction efficiency of primary CD34+ cells with HIV-1 based lentiviral vectors reveal different effects of transduction enhancers." Hum Gene Ther Methods.

Jiang, M., J. Mak, A. Ladha, E. Cohen, M. Klein, B. Rovinskiand L. Kleiman (1993). "Identification of tRNAs incorporated into wild-type and mutant human immunodeficiency virus type 1." J Virol **67**(6): 3246-53.

Johnston, J. C., M. Gasmi, L. E. Lim, J. H. Elder, J. K. Yee, D. J. Jolly, K. P. Campbell, B. L. Davidsonand S. L. Sauter (1999). "Minimum requirements for efficient transduction of dividing and nondividing cells by feline immunodeficiency virus vectors." J Virol **73**(6): 4991-5000.

Jung, C., B. N. Grzybowski, S. Tong, L. Cheng, R. W. Compansand J. M. Le Doux (2004). "Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from human parainfluenza virus type 3." Biotechnol Prog **20**(6): 1810-6.

Kabanov, A., J. Zhuand V. Alakhov (2005). "Pluronic block copolymers for gene delivery." Adv Genet **53**: 231-61.

Kahl, C. A., J. Marsh, J. Fyffe, D. A. Sandersand K. Cornetta (2004). "Human immunodeficiency virus type 1-derived lentivirus vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from Ross River virus and Semliki Forest virus." J Virol **78**(3): 1421-30.

Kamimura, K., T. Suda, G. Zhangand D. Liu (2011). "Advances in Gene Delivery Systems." Pharmaceut Med **25**(5): 293-306.

Kang, E. M., U. Choi, N. Theobald, G. Linton, D. A. Long Priel, D. Kuhnsand H. L. Malech (2010). "Retrovirus gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease can achieve stable long-term correction of oxidase activity in peripheral blood neutrophils." Blood **115**(4): 783-91.

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, S. Kimand H. S. Ahn (2011). "Retroviral gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease: results from phase I/II trial." Mol Ther **19**(11): 2092-101.

Kang, Y., L. Xie, D. T. Tran, C. S. Stein, M. Hickey, B. L. Davidsonand P. B. McCray, Jr. (2005). "Persistent expression of factor VIII in vivo following nonprimate lentiviral gene transfer." Blood **106**(5): 1552-8.

Kao, S., M. A. Khan, E. Miyagi, R. Plishka, A. Buckler-Whiteand K. Strebel (2003). "The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein reduces intracellular expression and inhibits packaging of APOBEC3G (CEM15), a cellular inhibitor of virus infectivity." J Virol **77**(21): 11398-407.

Karberg, M., H. Guo, J. Zhong, R. Coon, J. Perutkaand A. M. Lambowitz (2001). "Group II introns as controllable gene targeting vectors for genetic manipulation of bacteria." Nat Biotechnol **19**(12): 1162-7.

Kato, S., K. Kobayashi, K. Inoue, M. Kuramochi, T. Okada, H. Yaginuma, K. Morimoto, T. Shimada, M. Takadaand K. Kobayashi (2011). "A lentiviral strategy for highly efficient retrograde gene transfer by pseudotyping with fusion envelope glycoprotein." Hum Gene Ther **22**(2): 197-206.

Kavanaugh, M. P.and D. Kabat (1996). "Identification and characterization of a widely expressed phosphate transporter/retrovirus receptor family." Kidney Int **49**(4): 959-63.

Kennell, J. C., J. V. Moran, P. S. Perlman, R. A. Butowand A. M. Lambowitz (1993). "Reverse transcriptase activity associated with maturase-encoding group II introns in yeast mitochondria." Cell **73**(1): 133-46.

Kichler, A. (2004). "Gene transfer with modified polyethylenimines." J Gene Med **6 Suppl 1**: S3-10.

Kichler, A., C. Leborgne, J. Marz, O. Danosand B. Bechinger (2003). "Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **100**(4): 1564-8.

Kichler, A., A. J. Mason, A. Marquetteand B. Bechinger (2013). "Histidine-rich cationic amphipathic peptides for plasmid DNA and siRNA delivery." Methods Mol. Biol. **948**: 85-103.

Kielian, M. (2006). "Class II virus membrane fusion proteins." Virology **344**(1): 38-47.

Kim, K. A., M. Yolamanova, O. Zirafi, N. R. Roan, L. Staendker, W. G. Forssmann, A. Burgener, N. Dejucq-Rainsford, B. H. Hahn, G. M. Shaw, W. C. Greene, F. Kirchhoffand J. Munch (2010). "Semen-mediated enhancement of HIV infection is donor-dependent and correlates with the levels of SEVI." Retrovirology **7**: 55.

Kimizuka, F., Y. Taguchi, Y. Ohdate, Y. Kawase, T. Shimojo, K. Hashino, I. Kato, K. Sekiguchiand K. Titani (1991). "Production and characterization of functional domains of human fibronectin expressed in Escherichia coli." J Biochem **110**(2): 284-91.

Kirn, D. H.and F. McCormick (1996). "Replicating viruses as selective cancer therapeutics." Mol Med Today **2**(12): 519-27.

Kneissl, S., T. Abel, A. Rasbach, J. Brynza, J. Schneider-Schauliesand C. J. Buchholz (2012). "Measles virus glycoprotein-based lentiviral targeting vectors that avoid neutralizing antibodies." PLoS One **7**(10): e46667.

Kobinger, G. P., D. J. Weiner, Q. C. Yuand J. M. Wilson (2001). "Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia in vivo." Nat Biotechnol **19**(3): 225-30.

Kollen, W. J., A. E. Mulberg, X. Wei, M. Sugita, V. Raghuram, J. Wang, J. K. Foskett, M. C. Glickand T. F. Scanlin (1999). "High-efficiency transfer of cystic fibrosis transmembrane conductance

regulator cDNA into cystic fibrosis airway cells in culture using lactosylated polylysine as a vector." Hum Gene Ther **10**(4): 615-22.
Kolokoltsov, A. A., S. C. Weaverand R. A. Davey (2005). "Efficient functional pseudotyping of oncoretroviral and lentiviral vectors by Venezuelan equine encephalitis virus envelope proteins." J Virol **79**(2): 756-63.
Kowolik, C. M.and J. K. Yee (2002). "Preferential transduction of human hepatocytes with lentiviral vectors pseudotyped by Sendai virus F protein." Mol Ther **5**(6): 762-9.
Kumar, M., B. P. Bradowand J. Zimmerberg (2003). "Large-scale production of pseudotyped lentiviral vectors using baculovirus GP64." Hum Gene Ther. **14**(1): 67-77.
Kuroda, H., M. P. Marino, R. H. Kutnerand J. Reiser (2011). "Production of lentiviral vectors in protein-free media." Curr Protoc Cell Biol **Chapter 26**: Unit 26 8.
Kutner, R. H., S. Puthli, M. P. Marinoand J. Reiser (2009a). "Simplified production and concentration of HIV-1-based lentiviral vectors using HYPERFlask vessels and anion exchange membrane chromatography." BMC Biotechnol **9**: 10.
Kutner, R. H., X. Y. Zhangand J. Reiser (2009b). "Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors." Nat. Protoc. **4**(4): 495-505.
Laguette, N., B. Sobhian, N. Casartelli, M. Ringeard, C. Chable-Bessia, E. Segeral, A. Yatim, S. Emiliani, O. Schwartzand M. Benkirane (2011). "SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx." Nature **474**(7353): 654-7.
Lam, J. K., W. Liang, Y. Lan, P. Chaudhuri, M. Y. Chow, K. Witt, L. Kudsiovaand A. J. Mason (2012). "Effective endogenous gene silencing mediated by pH responsive peptides proceeds via multiple pathways." J. Control Release **158**(2): 293-303.
Lambowitz, A. M.and S. Zimmerly (2004). "Mobile group II introns." Annu Rev Genet **38**: 1-35.
Lamers, C. H., P. van Elzakker, S. C. van Steenbergen, S. Sleijfer, R. Debetsand J. W. Gratama (2008). "Retronectin-assisted retroviral transduction of primary human T lymphocytes under good manufacturing practice conditions: tissue culture bag critically determines cell yield." Cytotherapy **10**(4): 406-16.
Landau, N. R., K. A. Pageand D. R. Littman (1991). "Pseudotyping with human T-cell leukemia virus type I broadens the human immunodeficiency virus host range." J Virol **65**(1): 162-9.
Langlet-Bertin, B., C. Leborgne, D. Scherman, B. Bechinger, A. J. Masonand A. Kichler (2010). "Design and evaluation of histidine-rich amphipathic peptides for siRNA delivery." Pharm. Res. **27**(7): 1426-36.
Lanuti, M., C. E. Kouri, S. Force, M. Chang, K. Amin, K. Xu, I. Blair, L. Kaiserand S. Albelda (1999). "Use of protamine to augment adenovirus-mediated cancer gene therapy." Gene Ther **6**(9): 1600-10.
Larochelle, A.and C. E. Dunbar (2004). "Genetic manipulation of hematopoietic stem cells." Semin Hematol **41**(4): 257-71.
Lau, A., R. Kanaar, S. P. Jacksonand M. J. O'Connor (2004). "Suppression of retroviral infection by the RAD52 DNA repair protein." EMBO J. **23**(16): 3421-9.
Leckband, D.and J. Israelachvili (2001). "Intermolecular forces in biology." Q Rev Biophys **34**(2): 105-267.
Lee, C. L., M. Chou, B. Dai, L. Xiaoand P. Wang (2012). "Construction of stable producer cells to make high-titer lentiviral vectors for dendritic cell-based vaccination." Biotechnol Bioeng **109**(6): 1551-60.
Lee, R. C., L. P. River, F. S. Pan, L. Jiand R. L. Wollmann (1992). "Surfactant-induced sealing of electropermeabilized skeletal muscle membranes in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(10): 4524-8.
Lee, S. S., L. C. Eisenlohr, P. A. McCue, M. J. Mastrangeloand E. C. Lattime (1994). "Intravesical gene therapy: in vivo gene transfer using recombinant vaccinia virus vectors." Cancer Res **54**(13): 3325-8.
Lesch, H. P., A. Laitinen, C. Peixoto, T. Vicente, K. E. Makkonen, L. Laitinen, J. T. Pikkarainen, H. Samaranayake, P. M. Alves, M. J. Carrondo, S. Yla-Herttualaand K. J. Airenne (2011).

"Production and purification of lentiviral vectors generated in 293T suspension cells with baculoviral vectors." Gene Ther **18**(6): 531-8.

Leuci, V., G. Mesiano, L. Gammaitoni, C. Cammarata, S. Capellero, M. Todorovic, N. Jordaney, P. Circosta, A. Elia, M. Lesnikova, G. E. Georges, W. Piacibello, F. Fagioli, A. Cignetti, M. Agliettaand D. Sangiolo (2011). "Transient proteasome inhibition as a strategy to enhance lentiviral transduction of hematopoietic CD34(+) cells and T lymphocytes: implications for the use of low viral doses and large-size vectors." J Biotechnol **156**(3): 218-26.

Levasseur, D. N., T. M. Ryan, K. M. Pawlikand T. M. Townes (2003). "Correction of a mouse model of sickle cell disease: lentiviral/antisickling beta-globin gene transduction of unmobilized, purified hematopoietic stem cells." Blood **102**(13): 4312-9.

Lewis, B. C., N. Chinnasamy, R. A. Morganand H. E. Varmus (2001). "Development of an avian leukosis-sarcoma virus subgroup A pseudotyped lentiviral vector." J Virol **75**(19): 9339-44.

Lewis, P. F.and M. Emerman (1994). "Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus." J Virol **68**(1): 510-6.

Li, S., X. Zhang, X. Xia, L. Zhou, R. Breau, J. Suenand E. Hanna (2001). "Intramuscular electroporation delivery of IFN-alpha gene therapy for inhibition of tumor growth located at a distant site." Gene Ther **8**(5): 400-7.

Lin, M. T., Pulkkinen, L., Uitto, J., Yoon, K. (2000). "The gene gun: current application in cutaneous gene therapy." Int J Dermatol.

Lineberger, J. E., R. Danzeisen, D. J. Hazuda, A. J. Simonand M. D. Miller (2002). "Altering expression levels of human immunodeficiency virus type 1 gp120-gp41 affects efficiency but not kinetics of cell-cell fusion." J Virol **76**(7): 3522-33.

Liu, F.and L. Huang (2002a). "Electric gene transfer to the liver following systemic administration of plasmid DNA." Gene Ther **9**(16): 1116-9.

Liu, F.and L. Huang (2002b). "A syringe electrode device for simultaneous injection of DNA and electrotransfer." Mol Ther **5**(3): 323-8.

Liu, S. L., C. L. Halbertand A. D. Miller (2004). "Jaagsiekte sheep retrovirus envelope efficiently pseudotypes human immunodeficiency virus type 1-based lentiviral vectors." J Virol **78**(5): 2642-7.

Liu, Y., A. Rabinovitch, W. Suarez-Pinzon, B. Muhkerjee, M. Brownlee, D. Edelsteinand H. J. Federoff (1996). "Expression of the bcl-2 gene from a defective HSV-1 amplicon vector protects pancreatic beta-cells from apoptosis." Hum Gene Ther **7**(14): 1719-26.

Lloyd, A. G., S. Tateishi, P. D. Bieniasz, M. A. Muesing, M. Yamaizumiand L. C. Mulder (2006). "Effect of DNA repair protein Rad18 on viral infection." PLoS Pathog. **2**(5): e40.

Logan, A. C., S. J. Nightingale, D. L. Haas, G. J. Cho, K. A. Pepperand D. B. Kohn (2004). "Factors influencing the titer and infectivity of lentiviral vectors." Hum Gene Ther **15**(10): 976-88.

Lowenstein, P. R., C. E. Thomasand M. G. Castro (1999). "Politically correct gene therapy? A "clean environment" improves gene delivery to the brain!" Gene Ther **6**(4): 463-4.

Lowy, R. J., D. P. Sarkar, Y. Chenand R. Blumenthal (1990). "Observation of single influenza virus-cell fusion and measurement by fluorescence video microscopy." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(5): 1850-4.

Lu, G. W., H. W. Jun, M. T. Dzimianski, H. C. Qiuand J. W. McCall (1995). "Pharmacokinetic studies of methotrexate in plasma and synovial fluid following i.v. bolus and topical routes of administration in dogs." Pharm Res **12**(10): 1474-7.

Lu, X., L. Humeau, V. Slepushkin, G. Binder, Q. Yu, T. Slepushkina, Z. Chen, R. Merling, B. Davis, Y. N. Changand B. Dropulic (2004). "Safe two-plasmid production for the first clinical lentivirus vector that achieves >99% transduction in primary cells using a one-step protocol." J Gene Med **6**(9): 963-73.

Lungwitz, U., M. Breunig, T. Blunkand A. Gopferich (2005). "Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems." Eur J Pharm Biopharm **60**(2): 247-66.

Luskey, B. D., M. Rosenblatt, K. Zseboand D. A. Williams (1992). "Stem cell factor, interleukin-3, and interleukin-6 promote retroviral-mediated gene transfer into murine hematopoietic stem cells." Blood **80**(2): 396-402.

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. Cohenand J. I. Gallin (1997). "Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(22): 12133-8.

Malim, M. H.and M. Emerman (2008). "HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment." Cell Host Microbe **3**(6): 388-98.

Manilla, P., T. Rebello, C. Afable, X. Lu, V. Slepushkin, L. M. Humeau, K. Schonely, Y. Ni, G. K. Binder, B. L. Levine, R. R. MacGregor, C. H. Juneand B. Dropulic (2005). "Regulatory considerations for novel gene therapy products: a review of the process leading to the first clinical lentiviral vector." Hum. Gene Ther. **16**(1): 17-25.

Mantovani, J., S. Charrier, R. Eckenberg, W. Saurin, O. Danos, J. Pereaand A. Galy (2009). "Diverse genomic integration of a lentiviral vector developed for the treatment of Wiskott-Aldrich syndrome." J Gene Med **11**(8): 645-54.

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. Galyand A. Villa (2009). "Evidence for long-term efficacy and safety of gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome in preclinical models." Mol Ther **17**(6): 1073-82.

Marin, M., K. M. Rose, S. L. Kozakand D. Kabat (2003). "HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation." Nat Med **9**(11): 1398-403.

Marquette, A., A. J. Masonand B. Bechinger (2008). "Aggregation and membrane permeabilizing properties of designed histidine-containing cationic linear peptide antibiotics." J. Pept. Sci. **14**(4): 488-95.

Maruggi, G., S. Porcellini, G. Facchini, S. K. Perna, C. Cattoglio, D. Sartori, A. Ambrosi, A. Schambach, C. Baum, C. Bonini, C. Bovolenta, F. Mavilioand A. Recchia (2009). "Transcriptional enhancers induce insertional gene deregulation independently from the vector type and design." Mol Ther **17**(5): 851-6.

Maruyama, H., K. Ataka, N. Higuchi, F. Sakamoto, F. Gejyoand J. Miyazaki (2001). "Skin-targeted gene transfer using in vivo electroporation." Gene Ther **8**(23): 1808-12.

Marzi, A., T. Gramberg, G. Simmons, P. Moller, A. J. Rennekamp, M. Krumbiegel, M. Geier, J. Eisemann, N. Turza, B. Saunier, A. Steinkasserer, S. Becker, P. Bates, H. Hofmannand S. Pohlmann (2004). "DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus." J Virol **78**(21): 12090-5.

Mason, A. J., C. Gasnier, A. Kichler, G. Prevost, D. Aunis, M. H. Metz-Boutigueand B. Bechinger (2006a). "Enhanced membrane disruption and antibiotic action against pathogenic bacteria by designed histidine-rich peptides at acidic pH." Antimicrob. Agents Chemother. **50**(10): 3305-11.

Mason, A. J., A. Martinez, C. Glaubitz, O. Danos, A. Kichlerand B. Bechinger (2006b). "The antibiotic and DNA-transfecting peptide LAH4 selectively associates with, and disorders, anionic lipids in mixed membranes." Faseb J. **20**(2): 320-2.

Mason, A. J., W. Moussaoui, T. Abdelrahman, A. Boukhari, P. Bertani, A. Marquette, P. Shooshtarizaheh, G. Moulay, N. Boehm, B. Guerold, R. J. Sawers, A. Kichler, M. H. Metz-Boutigue, E. Candolfi, G. Prevostand B. Bechinger (2009). "Structural determinants of antimicrobial and antiplasmodial activity and selectivity in histidine-rich amphipathic cationic peptides." J. Biol. Chem. **284**(1): 119-33.

Mastaglio, S., M. T. Stanghellini, C. Bordignon, A. Bondanza, F. Ciceriand C. Bonini (2010). "Progress and prospects: graft-versus-host disease." Gene Ther **17**(11): 1309-17.

Matrai, J., M. K. Chuahand T. VandenDriessche (2010). "Recent advances in lentiviral vector development and applications." Mol Ther **18**(3): 477-90.
Matreyek, K. A.and A. Engelman (2011). "The requirement for nucleoporin NUP153 during human immunodeficiency virus type 1 infection is determined by the viral capsid." J Virol **85**(15): 7818-27.
Matsuura, M., R. Saldanha, H. Ma, H. Wank, J. Yang, G. Mohr, S. Cavanagh, G. M. Dunny, M. Belfortand A. M. Lambowitz (1997). "A bacterial group II intron encoding reverse transcriptase, maturase, and DNA endonuclease activities: biochemical demonstration of maturase activity and insertion of new genetic information within the intron." Genes Dev **11**(21): 2910-24.
May, C., S. Rivella, J. Callegari, G. Heller, K. M. Gaensler, L. Luzzattoand M. Sadelain (2000). "Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin." Nature **406**(6791): 82-6.
Mazarakis, N. D., M. Azzouz, J. B. Rohll, F. M. Ellard, F. J. Wilkes, A. L. Olsen, E. E. Carter, R. D. Barber, D. F. Baban, S. M. Kingsman, A. J. Kingsman, K. O'Malleyand K. A. Mitrophanous (2001). "Rabies virus glycoprotein pseudotyping of lentiviral vectors enables retrograde axonal transport and access to the nervous system after peripheral delivery." Hum Mol Genet **10**(19): 2109-21.
Medina, M. F., G. P. Kobinger, J. Rux, M. Gasmi, D. J. Looney, P. Batesand J. M. Wilson (2003). "Lentiviral vectors pseudotyped with minimal filovirus envelopes increased gene transfer in murine lung." Mol Ther **8**(5): 777-89.
Mehle, A., J. Goncalves, M. Santa-Marta, M. McPikeand D. Gabuzda (2004a). "Phosphorylation of a novel SOCS-box regulates assembly of the HIV-1 Vif-Cul5 complex that promotes APOBEC3G degradation." Genes Dev **18**(23): 2861-6.
Mehle, A., B. Strack, P. Ancuta, C. Zhang, M. McPikeand D. Gabuzda (2004b). "Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway." J Biol Chem **279**(9): 7792-8.
Mergia, A.and M. Heinkelein (2003). "Foamy virus vectors." Curr Top Microbiol Immunol **277**: 131-59.
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-Hellinand A. Galy (2011). "Large-scale manufacture and characterization of a lentiviral vector produced for clinical ex vivo gene therapy application." Hum. Gene Ther. **22**(3): 343-56.
Miller, A. D. (1992a). "Human gene therapy comes of age." Nature **357**(6378): 455-60.
Miller, A. D. (1992b). "Retroviral vectors." Curr Top Microbiol Immunol **158**: 1-24.
Miller, A. D. (1997). "Development and Applications of Retroviral Vectors."
Miller, M. D., C. M. Farnetand F. D. Bushman (1997). "Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition." J Virol **71**(7): 5382-90.
Millington, M., A. Arndt, M. Boyd, T. Applegateand S. Shen (2009). "Towards a clinically relevant lentiviral transduction protocol for primary human CD34 hematopoietic stem/progenitor cells." PLoS One **4**(7): e6461.
Mima, H., R. Tomoshige, T. Kanamori, Y. Tabata, S. Yamamoto, S. Ito, K. Tamaiand Y. Kaneda (2005). "Biocompatible polymer enhances the in vitro and in vivo transfection efficiency of HVJ envelope vector." J Gene Med **7**(7): 888-97.
Mitchell, R. S., B. F. Beitzel, A. R. Schroder, P. Shinn, H. Chen, C. C. Berry, J. R. Eckerand F. D. Bushman (2004). "Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences." PLoS Biol **2**(8): E234.
Mitra, S. W., S. Goff, E. Gilboaand D. Baltimore (1979). "Synthesis of a 600-nucleotide-long plus-strand DNA by virions of Moloney murine leukemia virus." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4355-9.
Miyanohara, A., P. A. Johnson, R. L. Elam, Y. Dai, J. L. Witztum, I. M. Vermaand T. Friedmann (1992). "Direct gene transfer to the liver with herpes simplex virus type 1 vectors: transient production of physiologically relevant levels of circulating factor IX." New Biol **4**(3): 238-46.

Miyoshi, H. (2004). "Gene delivery to hematopoietic stem cells using lentiviral vectors." Methods Mol Biol **246**: 429-38.
Miyoshi, H., U. Blomer, M. Takahashi, F. H. Gageand I. M. Verma (1998). "Development of a self-inactivating lentivirus vector." J Virol **72**(10): 8150-7.
Mochizuki, H., J. P. Schwartz, K. Tanaka, R. O. Bradyand J. Reiser (1998). "High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells." J Virol **72**(11): 8873-83.
Modlich, U., S. Navarro, D. Zychlinski, T. Maetzig, S. Knoess, M. H. Brugman, A. Schambach, S. Charrier, A. Galy, A. J. Thrasher, J. Buerenand C. Baum (2009). "Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors." Mol Ther **17**(11): 1919-28.
Moebes, A., J. Enssle, P. D. Bieniasz, M. Heinkelein, D. Lindemann, M. Bock, M. O. McClureand A. Rethwilm (1997). "Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle." J Virol **71**(10): 7305-11.
Mohr, G., P. S. Perlmanand A. M. Lambowitz (1993). "Evolutionary relationships among group II intron-encoded proteins and identification of a conserved domain that may be related to maturase function." Nucleic Acids Res **21**(22): 4991-7.
Mohr, G., D. Smith, M. Belfortand A. M. Lambowitz (2000). "Rules for DNA target-site recognition by a lactococcal group II intron enable retargeting of the intron to specific DNA sequences." Genes Dev **14**(5): 559-73.
Moiani, A.and F. Mavilio (2012). "Alternative splicing caused by lentiviral integration in the human genome." Methods Enzymol **507**: 155-69.
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 Kalleand 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." J Clin Invest **119**(4): 964-75.
Montini, E., D. Cesana, M. Schmidt, F. Sanvito, M. Ponzoni, C. Bartholomae, L. Sergi Sergi, F. Benedicenti, A. Ambrosi, C. Di Serio, C. Doglioni, C. von Kalleand L. Naldini (2006). "Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration." Nat Biotechnol **24**(6): 687-96.
Moore, J. P. (1997). "Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy." Science **276**(5309): 51-2.
Moore, K. A., F. A. Fletcher, D. K. Villalon, A. E. Utterand J. W. Belmont (1990). "Human adenosine deaminase expression in mice." Blood **75**(10): 2085-92.
Moritz, T., P. Dutt, X. Xiao, D. Carstanjen, T. Vik, H. Hanenbergand D. A. Williams (1996). "Fibronectin improves transduction of reconstituting hematopoietic stem cells by retroviral vectors: evidence of direct viral binding to chymotryptic carboxy-terminal fragments." Blood **88**(3): 855-62.
Moritz, T., V. P. Pateland D. A. Williams (1994). "Bone marrow extracellular matrix molecules improve gene transfer into human hematopoietic cells via retroviral vectors." J. Clin. Invest. **93**(4): 1451-7.
Morizono, K., G. Bristol, Y. M. Xie, S. K. Kungand I. S. Chen (2001). "Antibody-directed targeting of retroviral vectors via cell surface antigens." J Virol **75**(17): 8016-20.
Morizono, K.and I. S. Chen (2011). "Receptors and tropisms of envelope viruses." Curr Opin Virol **1**(1): 13-8.
Muhlebach, M. D., I. Schmitt, S. Steidl, J. Stitz, M. Schweizer, T. Blankenstein, K. Cichutekand W. Uckert (2003). "Transduction efficiency of MLV but not of HIV-1 vectors is pseudotype dependent on human primary T lymphocytes." J Mol Med (Berl) **81**(12): 801-10.
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. Forssmannand F. Kirchhoff (2007). "Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection." Cell **131**(6): 1059-71.
Munch, R. C., M. D. Muhlebach, T. Schaser, S. Kneissl, C. Jost, A. Pluckthun, K. Cichutekand C. J. Buchholz (2011). "DARPins: an efficient targeting domain for lentiviral vectors." Mol. Ther. **19**(4): 686-93.
Mussolino, C., R. Morbitzer, F. Lutge, N. Dannemann, T. Lahayeand T. Cathomen (2011). "A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity." Nucleic Acids Res **39**(21): 9283-93.
Nakajima, T., K. Nakamaru, E. Ido, K. Terao, M. Hayamiand M. Hasegawa (2000). "Development of novel simian immunodeficiency virus vectors carrying a dual gene expression system." Hum Gene Ther **11**(13): 1863-74.
Nakanishi, M., H. Mizuguchi, K. Ashihara, T. Senda, A. Eguchi, A. Watabe, T. Nakanishi, M. Kondo, T. Nakagawa, A. Masago, J. Okabe, S. Ueda, T. Mayumiand T. Hayakawa (1999). "Gene delivery systems using the Sendai virus." Mol Membr Biol **16**(1): 123-7.
Naldini, L., U. Blomer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F. H. Gage, I. M. Vermaand D. Trono (1996). "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector." Science **272**(5259): 263-7.
Nature, E. (2009). "Gene therapy deserves a fresh chance." Nature **461**(7268): 1173.
Nermut, M. V.and A. Fassati (2003). "Structural analyses of purified human immunodeficiency virus type 1 intracellular reverse transcription complexes." J Virol **77**(15): 8196-206.
Nguyen, D. H.and J. E. Hildreth (2000). "Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts." J. Virol. **74**(7): 3264-72.
Nisole, S., J. P. Stoyeand A. Saib (2005). "TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence." Nat Rev Microbiol **3**(10): 799-808.
Nojima, Y., M. J. Humphries, A. P. Mould, A. Komoriya, K. M. Yamada, S. F. Schlossmanand C. Morimoto (1990). "VLA-4 mediates CD3-dependent CD4+ T cell activation via the CS1 alternatively spliced domain of fibronectin." J Exp Med **172**(4): 1185-92.
Norkin, L. C. (2010). Virology, Molecular Biology and Pathogenesis, ASM press.
Nussbaum, O., C. C. Broderand E. A. Berger (1994). "Fusogenic mechanisms of enveloped-virus glycoproteins analyzed by a novel recombinant vaccinia virus-based assay quantitating cell fusion-dependent reporter gene activation." J Virol **68**(9): 5411-22.
Ochs, H. D.and A. J. Thrasher (2006). "The Wiskott-Aldrich syndrome." J Allergy Clin Immunol **117**(4): 725-38; quiz 739.
Ocwieja, K. E., T. L. Brady, K. Ronen, A. Huegel, S. L. Roth, T. Schaller, L. C. James, G. J. Towers, J. A. Young, S. K. Chanda, R. Konig, N. Malani, C. C. Berryand F. D. Bushman (2011). "HIV integration targeting: a pathway involving Transportin-3 and the nuclear pore protein RanBP2." PLoS Pathog **7**(3): e1001313.
Ogris, M., S. Brunner, S. Schuller, R. Kircheisand E. Wagner (1999). "PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery." Gene Ther **6**(4): 595-605.
Oh, T., A. Bajwa, G. Jiaand F. Park (2007). "Lentiviral vector design using alternative RNA export elements." Retrovirology **4**: 38.
Ohashi, T., S. Boggs, P. Robbins, A. Bahnson, K. Patrene, F. S. Wei, J. F. Wei, J. Li, L. Lucht, Y. Feiand et al. (1992). "Efficient transfer and sustained high expression of the human glucocerebrosidase gene in mice and their functional macrophages following transplantation of bone marrow transduced by a retroviral vector." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(23): 11332-6.
Olsen, J. C. (1998). "Gene transfer vectors derived from equine infectious anemia virus." Gene Ther **5**(11): 1481-7.
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. Segerand M. Grez (2006). Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene

therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. Nat Med. **12:** 401-9.

Pacchia, A. L., M. E. Adelson, M. Kaul, Y. Ronand J. P. Dougherty (2001). "An inducible packaging cell system for safe, efficient lentiviral vector production in the absence of HIV-1 accessory proteins." Virology **282**(1): 77-86.

Pai, S. Y., Notarangelo, L.D., Harris, C. (2011). "Somatic gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency using a self-inactivating modified gammaretroviral vector results in an improved preclinical safety profile and early clinical efficacy in a human patient." Blood **118:164**.

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. Pyleand 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." J Virol **87**(4): 2094-108.

Paruzynski, A., A. Arens, R. Gabriel, C. C. Bartholomae, S. Scholz, W. Wang, S. Wolf, H. Glimm, M. Schmidtand C. von Kalle (2010). "Genome-wide high-throughput integrome analyses by nrLAM-PCR and next-generation sequencing." Nat Protoc **5**(8): 1379-95.

Patel, M., M. Yanagishita, G. Roderiquez, D. C. Bou-Habib, T. Oravecz, V. C. Hascalland M. A. Norcross (1993). "Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines." AIDS Res Hum Retroviruses **9**(2): 167-74.

Patel, V. P., A. Ciechanover, O. Plattand H. F. Lodish (1985). "Loss of adhesion of erythrocyte precursors to fibronectin during erythroid differentiation." Prog Clin Biol Res **184**: 355-68.

Patel, V. P.and H. F. Lodish (1986). "The fibronectin receptor on mammalian erythroid precursor cells: characterization and developmental regulation." J Cell Biol **102**(2): 449-56.

Pawliuk, R., K. A. Westerman, M. E. Fabry, E. Payen, R. Tighe, E. E. Bouhassira, S. A. Acharya, J. Ellis, I. M. London, C. J. Eaves, R. K. Humphries, Y. Beuzard, R. L. Nageland P. Leboulch (2001). "Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy." Science **294**(5550): 2368-71.

Peplinski, G. R., K. Tsungand J. A. Norton (1998). "Vaccinia virus for human gene therapy." Surg Oncol Clin N Am **7**(3): 575-88.

Perez-Caballero, D., T. Hatziioannou, F. Zhang, S. Cowanand P. D. Bieniasz (2005). "Restriction of human immunodeficiency virus type 1 by TRIM-CypA occurs with rapid kinetics and independently of cytoplasmic bodies, ubiquitin, and proteasome activity." J Virol **79**(24): 15567-72.

Peters, G., F. Harada, J. E. Dahlberg, A. Panet, W. A. Haseltineand D. Baltimore (1977). "Low-molecular-weight RNAs of Moloney murine leukemia virus: identification of the primer for RNA-directed DNA synthesis." J Virol **21**(3): 1031-41.

Pluta, K.and M. M. Kacprzak (2009). "Use of HIV as a gene transfer vector." Acta Biochim Pol **56**(4): 531-95.

Pluymers, W., N. Neamati, C. Pannecouque, V. Fikkert, C. Marchand, T. R. Burke, Jr., Y. Pommier, D. Schols, E. De Clercq, Z. Debyserand M. Witvrouw (2000). "Viral entry as the primary target for the anti-HIV activity of chicoric acid and its tetra-acetyl esters." Mol Pharmacol **58**(3): 641-8.

Podda, S., M. Ward, A. Himelstein, C. Richardson, E. de la Flor-Weiss, L. Smith, M. Gottesman, I. Pastanand A. Bank (1992). "Transfer and expression of the human multiple drug resistance gene into live mice." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(20): 9676-80.

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." Curr. Opin. Mol. Ther. **1**(5): 595-604.

Polo, J. M., B. A. Belli, D. A. Driver, I. Frolov, S. Sherrill, M. J. Hariharan, K. Townsend, S. Perri, S. J. Mento, D. J. Jolly, S. M. Chang, S. Schlesingerand T. W. Dubensky, Jr. (1999). "Stable alphavirus packaging cell lines for Sindbis virus and Semliki Forest virus-derived vectors." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(8): 4598-603.

Poluri, A., R. Ainsworth, S. C. Weaverand R. E. Sutton (2008). "Functional pseudotyping of human immunodeficiency virus type 1 vectors by Western equine encephalitis virus envelope glycoprotein." J Virol **82**(24): 12580-4.

Popov, S., M. Rexach, L. Ratner, G. Blobeland M. Bukrinsky (1998). "Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex." J Biol Chem **273**(21): 13347-52.

Porteous, D. J., J. R. Dorin, G. McLachlan, H. Davidson-Smith, H. Davidson, B. J. Stevenson, A. D. Carothers, W. A. Wallace, S. Moralee, C. Hoenes, G. Kallmeyer, U. Michaelis, K. Naujoks, L. P. Ho, J. M. Samways, M. Imrie, A. P. Greeningand J. A. Innes (1997). "Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis." Gene Ther **4**(3): 210-8.

Porter, C. D., K. V. Lukacs, G. Box, Y. Takeuchiand M. K. Collins (1998). "Cationic liposomes enhance the rate of transduction by a recombinant retroviral vector in vitro and in vivo." J Virol **72**(6): 4832-40.

Pringle, C. R. (1999). "Virus taxonomy--1999. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998." Arch Virol **144**(2): 421-9.

Raviv, Y., M. Viard, J. Bess, Jr.and R. Blumenthal (2002). "Quantitative measurement of fusion of HIV-1 and SIV with cultured cells using photosensitized labeling." Virology **293**(2): 243-51.

Real, G., F. Monteiro, C. Burgerand P. M. Alves (2011). "Improvement of lentiviral transfer vectors using cis-acting regulatory elements for increased gene expression." Appl Microbiol Biotechnol **91**(6): 1581-91.

Reil, H., A. A. Bukovsky, H. R. Gelderblomand H. G. Gottlinger (1998). "Efficient HIV-1 replication can occur in the absence of the viral matrix protein." Embo J **17**(9): 2699-708.

Reiser, J. (2000). "Production and concentration of pseudotyped HIV-1-based gene transfer vectors." Gene Ther **7**(11): 910-3.

Reiser, J., G. Harmison, S. Kluepfel-Stahl, R. O. Brady, S. Karlssonand M. Schubert (1996). "Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15266-71.

Rey, F. A., F. X. Heinz, C. Mandl, C. Kunzand S. C. Harrison (1995). "The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 A resolution." Nature **375**(6529): 291-8.

Ricks, D. M., R. Kutner, X. Y. Zhang, D. A. Welshand J. Reiser (2008). "Optimized lentiviral transduction of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells." Stem Cells Dev **17**(3): 441-50.

Rio, D. C., S. G. Clarkand R. Tjian (1985). "A mammalian host-vector system that regulates expression and amplification of transfected genes by temperature induction." Science **227**(4682): 23-8.

Rivat, C., G. Santilli, H. B. Gasparand A. J. Thrasher (2012). "Gene therapy for primary immunodeficiencies." Hum Gene Ther **23**(7): 668-75.

Riviere, L., J. L. Darlixand A. Cimarelli (2010). "Analysis of the viral elements required in the nuclear import of HIV-1 DNA." J Virol **84**(2): 729-39.

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. Munchand W. C. Greene (2011). "Peptides released by physiological cleavage of semen coagulum proteins form amyloids that enhance HIV infection." Cell Host Microbe **10**(6): 541-50.

Roan, N. R., J. Munch, N. Arhel, W. Mothes, J. Neidleman, A. Kobayashi, K. Smith-McCune, F. Kirchhoffand W. C. Greene (2009a). "The cationic properties of SEVI underlie its ability to enhance human immunodeficiency virus infection." J. Virol. **83**(1): 73-80.

Roan, N. R., S. Sowinski, J. Muench, F. Kirchhoffand W. C. Greene (2009b). "The aminoquinoline surfen inhibits the action of semen-derived enhancer of viral infection (SEVI)." J. Biol. Chem.

Robertson, E. S., T. Ookaand E. D. Kieff (1996). "Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11334-40.

Roche, S., A. A. Albertini, J. Lepault, S. Bressanelliand Y. Gaudin (2008). "Structures of vesicular stomatitis virus glycoprotein: membrane fusion revisited." Cell Mol Life Sci **65**(11): 1716-28.

Roche, S., S. Bressanelli, F. A. Reyand Y. Gaudin (2006). "Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G." Science **313**(5784): 187-91.
Roche, S., F. A. Rey, Y. Gaudinand S. Bressanelli (2007). "Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G." Science **315**(5813): 843-8.
Roderiquez, G., T. Oravecz, M. Yanagishita, D. C. Bou-Habib, H. Mostowskiand M. A. Norcross (1995). "Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41." J Virol **69**(4): 2233-9.
Rodrigues, T., M. J. Carrondo, P. M. Alvesand P. E. Cruz (2007). "Purification of retroviral vectors for clinical application: biological implications and technological challenges." J. Biotechnol. **127**(3): 520-41.
Roe, T., T. C. Reynolds, G. Yuand P. O. Brown (1993). "Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis." Embo J **12**(5): 2099-108.
Rosenberg, S. A., P. Aebersold, K. Cornetta, A. Kasid, R. A. Morgan, R. Moen, E. M. Karson, M. T. Lotze, J. C. Yang, S. L. Topalianand et al. (1990). "Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction." N Engl J Med **323**(9): 570-8.
Russell, R. J., S. J. Gamblin, L. F. Haire, D. J. Stevens, B. Xiao, Y. Haand J. J. Skehel (2004). "H1 and H7 influenza haemagglutinin structures extend a structural classification of haemagglutinin subtypes." Virology **325**(2): 287-96.
Sabatino, D. E., B. Q. Do, L. C. Pyle, N. E. Seidel, L. J. Girard, S. K. Spratt, D. Orlicand D. M. Bodine (1997). "Amphotropic or gibbon ape leukemia virus retrovirus binding and transduction correlates with the level of receptor mRNA in human hematopoietic cell lines." Blood Cells Mol Dis **23**(3): 422-33.
Sade, R. M.and G. Khushf (1998). "Gene therapy: ethical and social issues." J S C Med Assoc **94**(9): 406-10.
Saldanha, R., G. Mohr, M. Belfortand A. M. Lambowitz (1993). "Group I and group II introns." Faseb J **7**(1): 15-24.
San Filippo, J.and A. M. Lambowitz (2002). "Characterization of the C-terminal DNA-binding/DNA endonuclease region of a group II intron-encoded protein." J Mol Biol **324**(5): 933-51.
Sandrin, V., B. Boson, P. Salmon, W. Gay, D. Negre, R. Le Grand, D. Tronoand 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**(3): 823-32.
Santilli, G., E. Almarza, C. Brendel, U. Choi, C. Beilin, M. P. Blundell, S. Haria, K. L. Parsley, C. Kinnon, H. L. Malech, J. A. Bueren, M. Grezand A. J. Thrasher (2011). "Biochemical correction of X-CGD by a novel chimeric promoter regulating high levels of transgene expression in myeloid cells." Mol Ther **19**(1): 122-32.
Santoni de Sio, F. R., P. Cascio, A. Zingale, M. Gaspariniand L. Naldini (2006). "Proteasome activity restricts lentiviral gene transfer into hematopoietic stem cells and is down-regulated by cytokines that enhance transduction." Blood **107**(11): 4257-65.
Santoni de Sio, F. R., A. Gritti, P. Cascio, M. Neri, M. Sampaolesi, C. Galli, J. Lubanand L. Naldini (2008). "Lentiviral vector gene transfer is limited by the proteasome at postentry steps in various types of stem cells." Stem Cells **26**(8): 2142-52.
Santos, N. C., J. Figueira-Coelho, J. Martins-Silvaand C. Saldanha (2003). "Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects." Biochem Pharmacol **65**(7): 1035-41.
Sato, T., K. Tachibana, Y. Nojima, N. D'Avirroand C. Morimoto (1995). "Role of the VLA-4 molecule in T cell costimulation. Identification of the tyrosine phosphorylation pattern induced by the ligation of VLA-4." J Immunol **155**(6): 2938-47.
Scaramuzza, S., L. Biasco, A. Ripamonti, M. C. Castiello, M. Loperfido, E. Draghici, R. J. Hernandez, F. Benedicenti, M. Radrizzani, M. Salomoni, M. Ranzani, C. C. Bartholomae, E. Vicenzi, A.

Finocchi, R. Bredius, M. Bosticardo, M. Schmidt, C. von Kalle, E. Montini, A. Biffi, M. G. Roncarolo, L. Naldini, A. Villaand A. Aiuti (2012). "Preclinical safety and efficacy of human CD34(+) cells transduced with lentiviral vector for the treatment of Wiskott-Aldrich syndrome." Mol Ther **21**(1): 175-84.

Schafer, B., B. Wilde, D. R. Massardo, F. Manna, L. Del Giudiceand K. Wolf (1994). "A mitochondrial group-I intron in fission yeast encodes a maturase and is mobile in crosses." Curr Genet **25**(4): 336-41.

Schaller, T., K. E. Ocwieja, J. Rasaiyaah, A. J. Price, T. L. Brady, S. L. Roth, S. Hue, A. J. Fletcher, K. Lee, V. N. KewalRamani, M. Noursadeghi, R. G. Jenner, L. C. James, F. D. Bushmanand G. J. Towers (2011). "HIV-1 capsid-cyclophilin interactions determine nuclear import pathway, integration targeting and replication efficiency." PLoS Pathog **7**(12): e1002439.

Schambach, A., J. Bohne, C. Baum, F. G. Hermann, L. Egerer, D. von Laerand T. Giroglou (2006). "Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element deleted from X protein and promoter sequences enhances retroviral vector titer and expression." Gene Ther **13**(7): 641-5.

Scherr, M., K. Battmer, U. Blomer, A. Ganserand M. Grez (2001). "Quantitative determination of lentiviral vector particle numbers by real-time PCR." Biotechniques **31**(3): 520, 522, 524, passim.

Schlegel, R.and M. Wade (1983). "Neutralized vesicular stomatitis virus binds to host cells by a different "receptor"." Biochem Biophys Res Commun **114**(2): 774-8.

Schlegel, R., M. C. Willinghamand I. H. Pastan (1982). "Saturable binding sites for vesicular stomatitis virus on the surface of Vero cells." J Virol **43**(3): 871-5.

Schroder, A. R., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J. R. Eckerand F. Bushman (2002). "HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots." Cell **110**(4): 521-9.

Schuening, F. G., K. Kawahara, A. D. Miller, R. To, S. Goehle, D. Stewart, K. Mullally, L. Fisher, T. C. Graham, F. R. Appelbaumand et al. (1991). "Retrovirus-mediated gene transduction into long-term repopulating marrow cells of dogs." Blood **78**(10): 2568-76.

Schwartz, O., V. Marechal, B. Friguet, F. Arenzana-Seisdedosand J. M. Heard (1998). "Antiviral activity of the proteasome on incoming human immunodeficiency virus type 1." J Virol **72**(5): 3845-50.

Schweizer, M.and O. W. Merten (2010). "Large-scale production means for the manufacturing of lentiviral vectors." Curr Gene Ther **10**(6): 474-86.

Segura, M. M., A. Garnier, Y. Durocher, S. Ansorgeand A. Kamen (2010). "New protocol for lentiviral vector mass production." Methods Mol. Biol. **614**: 39-52.

Segura, M. M., A. Garnier, Y. Durocher, H. Coelhoand A. Kamen (2007). "Production of lentiviral vectors by large-scale transient transfection of suspension cultures and affinity chromatography purification." Biotechnol Bioeng **98**(4): 789-99.

Segura, M. M., A. Kamenand A. Garnier (2006). "Downstream processing of oncoretroviral and lentiviral gene therapy vectors." Biotechnol Adv **24**(3): 321-37.

Selvaggi, T. A., R. E. Walkerand T. A. Fleisher (1997). "Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions." Blood **89**(3): 776-9.

Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, J. D. Choiand M. H. Malim (2002). "Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein." Nature **418**(6898): 646-50.

Sheehy, A. M., N. C. Gaddisand M. H. Malim (2003). "The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif." Nat Med **9**(11): 1404-7.

Shirakawa, K., A. Takaori-Kondo, M. Kobayashi, M. Tomonaga, T. Izumi, K. Fukunaga, A. Sasada, A. Abudu, Y. Miyauchi, H. Akari, K. Iwaiand T. Uchiyama (2006). "Ubiquitination of APOBEC3 proteins by the Vif-Cullin5-ElonginB-ElonginC complex." Virology **344**(2): 263-6.

Si, Y., A. C. Pulliam, Y. Linka, S. Ciccone, C. Leurs, J. Yuan, O. Eckermann, S. Fruehauf, S. Mooney, H. Hanenbergand D. W. Clapp (2008). "Overnight transduction with foamyviral vectors restores the long-term repopulating activity of Fancc-/- stem cells." Blood **112**(12): 4458-65.

Sierra-Aragon, S.and H. Walter (2012). "Targets for inhibition of HIV replication: entry, enzyme action, release and maturation." Intervirology **55**(2): 84-97.
Sinclair, A. M., Y. P. Agrawal, E. Elbar, R. Agrawal, A. D. Hoand F. Levine (1997). "Interaction of vesicular stomatitis virus-G pseudotyped retrovirus with CD34+ and CD34+ CD38- hematopoietic progenitor cells." Gene Ther **4**(9): 918-27.
Singh, N. N.and A. M. Lambowitz (2001). "Interaction of a group II intron ribonucleoprotein endonuclease with its DNA target site investigated by DNA footprinting and modification interference." J Mol Biol **309**(2): 361-86.
Sinn, P. L., S. L. Sauterand P. B. McCray, Jr. (2005). "Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors--design, biosafety, and production." Gene Ther **12**(14): 1089-98.
Smith, J. K., A. Cywinskiand J. M. Taylor (1984). "Specificity of initiation of plus-strand DNA by Rous sarcoma virus." J Virol **52**(2): 314-9.
Somiari, S., J. Glasspool-Malone, J. J. Drabick, R. A. Gilbert, R. Heller, M. J. Jaroszeskiand R. W. Malone (2000). "Theory and in vivo application of electroporative gene delivery." Mol Ther **2**(3): 178-87.
Sorge, J.and S. H. Hughes (1982). "Polypurine tract adjacent to the U3 region of the Rous sarcoma virus genome provides a cis-acting function." J Virol **43**(2): 482-8.
Sorgi, F. L., S. Bhattacharyaand L. Huang (1997). "Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer." Gene Ther **4**(9): 961-8.
Sorrentino, B. P., S. J. Brandt, D. Bodine, M. Gottesman, I. Pastan, A. Clineand A. W. Nienhuis (1992). "Selection of drug-resistant bone marrow cells in vivo after retroviral transfer of human MDR1." Science **257**(5066): 99-103.
Spruce, A. E., A. Iwata, J. M. Whiteand W. Almers (1989). "Patch clamp studies of single cell-fusion events mediated by a viral fusion protein." Nature **342**(6249): 555-8.
St Gelais, C.and L. Wu (2011). "SAMHD1: a new insight into HIV-1 restriction in myeloid cells." Retrovirology **8**: 55.
Stein, C. S., I. Martinsand B. L. Davidson (2005). "The lymphocytic choriomeningitis virus envelope glycoprotein targets lentiviral gene transfer vector to neural progenitors in the murine brain." Mol Ther **11**(3): 382-9.
Stein, S., M. G. Ott, S. Schultze-Strasser, A. Jauch, B. Burwinkel, A. Kinner, M. Schmidt, A. Kramer, J. Schwable, H. Glimm, U. Koehl, C. Preiss, C. Ball, H. Martin, G. Gohring, K. Schwarzwaelder, W. K. Hofmann, K. Karakaya, S. Tchatchou, R. Yang, P. Reinecke, K. Kuhlcke, B. Schlegelberger, A. J. Thrasher, D. Hoelzer, R. Seger, C. von Kalleand M. Grez (2010). "Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease." Nat Med **16**(2): 198-204.
Stewart, H. J., L. Fong-Wong, I. Strickland, D. Chipchase, M. Kelleher, L. Stevenson, V. Thoree, J. McCarthy, G. S. Ralph, K. A. Mitrophanousand P. A. Radcliffe (2011). "A stable producer cell line for the manufacture of a lentiviral vector for gene therapy of Parkinson's disease." Hum. Gene Ther. **22**(3): 357-69.
Stewart, H. J., M. A. Leroux-Carlucci, C. J. Sion, K. A. Mitrophanousand P. A. Radcliffe (2009). "Development of inducible EIAV-based lentiviral vector packaging and producer cell lines." Gene Ther **16**(6): 805-14.
Stitz, J., C. J. Buchholz, M. Engelstadter, W. Uckert, U. Bloemer, I. Schmittand K. Cichutek (2000). "Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1." Virology **273**(1): 16-20.
Stopeck, A. T., E. M. Hersh, E. T. Akporiaye, D. T. Harris, T. Grogan, E. Unger, J. Warneke, S. F. Schluterand S. Stahl (1997). "Phase I study of direct gene transfer of an allogeneic histocompatibility antigen, HLA-B7, in patients with metastatic melanoma." J Clin Oncol **15**(1): 341-9.
Stopeck, A. T., A. Jones, E. M. Hersh, J. A. Thompson, D. M. Finucane, J. C. Gutheiland R. Gonzalez (2001). "Phase II study of direct intralesional gene transfer of allovectin-7, an HLA-B7/beta2-

microglobulin DNA-liposome complex, in patients with metastatic melanoma." Clin Cancer Res **7**(8): 2285-91.

Stornaiuolo, A., B. Piovani, S. Bossi, E. Zucchelli, S. Corna, F. Salvatori, F. Mavilio, C. Bordignon, G. Rizzardiand C. Bovolenta (2013). "RD2-MolPack-Chim3, a packaging cell line for stable production of lentiviral vectors for anti-HIV gene therapy." Hum Gene Ther Methods.

Strang, B. L., Y. Takeuchi, T. Relander, J. Richter, R. Bailey, D. A. Sanders, M. K. Collinsand Y. Ikeda (2005). "Human immunodeficiency virus type 1 vectors with alphavirus envelope glycoproteins produced from stable packaging cells." J Virol **79**(3): 1765-71.

Strappe, P. M., D. W. Hampton, B. Cachon-Gonzalez, J. W. Fawcettand A. Lever (2005). "Delivery of a lentiviral vector in a Pluronic F127 gel to cells of the central nervous system." Eur J Pharm Biopharm **61**(3): 126-33.

Stremlau, M., C. M. Owens, M. J. Perron, M. Kiessling, P. Autissierand J. Sodroski (2004). "The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys." Nature **427**(6977): 848-53.

Sun, X., S. Belouzardand G. R. Whittaker (2008). "Molecular architecture of the bipartite fusion loops of vesicular stomatitis virus glycoprotein G, a class III viral fusion protein." J Biol Chem **283**(10): 6418-27.

Sutton, R. E., M. J. Reitsma, N. Uchidaand P. O. Brown (1999). "Transduction of human progenitor hematopoietic stem cells by human immunodeficiency virus type 1-based vectors is cell cycle dependent." J Virol **73**(5): 3649-60.

Sweeney, P., T. Karashima, H. Ishikura, S. Wiehle, M. Yamashita, W. F. Benedict, R. J. Cristianoand C. P. Dinney (2003). "Efficient therapeutic gene delivery after systemic administration of a novel polyethylenimine/DNA vector in an orthotopic bladder cancer model." Cancer Res **63**(14): 4017-20.

Szczepanek, T., K. Jamoussiand J. Lazowska (2000). "Critical base substitutions that affect the splicing and/or homing activities of the group I intron bi2 of yeast mitochondria." Mol Gen Genet **264**(1-2): 137-44.

Szebik, I.and K. C. Glass (2001). "Ethical issues of human germ-cell therapy: a preparation for public discussion." Acad Med **76**(1): 32-8.

Tanese, N., A. Telesnitskyand S. P. Goff (1991). "Abortive reverse transcription by mutants of Moloney murine leukemia virus deficient in the reverse transcriptase-associated RNase H function." J Virol **65**(8): 4387-97.

Tani, H. (2011). "[Development of viral vectors and the application for viral entry mechanisms]." Uirusu **61**(1): 99-107.

Themis, M., S. J. Forbes, L. Chan, R. G. Cooper, C. J. Etheridge, A. D. Miller, H. J. Hodgsonand C. Coutelle (1998). "Enhanced in vitro and in vivo gene delivery using cationic agent complexed retrovirus vectors." Gene Ther **5**(9): 1180-6.

Thrasher, A. J., S. Hacein-Bey-Abina, H. B. Gaspar, S. Blanche, E. G. Davies, K. Parsley, K. Gilmour, D. King, S. Howe, J. Sinclair, C. Hue, F. Carlier, C. von Kalle, G. de Saint Basile, F. le Deist, A. Fischerand M. Cavazzana-Calvo (2005). "Failure of SCID-X1 gene therapy in older patients." Blood **105**(11): 4255-7.

Throm, R. E., A. A. Ouma, S. Zhou, A. Chandrasekaran, T. Lockey, M. Greene, S. S. De Ravin, M. Moayeri, H. L. Malech, B. P. Sorrentinoand J. T. Gray (2009). "Efficient construction of producer cell lines for a SIN lentiviral vector for SCID-X1 gene therapy by concatemeric array transfection." Blood **113**(21): 5104-10.

Tiscornia, G., O. Singerand I. M. Verma (2006). "Production and purification of lentiviral vectors." Nat Protoc **1**(1): 241-5.

Toor, N., K. S. Keatingand A. M. Pyle (2009). "Structural insights into RNA splicing." Curr Opin Struct Biol **19**(3): 260-6.

Toyoshima, K.and P. K. Vogt (1969). "Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions." Virology **38**(3): 414-26.

Trobridge, G. D. (2009). "Foamy virus vectors for gene transfer." Expert Opin Biol Ther **9**(11): 1427-36.
Trono, D. (1992). "Partial reverse transcripts in virions from human immunodeficiency and murine leukemia viruses." J Virol **66**(8): 4893-900.
Trumpfheller, C., C. G. Park, J. Finke, R. M. Steinmanand A. Granelli-Piperno (2003). "Cell type-dependent retention and transmission of HIV-1 by DC-SIGN." Int Immunol **15**(2): 289-98.
Turner, B. G.and M. F. Summers (1999). "Structural biology of HIV." J Mol Biol **285**(1): 1-32.
Tuschong, L., S. L. Soenen, R. M. Blaese, F. Candottiand L. M. Muul (2002). "Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy." Hum Gene Ther **13**(13): 1605-10.
Urnov, F. D., J. C. Miller, Y. L. Lee, C. M. Beausejour, J. M. Rock, S. Augustus, A. C. Jamieson, M. H. Porteus, P. D. Gregoryand M. C. Holmes (2005). "Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases." Nature **435**(7042): 646-51.
van Beusechem, V. W., A. Kukler, P. J. Heidtand D. Valerio (1992). "Long-term expression of human adenosine deaminase in rhesus monkeys transplanted with retrovirus-infected bone-marrow cells." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(16): 7640-4.
Van Craenenbroeck, K., P. Vanhoenackerand G. Haegeman (2000). "Episomal vectors for gene expression in mammalian cells." Eur J Biochem **267**(18): 5665-78.
van der Loo, J. C., B. L. Liu, A. I. Goldman, S. M. Buckleyand K. S. Chrudimsky (2002). "Optimization of gene transfer into primitive human hematopoietic cells of granulocyte-colony stimulating factor-mobilized peripheral blood using low-dose cytokines and comparison of a gibbon ape leukemia virus versus an RD114-pseudotyped retroviral vector." Hum Gene Ther **13**(11): 1317-30.
van der Loo, J. C., X. Xiao, D. McMillin, K. Hashino, I. Katoand D. A. Williams (1998). "VLA-5 is expressed by mouse and human long-term repopulating hematopoietic cells and mediates adhesion to extracellular matrix protein fibronectin." J Clin Invest **102**(5): 1051-61.
Vigna, E.and L. Naldini (2000). "Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy." J Gene Med **2**(5): 308-16.
Vives, R. R., A. Imberty, Q. J. Sattentauand H. Lortat-Jacob (2005). "Heparan sulfate targets the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 coreceptor binding site." J Biol Chem **280**(22): 21353-7.
Vogt, V. M. (1997). "Retroviral Virions and Genomes."
Wang, G. P., A. Ciuffi, J. Leipzig, C. C. Berryand F. D. Bushman (2007a). "HIV integration site selection: analysis by massively parallel pyrosequencing reveals association with epigenetic modifications." Genome Res **17**(8): 1186-94.
Wang, G. P., A. Garrigue, A. Ciuffi, K. Ronen, J. Leipzig, C. Berry, C. Lagresle-Peyrou, F. Benjelloun, S. Hacein-Bey-Abina, A. Fischer, M. Cavazzana-Calvoand F. D. Bushman (2008). "DNA bar coding and pyrosequencing to analyze adverse events in therapeutic gene transfer." Nucleic Acids Res **36**(9): e49.
Wang, J. H., A. M. Janas, W. J. Olson, V. N. KewalRamaniand L. Wu (2007b). "CD4 coexpression regulates DC-SIGN-mediated transmission of human immunodeficiency virus type 1." J Virol **81**(5): 2497-507.
Wang, J. H., A. M. Janas, W. J. Olsonand L. Wu (2007c). "Functionally distinct transmission of human immunodeficiency virus type 1 mediated by immature and mature dendritic cells." J Virol **81**(17): 8933-43.
Wank, H., J. SanFilippo, R. N. Singh, M. Matsuuraand A. M. Lambowitz (1999). "A reverse transcriptase/maturase promotes splicing by binding at its own coding segment in a group II intron RNA." Mol Cell **4**(2): 239-50.
Ward, C. M., M. L. Readand L. W. Seymour (2001). "Systemic circulation of poly(L-lysine)/DNA vectors is influenced by polycation molecular weight and type of DNA: differential circulation in mice and rats and the implications for human gene therapy." Blood **97**(8): 2221-9.

Wei, B. L., P. W. Denton, E. O'Neill, T. Luo, J. L. Fosterand J. V. Garcia (2005). "Inhibition of lysosome and proteasome function enhances human immunodeficiency virus type 1 infection." J. Virol. **79**(9): 5705-12.

Weil, A. F., D. Ghosh, Y. Zhou, L. Seiple, M. A. McMahon, A. M. Spivak, R. F. Silicianoand J. T. Stivers (2013). "Uracil DNA glycosylase initiates degradation of HIV-1 cDNA containing misincorporated dUTP and prevents viral integration." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(6): E448-57.

Wenzlau, J. M., R. J. Saldanha, R. A. Butowand P. S. Perlman (1989). "A latent intron-encoded maturase is also an endonuclease needed for intron mobility." Cell **56**(3): 421-30.

White, J. M., S. E. Delos, M. Brecherand K. Schornberg (2008). "Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme." Crit Rev Biochem Mol Biol **43**(3): 189-219.

Williams, D. A. (1999). "Retroviral-fibronectin interactions in transduction of mammalian cells." Ann N Y Acad Sci **872**: 109-13; discussion 113-4.

Williams, D. A., I. R. Lemischka, D. G. Nathanand R. C. Mulligan (1984). "Introduction of new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse." Nature **310**(5977): 476-80.

Williams, D. A., M. Rios, C. Stephensand V. P. Patel (1991). "Fibronectin and VLA-4 in haematopoietic stem cell-microenvironment interactions." Nature **352**(6334): 438-41.

Witting, S. R., L. H. Li, A. Jasti, C. Allen, K. Cornetta, J. Brady, R. Shivakumarand M. V. Peshwa (2012). "Efficient large volume lentiviral vector production using flow electroporation." Hum Gene Ther **23**(2): 243-9.

Wong, L. F., M. Azzouz, L. E. Walmsley, Z. Askham, F. J. Wilkes, K. A. Mitrophanous, S. M. Kingsmanand N. D. Mazarakis (2004). "Transduction patterns of pseudotyped lentiviral vectors in the nervous system." Mol Ther **9**(1): 101-11.

Wu, X., Y. Li, B. Criseand S. M. Burgess (2003). "Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration." Science **300**(5626): 1749-51.

Wurm, M., A. Schambach, D. Lindemann, H. Hanenberg, L. Standker, W. G. Forssmann, R. Blasczykand P. A. Horn (2010). "The influence of semen-derived enhancer of virus infection on the efficiency of retroviral gene transfer." J. Gene Med. **12**(2): 137-46.

Xu, L., C. C. Huang, W. Huang, W. H. Tang, A. Rait, Y. Z. Yin, I. Cruz, L. M. Xiang, K. F. Pirolloand E. H. Chang (2002). "Systemic tumor-targeted gene delivery by anti-transferrin receptor scFv-immunoliposomes." Mol Cancer Ther **1**(5): 337-46.

Yamashita, M.and M. Emerman (2004). "Capsid is a dominant determinant of retrovirus infectivity in nondividing cells." J Virol **78**(11): 5670-8.

Yamashita, M.and M. Emerman (2005). "The cell cycle independence of HIV infections is not determined by known karyophilic viral elements." PLoS Pathog **1**(3): e18.

Yang, Q., A. Lucas, S. Sonand L. J. Chang (2007). "Overlapping enhancer/promoter and transcriptional termination signals in the lentiviral long terminal repeat." Retrovirology **4**: 4.

Yang, Y. W.and Y. C. Hsieh (2001). "Protamine sulfate enhances the transduction efficiency of recombinant adeno-associated virus-mediated gene delivery." Pharm Res **18**(7): 922-7.

Yilmaz, A., S. Fernandez, M. D. Lairmoreand K. Boris-Lawrie (2006). "Coordinate enhancement of transgene transcription and translation in a lentiviral vector." Retrovirology **3**: 13.

Yin, H. S., R. G. Paterson, X. Wen, R. A. Lamband T. S. Jardetzky (2005). "Structure of the uncleaved ectodomain of the paramyxovirus (hPIV3) fusion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(26): 9288-93.

Yin, H. S., X. Wen, R. G. Paterson, R. A. Lamband T. S. Jardetzky (2006). "Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation." Nature **439**(7072): 38-44.

Yoder, K., A. Sarasin, K. Kraemer, M. McIlhatton, F. Bushmanand R. Fishel (2006). "The DNA repair genes XPB and XPD defend cells from retroviral infection." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(12): 4622-7.

Yoder, M. C.and D. A. Williams (1995). "Matrix molecule interactions with hematopoietic stem cells." Exp Hematol **23**(9): 961-7.

Yokota, T., K. Oritani, H. Mitsui, K. Aoyama, J. Ishikawa, H. Sugahara, I. Matsumura, S. Tsai, Y. Tomiyama, Y. Kanakuraand Y. Matsuzawa (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**(9): 3263-72.

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. Kirchhoffand J. Munch (2013). "Peptide nanofibrils boost retroviral gene transfer and provide a rapid means for concentrating viruses." Nat. Nanotechnol. **8**(2): 130-6.

Yu, S. F., D. N. Baldwin, S. R. Gwynn, S. Yendapalliand M. L. Linial (1996). "Human foamy virus replication: a pathway distinct from that of retroviruses and hepadnaviruses." Science **271**(5255): 1579-82.

Yu, S. F., M. D. Sullivanand M. L. Linial (1999). "Evidence that the human foamy virus genome is DNA." J Virol **73**(2): 1565-72.

Yu, S. S., I. Nukaya, T. Enoki, E. Chatani, A. Kato, Y. Goto, K. Dan, M. Sasaki, K. Tomita, M. Tanabe, H. Chono, J. Minenoand I. Kato (2008). "In vivo persistence of genetically modified T cells generated ex vivo using the fibronectin CH296 stimulation method." Cancer Gene Ther **15**(8): 508-16.

Yu, X., Y. Yu, B. Liu, K. Luo, W. Kong, P. Maoand X. F. Yu (2003). "Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex." Science **302**(5647): 1056-60.

Zabner, J., S. H. Cheng, D. Meeker, J. Launspach, R. Balfour, M. A. Perricone, J. E. Morris, J. Marshall, A. Fasbender, A. E. Smithand M. J. Welsh (1997). "Comparison of DNA-lipid complexes and DNA alone for gene transfer to cystic fibrosis airway epithelia in vivo." J Clin Invest **100**(6): 1529-37.

Zabner, J., A. J. Fasbender, T. Moninger, K. A. Poellingerand M. J. Welsh (1995). "Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid." J Biol Chem **270**(32): 18997-9007.

Zaitseva, E., A. Mittal, D. E. Griffinand L. V. Chernomordik (2005). "Class II fusion protein of alphaviruses drives membrane fusion through the same pathway as class I proteins." J Cell Biol **169**(1): 167-77.

Zanta-Boussif, M. A., S. Charrier, A. Brice-Ouzet, S. Martin, P. Opolon, A. J. Thrasher, T. J. Hopeand A. Galy (2009). "Validation of a mutated PRE sequence allowing high and sustained transgene expression while abrogating WHV-X protein synthesis: application to the gene therapy of WAS." Gene Ther **16**(5): 605-19.

Zeilfelder, U.and V. Bosch (2001). "Properties of wild-type, C-terminally truncated, and chimeric maedi-visna virus glycoprotein and putative pseudotyping of retroviral vector particles." J Virol **75**(1): 548-55.

Zennou, V., C. Petit, D. Guetard, U. Nerhbass, L. Montagnierand P. Charneau (2000). "HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap." Cell **101**(2): 173-85.

Zhang, J., D. T. Scaddenand C. S. Crumpacker (2007). "Primitive hematopoietic cells resist HIV-1 infection via p21." J. Clin. Invest. **117**(2): 473-81.

Zhang, X. Y., V. F. La Russaand J. Reiser (2004). "Transduction of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by using lentivirus vectors pseudotyped with modified RD114 envelope glycoproteins." J Virol **78**(3): 1219-29.

Zhang, Y., A. Satterleeand L. Huang (2012). "In vivo gene delivery by nonviral vectors: overcoming hurdles?" Mol Ther **20**(7): 1298-304.

Zhou, Q., I. C. Schneider, M. Gallet, S. Kneissland C. J. Buchholz (2011). "Resting lymphocyte transduction with measles virus glycoprotein pseudotyped lentiviral vectors relies on CD46 and SLAM." Virology **413**(2): 149-52.

Zufferey, R., T. Dull, R. J. Mandel, A. Bukovsky, D. Quiroz, L. Naldiniand D. Trono (1998). "Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery." J Virol **72**(12): 9873-80.

Zychlinski, D., A. Schambach, U. Modlich, T. Maetzig, J. Meyer, E. Grassman, A. Mishraand C. Baum (2008). "Physiological promoters reduce the genotoxic risk of integrating gene vectors." Mol Ther **16**(4): 718-25.

Les vecteurs lentiviraux (LV) 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 (CSPH). Afin d'étudier simultanément la fusion et la transduction dans les CSPH avec les LV, nous avons adapté une méthode basée sur la technologie du transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes (FRET). Pour mettre en place cette technique, des LV capables d'incorporer spécifiquement une enzyme, la béta-lactamase (BLAM-LV) et de coder une forme tronquée du récepteur au facteur de croissance nerveuse (DELTA-NGFR), sont produits. Nos résultats montrent que les LV sont soumis à une restriction post-entrée forte dans les cellules hématopoïétiques, que ce soit dans des lymphocytes T immortalisés ou bien des CSH CD34+. Nous montrons également que cette inhibition post-entrée peut être partiellement saturée après une forte augmentation de la multiplicité d'infection ou en présence d'additifs de culture, comme la Vectofusin-1® ou la Retronectin®. De plus, nous avons montré lors de la transduction de CSPH avec des vecteurs BLAM-LV que la Vectofusin-1® agit sur l'étape d'entrée en augmentant l'adhésion et la fusion entre les membranes virale et cellulaire. Cette technique représente donc un nouvel outil sensible et efficace pour étudier de façon concomitante l'étape de fusion et le niveau de transduction dans les cellules cibles. A terme, ce travail permettra une meilleure compréhension de la biologie des LV mais pourra également conduire à l'élaboration de protocoles de transduction lentivirale plus efficaces.

<u>Mots clés :</u> Vecteur Lentiviral, Cellule Hématopoïétique, Thérapie Génique, Essai Fusion, Restriction Post-Entrée

Lentiviral vectors (LV) are used for various gene transfer applications, notably for hematopoietic gene therapy, but methods are lacking to precisely evaluate parameters that control the efficiency of transduction in relation with the entry of vectors into target cells. We adapted a fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based HIV-1 fusion assay to measure the entry of non-replicative recombinant LV in various cell types, including primary human hematopoietic stem and progenitor cells, and to quantify the level of transduction of the same initially-infected cells. The assay utilizes recombinant LV containing beta-lactamase (BLAM)-Vpr chimeric proteins (BLAM-LV) and encoding a truncated form of the low affinity nerve growth factor receptor (DELTA-NGFR). This LV-based fusion/transduction assay is a dynamic and versatile tool, revealing for instance the extent of lentiviral post-entry restrictions occuring in cells of hematopoietic origin. The assay also shows that transduction enhancers like Vectofusin®-1 or Retronectin® can partially relieve this post-entry block but their effects differ in the way to promote LV entry. Furthermore, our results show that Vectofusin®-1 acts at the entry step by promoting the adhesion and the fusion between lentiviral and cellular membranes. In conclusion, one such assay should be useful to study hematopoietic post-entry restrictions directed against LV and should allow improvements in various LV-based gene therapy protocols.

<u>Keyword:</u> Lentiviral Vector, Hematopoietic Cell, Gene Therapy, Fusion Assay, Post-Entry Restriction