



**HAL**  
open science

# Effets des protéines virales sur l'organisation nucléaire des lymphocytes B du sang périphérique humain

Rawan El Amine

► **To cite this version:**

Rawan El Amine. Effets des protéines virales sur l'organisation nucléaire des lymphocytes B du sang périphérique humain. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris Saclay (COMUE); École doctorale des Sciences et de Technologie (Beyrouth), 2017. Français. NNT : 2017SACLS505 . tel-01790346

**HAL Id: tel-01790346**

**<https://theses.hal.science/tel-01790346>**

Submitted on 12 May 2018

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

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

NNT : 2017SACLS505

## Effets des protéines virales sur l'organisation nucléaire des lymphocytes B du sang périphérique humain

Thèse de doctorat en cotutelle de l'Université Paris-Saclay  
et l'Université Libanaise préparée à l'Université Paris Sud

École doctorale n°582  
CBMS Cancérologie : Biologie - Médecine - Santé  
Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

École doctorale des Sciences et de Technologie EDST  
Spécialité de doctorat : Cancérologie

Thèse présentée et soutenue à Gustave Roussy, Villejuif,  
le 11 Décembre 2017, par

**Rawan EL AMINE**

Composition du Jury :

Alexander ISHCENKO	Directeur de Recherche CNRS	Président
Nikolajs SJAKSTE	Professeur, Université de Lettonie	Rapporteur
Marwan EL-SABBAN	Professeur, Université Américaine	Rapporteur
Corinne DUPUY	Directrice de Recherche, CNRS	Examinatrice
Eva HAMADE	Professeur, Université Libanaise	Examinatrice
Yegor VASSETZKY	Directeur de Recherche, CNRS	Directeur de thèse
Fadia NAJJAR	Professeur, Université Libanaise	Directrice de thèse
Aline HAMADE	Maitre de conférences, Uni Libanaise	Co-Directrice de thèse

## Remerciements

C'est un grand plaisir pour moi de remercier toutes les personnes qui m'ont aidée et soutenue pour achever ce travail. Je suis heureuse de partager avec eux mes sincères sentiments.

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'examiner ce travail. Je remercie sincèrement les Docteurs Nikolajs Sjakste et Marwan El Sabban pour le temps qu'ils ont consacré à l'examen de ce manuscrit et pour leurs suggestions constructives et didactiques. Je remercie le Dr Alexander Ishchenko pour avoir accepté d'examiner ma thèse et de présider mon jury. Je remercie chaleureusement les Docteurs Corinne Dupuy et Eva Hamade pour leur présence en qualité d'examinatrices au sein de ce jury.

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à mon directeur de thèse Docteur Yegor Vassetzky et mes directrices de thèse Docteurs Fadia Najjar et Aline Hamade. Je les remercie pour la confiance qu'ils m'ont témoignée du début à la fin de ma thèse, pour leur disponibilité, leurs discussions et leurs conseils inestimables. Je remercie mon directeur Yegor Vassetzky de m'avoir acceptée dans son formidable équipe. Il a su me transmettre sa passion professionnelle, ses connaissances dans divers domaines, et il m'a permis de dépasser tous les obstacles, je le remercie pour ses conseils avisés et ses encouragements dans les moments difficiles et pour m'avoir guidée au long de cette thèse. Je suis très fière et satisfaite d'être une doctorante dans son équipe.

Je remercie tous nos collaborateurs en France et à l'international, en particulier les Docteurs Boris Chernyak, Eugene Sheval, Eric Oksenhendler, Chrystèle Bilhou-Nabera et Ruy Luzada, la collaboration avec vous était très constructive et enrichissante.

Je remercie l'association de spécialisation et d'orientation scientifique et l'Université Paris Sud d'avoir financé mes années de thèse. Aussi je tiens à remercier l'Université Libanaise, l'Institut Gustave Roussy de m'avoir acceptée parmi leurs doctorants. Aussi je remercie l'établissement français du sang-Hôpital Saint Louis, d'avoir facilité nos travaux.

Je remercie particulièrement le Docteur Joëlle Wiels pour m'avoir accueillie au sein de son unité de recherche, encouragée et aidée à plusieurs égards dans la réalisation de mon doctorat. Un très grand merci au Docteur Marc Lipinski pour ses nombreux conseils et ses suggestions constructives.

Des remerciements pour toute l'UMR 8126, unité de recherche riche en thématiques, en nationalités et en langues. C'est une vraie équipe dont je suis fière de faire partie. Leur capacité à s'extraire de la morosité n'est pas la moindre de leur qualités. Je remercie particulièrement chaque

personne de l'équipe « Organisation nucléaire et modèles pathologiques », plus particulièrement Diego qui était disponible pour moi dès que j'avais besoin de lui.

Un remerciement très particulier aux filles libanaises Carla et Yara, elles étaient pour moi des vraies amies, grâce à leur présence à côté de moi j'ai senti que suis au sein de ma famille. Un grand merci pour Carla pour être présente et à l'écoute de mes problèmes surtout personnels, pour l'amitié sacrée qu'on a développée durant une courte durée que je souhaite qu'elle reste toute la vie.

Je voudrais remercier particulièrement Muriel Fuchs pour tous les problèmes résolus grâce à elle, et Brigitte Cyrille pour sa patience et son professionnalisme.

La chance qui est la mienne d'avoir rencontré des amis libanais, qui étaient pour moi des sœurs et des frères : Lama, Mira, Hanna, Hussein, Walaa, Miled, Tracy, Suzane, Alya, Rawan M. et Aya, ... quelle chance d'être si bien entourée!

Un grand merci à ma meilleure amie d'enfance Nancy pour n'avoir jamais cessé de croire en moi. Nos aventures ensemble, nos sourires, nos points communs.

Et Finalement, pour mes parents, les mots s'arrêtent devant leurs sacrifices, vous êtes ma source infinie de joie, d'amour et d'encouragement. Mon bonheur c'est de vous rendre fiers. Merci pour ces longues années de soutien inconditionnel, pour votre confiance permanente. Vous m'avez offert la possibilité de réaliser mon rêve. Vous avez toujours fait preuve de la plus grande des patiences et de la plus grande des compréhensions. Malgré toutes les difficultés qu'ont pu représenter ces longues années d'études, ils m'ont toujours facilité ce parcours, au prix de nombreux efforts. Il me sera impossible de rendre tout ce qui m'a été offert. Rien n'aurait été possible sans vous, cette réussite est donc un peu la mienne, mais surtout beaucoup la vôtre. Merci pour mes sœurs Maysoun, Manal, Rihab et mon frère Ahmad de m'avoir aidée, cru en moi et toujours poussée vers le mieux, par leur soutien, leurs sacrifices, leurs prières... La vie est belle parmi vous. Je vous aime.

Pour finir, merci de tout mon cœur à mon fiancé, Mohammad. Les mots ne suffiront jamais pour exprimer tout ce que j'ai envie de te dire...Ton aide en ce moment si particulier de ma vie est un véritable cadeau. Mon cœur t'en est profondément reconnaissant. Notre amour nous offre l'éternité.

*A mes parents, mes anges gardiens qui me protègent, qui connaissent toutes les recettes qui nourrissent, qui réparent les cœurs cassés et qui font que demain tout sera possible. A eux qui éclairent toutes mes nuits sombres, qui m'ont remis le flambeau d'apprendre, qui ont planté mon chemin de joie et d'ambition ...*

*A mon frère, mes sœurs, mon fiancé et mes nièces  
qui sont la source de courage et de support pour moi...*

*Je vous dédie ma thèse,*

*Que DIEU vous protège.*

*« Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre »*

*Marie Curie*

*Patience ... passe science*

## Avant-propos

Les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) possèdent un système immunitaire affaibli, suite à la chute du nombre des lymphocytes T CD4+ infectés par le virus, aboutissant au développement de différents types d'infections et de malignités. Les individus séropositifs développent différents types des lymphomes surtout des lymphomes B, bien que le VIH n'infecte pas les cellules B. L'introduction de la thérapie antirétrovirale combinée (cART) a amélioré la survie des patients infectés, en reconstituant leur système immunitaire. Malgré la réponse positive des patients à la cART, l'incidence de certains lymphomes B reste élevée chez les personnes séropositives. En plus, il a été montré que les patients du VIH possèdent un niveau important du stress oxydant dont plusieurs mécanismes ont été révélés dans les cellules infectées mais pas dans les cellules B des patients. L'association du VIH-1 à l'oncogenèse dans les cellules non infectées et le développement des lymphomes B chez les patients du VIH, a été le sujet de plusieurs recherches extensives, mais les mécanismes par lesquels le VIH contribue à leur développement restent inconnus et énigmatiques. Le travail de thèse qui m'a été confié s'inscrit dans cette optique. En effet, mes objectifs de thèse se sont construits autour de plusieurs grandes thématiques que sont les lymphomes B, le stress oxydant, les dommages de l'ADN, les aberrations chromosomiques, le VIH et ses protéines virales et les extraits des plantes à effets antioxydants. L'ensemble de ces notions est abordé dans l'introduction ci-après. Mon travail s'est articulé autour de trois volets distincts. Dans un premier temps, il a concerné, le mécanisme d'action de la protéine virale transactivatrice de la transcription du VIH-1 (Tat) dans l'induction des dommages oxydants causés à l'ADN et l'instabilité génomique dans les cellules B humaines, et il est exposé dans la première partie des résultats (Résultats I). Le deuxième volet de ma thèse porte sur l'extraction des molécules antioxydantes à partir des plantes endémiques du Liban, ainsi que l'étude de leur effet antioxydant *in-vitro* et sur les cellules B humaines, ces résultats sont développés dans la partie Résultats II. Le troisième volet concerne le travail auquel j'y ai participé, il porte sur le mécanisme d'action de la protéine Tat du VIH-1 favorisant le développement du lymphome de Burkitt dans les cellules B et il est exposé dans la troisième partie des résultats (Annexe).



# Sommaire

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>13</b>
<b><i>INTRODUCTION</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>1. Cancer et lymphomes.....</b>	<b>21</b>
<i>1.1. Définition de cancer</i> .....	21
1.1.1. Facteurs de risque .....	21
1.1.2. Types de cancer .....	21
<i>1.2. Lymphomes</i> .....	22
1.2.1. Types de lymphome .....	22
1.2.2. Lymphomes B .....	22
1.2.2.1. Définition .....	22
1.2.2.2. Lymphome de Burkitt .....	23
1.2.2.2.1. Définition.....	23
1.2.2.2.2. Profil génétique du lymphome de Burkitt.....	24
1.2.2.3. Lymphome diffus à grandes cellules B (LDGCB) ou (DLBCL) .....	24
1.2.3. Les cellules B entre l'état physiologique et la lymphomagenèse .....	25
<b>2. Dommages à l'ADN et instabilité génomique .....</b>	<b>26</b>
<i>2.1. Types des dommages de l'ADN</i> .....	26
<i>2.2. Sources des dommages de l'ADN</i> .....	27
<i>2.3. Réponse aux dommages de l'ADN</i> .....	28
<i>2.4. Dommages à l'ADN, instabilité génomique et cancer</i> .....	30
<b>3. Homéostasie redox cellulaire et stress oxydant .....</b>	<b>31</b>
<i>3.1. Espèces réactives de l'oxygène, ROS</i> .....	32
3.1.1. Chimie des ROS .....	32
3.1.2. Sources des ROS .....	33
<i>3.2. Equilibre redox et la défense antioxydante</i> .....	35

3.2.1. Antioxydants endogènes.....	36
3.2.1.1. Non enzymatiques.....	36
3.2.1.2. Enzymatiques.....	39
3.2.2. Antioxydants exogènes.....	40
3.3. <i>Stress oxydant</i> .....	44
3.3.1. Définition du stress oxydant.....	44
3.3.2. Effets physiologiques et pathologiques des ROS.....	45
3.3.2.1. Effets physiologiques des ROS.....	45
3.3.2.2. Effets pathologiques des espèces réactives.....	46
3.3.3. Le facteur nucléaire kappa B (NF-κB).....	48
3.3.3.1. Définition du NF-κB et de sa voie d'activation.....	48
3.3.3.2. NF-κB et le stress oxydant.....	51
3.3.3.3. L'activité oncogénique du NF-κB.....	53
3.4. <i>Les ROS, la déficience en antioxydant et les dommages oxydants causés à l'ADN dans l'oncogenèse</i> .....	54
<b>4. Virus oncogénique.....</b>	<b>56</b>
4.1. <i>Virus de l'immunodéficience humain VIH</i> .....	57
4.1.1. Description du VIH-1.....	57
4.1.1.1. Structure du VIH-1.....	57
4.1.1.2. Voies de contamination par le VIH-1 et ses cellules cibles.....	57
4.1.1.3. Cycle biologique et génome viral du VIH-1.....	58
4.1.2. Les pathologies liées au VIH.....	59
4.1.2.1. Physiopathologie de l'infection par le VIH-1.....	59
4.1.2.2. VIH-1 et la lymphomagenèse.....	60
4.1.3. Protéine transactivatrice de la transcription (Tat).....	62
4.1.3.1. Gène et structure de la protéine Tat-VIH-1.....	62
4.1.3.2. Fonctions de la protéine Tat.....	63
4.1.3.2.1. Tat : facteur de transcription des gènes viraux et cellulaires.....	64
4.1.3.2.2. Tat : modulateur de système immunitaire.....	65
4.1.3.2.3. Tat : régulateur de l'apoptose.....	65
4.1.3.2.4. VIH-1, Tat et le stress oxydant.....	65

4.1.3.2.5. Tat et NF- $\kappa$ B .....	68
4.1.3.2.6. Tat et les aberrations chromosomiques .....	69
4.1.3.2.7. Tat et oncogénèse.....	69
<b>HYPOTHESES ET OBJECTIFS.....</b>	<b>71</b>
<b>MATERIELS &amp; METHODES .....</b>	<b>75</b>
<b>1. Modèles cellulaires .....</b>	<b>77</b>
1.1. Isolation des lymphocytes B du sang des donneurs sains .....	77
1.1.1. Isolation des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) par gradient du Pancoll .....	77
1.1.2. Purification des lymphocytes B .....	77
1.2. Isolation des lymphocytes B du sang des patients du VIH.....	78
1.3. Culture des lignées cellulaires lymphoblastoïdes RPMI 8866 .....	79
<b>2. Préparation et extraction des plantes du Liban .....</b>	<b>79</b>
2.1. Préparation des extraits bruts (Extraction par macération) .....	79
2.2. Préparation des fractions à partir des extraits bruts par décantation .....	80
<b>3. Traitement .....</b>	<b>82</b>
3.1. Traitement des lymphocytes B normaux par la protéine transactivatrice de la transcription Tat et par sa forme mutante TatC22 .....	82
3.2. Traitement des lymphocytes B normaux par Tempol, N-acétylcystéine (NAC) et Bay 11-7082.....	82
3.3. Traitement des lymphocytes B normaux par Roténone, Plastoquinonyl-decyl-triphenylphosphonium Bromide (SkQ1), Dinitrophénol (DNP) .....	82
3.4. Traitement des lymphocytes B normaux par les extraits bruts du VC et de l'EM .....	83
<b>4. Test de détection des ROS et des radicaux libres et de potentiel antioxydant.....</b>	<b>83</b>
4.1. Détection des anions superoxydes totaux par marquage au Dihydroéthidium (DHE) dans les cellules B fixées .....	83
4.2. Détection des anions superoxydes mitochondriaux par MitoSOX Red dans les cellules B vivantes..	85

4.3. Production de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : dosage de peroxydase/peroxyde d'hydrogène par Amplex Red dans les cellules B vivantes .....	85
4.4. Etude de l'effet antioxydant des extraits des plantes par le test au DPPH' .....	86
<b>5. Test de détection des dommages de l'ADN dans les cellules B.....</b>	<b>88</b>
5.1. Test des comètes en condition alcaline et quantification des dommages de l'ADN .....	88
5.2. Immunofluorescence des sites de $\gamma$ H2AX.....	90
<b>6. Détection de l'activation de NF-<math>\kappa</math>B dans les cellules B .....</b>	<b>91</b>
6.1. Immunofluorescence .....	91
6.2. Western blot .....	91
<b>7. Détermination de la concentration de Tat par Dot blot.....</b>	<b>92</b>
<b>8. Cytométrie en flux FACS .....</b>	<b>93</b>
8.1. Détection de la pureté des lymphocytes B .....	93
8.2. Détection de l'apoptose dans les lymphocytes B .....	93
8.3. Détection des taux du Glutathionne (GSH) intracellulaire .....	94
<b>9. Détection de taux du GSH total intracellulaire et du rapport GSH/GSSG .....</b>	<b>95</b>
<b>10. Extraction d'ARN, Transcription inverse et Réaction en chaîne par polymérase quantitative (RT-qPCR).....</b>	<b>96</b>
<b>11. Préparation des étalements chromosomiques et caryotype.....</b>	<b>97</b>
<b>12. Acquisition et analyse des images microscopiques .....</b>	<b>98</b>
<b>13. Analyses statistiques.....</b>	<b>98</b>
<b>RESULTATS I.....</b>	<b>99</b>
<b>1. La protéine Tat du VIH-1 induit des dommages de l'ADN dans les lymphocytes B du sang périphérique humain via la production des ROS mitochondriales.....</b>	<b>101</b>

1.1. Détection de l'apoptose dans les cellules B .....	139
<b>CONCLUSION I</b> .....	<b>141</b>
<b>RESULTATS II</b> .....	<b>145</b>
<b>2. Etude de l'effet antioxydant des extraits de plantes et leur effet sur le stress oxydant et les dommages oxydants causés à l'ADN, induits par la protéine Tat du VIH-1 dans les cellules B humaines..</b>	<b>147</b>
2.1. Préparation des extraits des plantes .....	147
2.2. Etude du pouvoir antioxydant des extraits bruts et de leur fractions .....	147
2.3. Cytotoxicité des extraits bruts sur les cellules B.....	149
2.4. Effet antioxydant des extraits bruts sur les cellules B traitées par Tat.....	150
2.5. Etude de l'effet antioxydant des extraits bruts des plantes sur les dommages oxydants causés à l'ADN induits par Tat dans les cellules B. ....	152
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>159</b>
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>169</b>
<b>ANNEXE</b> .....	<b>173</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>187</b>



## Liste des abréviations

Abréviations	Signification
8-OHG	8-hydroxyguanine
ABC-DLBCL	« Activated B-cell diffuse large B cell lymphoma »
AcOEt	Acétate d'éthyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADN-PK	Protéine kinase dépendants de l'ADN
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATM	« Ataxia-telangiectasia mutated »
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	ATM et Rad3 liés
Av. J.-C	Avant Jésus Christ
BCL2	Protéine anti-apoptotique, lymphome à cellules B2
BCR	Récepteur des cellules B « B cell receptor »
BER	Système d'excision de base « Base excision repair »
BSA	Albumine de sérum bovin « Bovine Serum Albumin »
CaCl <sub>2</sub>	Dichlorure de Calcium
cART	Thérapies antirétrovirales combinées
CAT	Catalase
CCR5	C-C chimiokine type 5
CD	Cluster de différenciation
CDB	Cassures double brin de l'ADN
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Dichlorométhane
CE 50	Concentration effectrice 50
<i>MYC</i>	Proto-oncogène
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone « Carbon Dioxide »
Cu/Zn-SOD	Cuivre/Zinc-Superoxyde dismutase
CXCR-4	C-X-C récepteur des chimiokines de type 4
Cys	Cystéine
DAPI	4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride
DA	Dommages de l'ADN
dH <sub>2</sub> O	Eau distillée
DHE	Dihydroéthidium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNP	Dinitrophénol
DPPH'	2,2-diphényl-1-picrylhydrazine
DTT	Dithiothréitol
Duox	Dual oxydase

EBV	Virus d'Epstein Barr « Epstein Barr Virus »
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétra-acétique acide édétique
ELISA Assay	Dosage immuno-enzymatique ou « Enzyme-Linked Immunosorbent Assay »
EM	<i>Euphorbia macroclada</i>
EtOH	Éthanol absolu
F	Sens « Forward »
FADH2	Flavine adénine dinucléotide
FBS	Sérum de veau fœtal « Fetal bovine serum »
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
GAPDH	Glyceraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase
GCB-DLBCL	« Germinal center B-cell diffuse large B cell lymphoma »
γGCL	gamma-glutamyl-cystéine ligase
γGCS	gamma-glutamyl-cystéine synthétase
Glu	Glutamate
Gly	Glycine
Gp	Glycoprotéine
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GS	GSH synthétase
GSH	Glutathion
GSSG	Forme oxydée du glutathion
GST	Glutathion-S-transférase
GSTPi	Glutathion S-transférase P1
H2AX	Histone H2A Variant X
H <sub>2</sub> O	Molécules d'eau
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HAART	Traitement antirétroviral hautement actif
HO·	Radical hydroxyle
HPV	Virus du papillome humain « Human Papilloma Virus »
HRP	Peroxydase de raifort « Horseradish Peroxidase »
HTLV-1	Virus T-lymphotropique humain
IFNα	Interféron alpha
IGH	Chaîne lourde de l'immunoglobuline « Immunoglobulin heavy chain »
IκB	Protéines inhibitrices kappa B
IκBα	Protéines inhibitrices kappa B alpha
IKKα	Inhibiteurs des protéines kappa-B kinase alpha
IKKβ	Inhibiteurs des protéines kappa-B kinase beta
IKKγ	Inhibiteurs des protéines kappa-B kinase gamma
IL-1	Interleukine-1
IL-10	Interleukine-10
IL-6	Interleukine-6

JENH	Jonction des extrémités non homologues
KCl	Chlorure de Potassium
kDa	Kilo Dalton
LB	Lymphome de Burkitt
LCL	Lignées cellulaires lymphoblastoïdes
LDGCB	Lymphome diffus à grandes cellules B
LH	Lymphome Hodgkinien
LMC	Leucémie myéloïde chronique
LNH	Lymphome non-Hodgkinien
MAP kinases	Protéines kinases activées par des mitogènes
MCIB	Monochloromobimane
MDA	Malondialdéhyde
MgCl <sub>2</sub>	Dichlorure de Magnésium
MgOAc	Acétate de Magnésium
MMR	Système de réparation des mésappariements « MisMatch Repair »
Mn-SOD	Manganèse- Superoxyde dismutase
NAC	N-acétyle cystéine
NaCl	Chlorure de Sodium
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonate de Sodium
NaOH	Hydroxyde de Sodium
NAPDH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NEMO	Modulateur essentiel de NF-κB « NF-κB Essential Modulator »
NER	Réparation d'excision nucléotidique « Nucleotide excision repair »
NF-κB	Facteur de transcription nucléaire kappa B
NK	« Natural killers »
NLS	Séquence de localisation nucléaire
NO•	Oxyde nitrique
Nrf2	« Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 »
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical superoxyde
ONOO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Peroxynitrite
PBMC	Cellules mononucléaires du sang périphérique
PE	Polyéthylène
PFA	Paraformaldéhyde
Ph	Potentiel d'hydrogène « Potential of Hydrogen »
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIKK	Phosphoinositide-3-kinase
PKAc	Protéine Kinase Calcium dépendante
PMSF	Phénylméthylsulfonyl fluorure
PTP	Tyrosine phosphatases
R	Anti-sens « Reverse »
RDA	Réponses aux dommages de l'ADN

RH	Recombinaison homologue
RHD	Domaine d'homologie de régulation conservé « Rel homology domain »
RNS	Espèces réactives de l'azote
RONs	Espèces réactives oxygénées et azotées
ROS	Espèces réactives de l'oxygène « Reactive oxygen species »
RPMI	« Roswell Park Memorial Institute medium »
RT-qPCR	Réaction en chaîne par polymérase quantitative par transcription inverse
SA	Activité de piégeage ou « Scavenging activity »
Ser	Serine
-SH	Groupement sulfhydryle ou thiol
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience humaine
SkQ1	Plastoquinonyl-decyl-triphenylphosphonium Bromide
SMO	Spermine oxydase
SOD	Superoxyde dismutase
TAR	Eléments de réponse trans-activant « trans-activating response element »
Tat	Transactivatrice de la transcription
TCA	Acide trichloracétique
TLR	Récepteur de type Tolles « Toll-like »
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TNF- $\beta$	Facteur de nécrose tumorale bêta
VC	<i>Vicia canescens</i>
VIH-1	Virus de l'Immunodéficience Humaine 1
$\gamma$ H2AX	Variante d'histone gamma H2AX phosphorylé

## Liste des figures

- Figure 1.** Translocation t (8; 14) (q24; 32)
- Figure 2.** Les différents agents endogènes et exogènes induisant les différents types de lésions de l'ADN
- Figure 3.** Les voies de réparation des dommages de l'ADN
- Figure 4.** Réponse cellulaire aux cassures double brin de l'ADN
- Figure 5.** La réaction de réduction de dioxygène et la formation des métabolites réactifs
- Figure 6.** Production des ROS mitochondriales
- Figure 7.** ROS est produit par une réduction d'oxygène monovalent
- Figure 8.** Réactions de synthèse du Glutathion (GSH)
- Figure 9.** La réaction d'oxydo-réduction GSH/GSSG
- Figure 10.** Cycle de recyclage du Glutathion
- Figure 11.** La réaction de dismutation de l'anion superoxyde
- Figure 12.** L'implication du GST dans la réaction de S-glutathionylation
- Figure 13.** Un déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants, conduit à l'induction de stress oxydant
- Figure 14.** Réaction de l'oxydation du Guanine
- Figure 15.** Activation du NF- $\kappa$ B et sa translocation nucléaire
- Figure 16.** « Crosstalk » des ROS avec les voies d'activation du NF- $\kappa$ B. ROS peuvent agir directement ou indirectement dans la voie de signalisation du NF- $\kappa$ B d'une manière dépendante de type cellulaire
- Figure 17.** Organisation du génome viral du VIH-1
- Figure 18.** Organisation de la protéine Tat
- Figure 19.** La réaction de piégeage du DPPH' et sa conversion en DPPH par un composé antioxydant (RH)
- Figure 20.** Détection d'apoptose dans les cellules B traitées par Tat
- Figure 21.** Graphes représentant le pourcentage de l'activité de piégeage en fonction de la concentration des différentes fractions et extraits des plantes étudiées
- Figure 22.** L'effet des extraits bruts de VC et de l'EM sur la viabilité des cellules B en utilisant le test de bleu de trypan
- Figure 23.** La production des ROS dans les cellules B traitées par Tat seule ou en présence de 90  $\mu$ g/ml de chacun des extraits bruts des plantes (EM et VC), en comparaison avec le niveau basal dans les cellules B non traitées considérées comme contrôle négatif
- Figure 24.** Les extraits bruts des différentes plantes ont des effets antioxydants inhibant les dommages oxydants causés à l'ADN induits par Tat dans les cellules B

## Liste des tableaux

- Tableau 1.** Produits de génome viral du VIH-1 et les fonctions protéiques
- Tableau 2.** Principales caractéristiques physiopathologiques des huit individus infectés par le VIH testés dans notre étude
- Tableau 3.** Un tableau résumant les différents solvants organiques utilisés à partir des différentes parties des plantes choisies, ainsi que leurs masses, et le temps de macération
- Tableau 4.** Liste des amorces sens (F) et anti-sens (R) utilisées dans les expériences de RT-qPCR
- Tableau 5.** Tableau résumant les équations ainsi que les coefficients de régression, et les différentes CE  $\mu\text{g/ml}$  pour chaque extrait brut et les différentes fractions des plantes suivantes.

# *Introduction*



# **1. Cancer et lymphomes**

## **1.1. Définition de cancer**

Le mot cancer tire son origine du mot latin « karkinos » qui signifie « écrevisse ». Ce nom aurait été donné par Hippocrate (460-377 avant Jésus Christ), le premier qui a comparé le cancer à l'écrevisse par analogie à l'aspect des tumeurs avec cet animal lorsqu'elles s'étendent à la peau. Les premières preuves de cancer humain reviennent à plus de 4 millions d'années, il a été aussi observé chez les momies égyptiennes anciennes il y a 3000 ans (pour revues (Javier and Butel, 2008; Sudhakar, 2010)).

L'individu est constitué de plusieurs unités cellulaires morphologiquement individualisées, mais intégrées dans un ensemble pluricellulaire dynamique : l'organisme, qui est défini comme un réseau de cellules connectées par de nombreuses relations complexes et coordonnées avec leur environnement, tout en maintenant l'état stationnaire normal, dit état homéostatique. Le cancer résulte d'une perturbation de la communication cellulaire et se développe lorsque les cellules normales deviennent hors de contrôle, continuent à croître, à se diviser et à former de nouvelles cellules anormales.

C'est un trouble génétique impliquant des changements dynamiques dans le génome conduisant à une croissance cellulaire incontrôlée et à une capacité à envahir et à métastaser (Brookes and Lawley, 1960).

### **1.1.1. Facteurs de risque**

Le cancer est souvent le résultat d'un ensemble de facteurs susceptibles d'interagir entre eux pour que la tumeur se développe. Ces facteurs peuvent être internes ou externes. Les facteurs externes sont liés au mode de vie, dont le tabagisme et l'alimentation, et à l'environnement comme les rayonnements, les produits chimiques, les infections virales et bactériennes; parmi les facteurs internes, se cite le stress cellulaire et les réponses inflammatoires chroniques (pour revue (Brian et al., 2016)).

### **1.1.2. Types de cancer**

Le cancer peut être classé selon le type de la cellule et de l'organe desquels il provient. Environ 85 % des cancers sont des carcinomes (provenant de l'épithélium), 6 % des cancers sont des sarcomes (dérivés des tissus conjonctifs), 2,5 % sont des leucémies (cancer des cellules de la moelle osseuse), 2,5 % sont des lymphomes (provenant des cellules du système lymphatique) et les autres formes telle que la tumeur cérébrale constituent les autres 4 % du cancer (Jemal et al., 2011; Siegel et al., 2017).

## 1.2. Lymphomes

### 1.2.1. Types de lymphome

Les lymphomes sont des tumeurs malignes développées à partir du système lymphatique, c'est un type de cancer du sang qui se produit lorsque les lymphocytes B ou T commencent à se comporter anormalement. Le lymphome se développe dans un organe lymphoïde secondaire : ganglions lymphatiques, rate ou tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (pour revue (Küppers et al., 2014)).

Il existe deux types principaux de lymphomes :

- Les lymphomes Hodgkiniens (LH) : il existe six types de ce lymphome. Il est caractérisé par la présence d'une cellule tumorale bien spécifique : la cellule Reed-Sternberg (pour revue (Gobbi et al., 2013)).

- Les lymphomes non-Hodgkiniens (LNH) : il existe plus de 60 types de ce lymphome. Tout type de lymphome qui ne comporte pas des cellules Reed-Sternberg, est classifié comme lymphome non-Hodgkinien (pour revue (Ansell, 2015)).

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a identifié 80 types de lymphomes différents dont le type majeur à nos jours est le lymphome non-Hodgkinien, il est classé le cinquième cancer le plus fréquent dans le monde entier (Zhou et al., 2014a) et environ 95 % des lymphomes sont de lymphomes B (pour revue (Küppers, 2005)).

### 1.2.2. Lymphomes B

#### 1.2.2.1. Définition

Les lymphomes B représentent un groupe très hétérogène de proliférations malignes des lymphocytes B. L'anomalie cytogénétique classique commune pour de nombreux lymphomes B est la translocation chromosomique (Iarovaia et al., 2014; Nambiar and Raghavan, 2011).

En 1914, Théodore Boveri a émis l'hypothèse que les translocations chromosomiques pourraient être la cause majeure du cancer (Boveri, 2008; Manchester, 1995). A nos jours, les translocations sont classifiées parmi les signatures moléculaires pour de nombreux types de cancers et les causes principales, en particulier pour les lymphomes et les leucémies (pour revues (Lin et al., 2009; Mitelman et al., 2004; Tomlins et al., 2007)).

Dans les lymphomes, ces translocations chromosomiques impliquent souvent le locus du gène codant pour la chaîne lourde de l'immunoglobuline (IGH) porté sur le chromosome 14. C'est la fusion entre le locus du gène *IGH* avec le locus d'un autre gène codant pour une protéine ayant des capacités

pro-prolifératives ou anti-apoptotiques qui induit une transcription massive de cette dernière, entraînant ainsi des effets prolifératifs ou anti-apoptotiques excessifs dans les cellules B. Plus précisément, c'est une dérégulation des protéines cellulaires clés, en particulier celles codées par des proto-oncogènes et/ou des gènes suppresseurs de tumeur qui sont des régulateurs fonctionnels critiques de la cellule (Mitelman et al., 2004).

Différents types de translocations sont mis en évidence, certaines sont spécifiques et d'autres ne le sont pas. L'agressivité des lymphomes B augmente avec les translocations concernant surtout le proto-oncogène MYC et le gène codant pour la protéine anti-apoptotique lymphome à cellules B 2 (BCL2) (pour revue (Jaffe and Pittaluga, 2011)).

Parmi les lymphomes B les plus agressifs, on distingue le lymphome de Burkitt (LB) (extrêmement agressif) et le lymphome diffus à grandes cellules B (LDGCB) ou (DLBCL). Le DLBCL est le lymphome agressif le plus fréquent, il représente 30 % des lymphomes non-Hodgkiniens (pour revue (Sehn and Gascoyne, 2015)).

### **1.2.2.2. Lymphome de Burkitt**

#### **1.2.2.2.1. Définition**

Le lymphome de Burkitt (LB) est un lymphome de haut degré de malignité, il a été décrit par Denis Burkitt en 1958 (Burkitt, 1958). Le LB est une prolifération monoclonale des lymphocytes B et représente de 35 à 50 % des LNH chez les enfants et 2 % chez les adultes. Il existe trois grands types du lymphome de Burkitt selon la classification de l'OMS (pour revue (Brady et al., 2008)).

**La forme endémique** : répartie principalement en Afrique équatoriale et en Nouvelle Guinée dans des régions tropicales à un climat chaud et humide. Elle attaque les enfants de quatre à sept ans, les garçons étant les plus atteints. Cliniquement, elle se manifeste par des tumeurs de la mâchoire mais également par des tumeurs de la cavité abdominale. Elle est associée au virus de l'Epstein Barr (EBV).

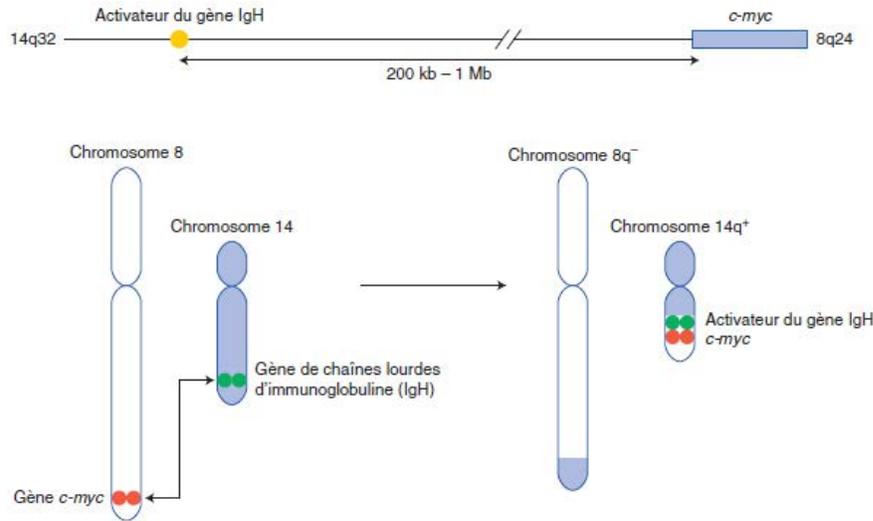
**La forme sporadique** : décrite en dehors de la région africaine, dans les pays occidentaux, elle est complètement indépendante des conditions climatiques et des zones géographiques, mais morphologiquement similaire au LB endémique, elle affecte principalement les viscères abdominaux. À la différence des cas observés en Afrique, ces lymphomes sont beaucoup plus rares (3 à 5 % des lymphomes de l'adulte) mais représentent néanmoins la forme de lymphome la plus fréquente chez l'enfant (40 à 50 %) (Blum et al., 2004).

**La forme associée au VIH-1** : survenant chez les patients infectés par le VIH-1.

### 1.2.2.2.2. Profil génétique du lymphome de Burkitt

Les différentes formes du LB sont caractérisées par la translocation impliquant le gène *MYC* (Taub et al., 1982) situé sur le chromosome 8. Le locus 8q24, qui contient le gène *MYC*, est impliqué dans une translocation avec le chromosome 14 [t (8; 14) (q24; q32)] dans 70 à 80 % des cas, le chromosome 22 [t (8; 22) (q24; q11)] dans 10 à 20 % des cas et le chromosome 2 [t (2; 8) (p12; q24)] dans 2 à 5 % des cas (Hummel et al., 2006).

La translocation majeure a pour conséquence de localiser le gène *MYC* (situé en 8q24) à proximité relative (200–700 kb) du gène codant pour la chaîne lourde des immunoglobulines (*IgH*) en 14q32 (**Figure 1**). La technique de l'hybridation *in-situ en fluorescence* et l'immuno-hybridation fluorescente *in-situ* (immuno-FISH) sont parmi les moyens de diagnostic moléculaire les plus courants.



**Figure 1. Translocation t (8; 14) (q24; 32).** Figure extraite de (Ribrag et al., 2012).

### 1.2.2.3. Lymphome diffus à grandes cellules B (LDGCB) ou (DLBCL)

Le lymphome diffus à grandes cellules B est classifié parmi les lymphomes agressifs et les plus fréquents. C'est une maladie hétérogène en terme de comportement clinique et biologique (pour revue (Schmidt-Hansen et al., 2017)), avec des caractéristiques moléculaires et pronostiques différentes, malgré le traitement uniforme des patients (Souto et al., 2013; Zhou et al., 2014b).

Le DLBCL se caractérise par plusieurs types de translocations impliquant le locus d'immunoglobuline, y compris t (8; 14), t (3; 14) et t (14; 18) (Iqbal et al., 2004; Kramer et al., 1998). Cependant, un pourcentage significatif de DLBCL manque d'anomalies génétiques spécifiques (Souto et

al., 2013; Vose, 1998). Les DLBCL présentant une surexpression de l'oncogène *MYC*, sont les plus agressifs et les plus résistants aux thérapies standards (Smith et al., 2010).

### **1.2.3. Les cellules B entre l'état physiologique et la lymphomagenèse**

L'hétérogénéité des lymphomes B pourrait être reflétée probablement par la complexité des processus physiologiques concernant les lymphocytes B normaux pendant leur développement et leur différenciation, depuis la cellule souche médullaire dans la moelle osseuse jusqu'à la formation des plasmocytes capables de produire des anticorps (pour revue (Küppers and Dalla-Favera, 2001)).

Les cellules B représentent environ 5 à 15 % des lymphocytes circulants et sont définies par la présence des immunoglobulines (Ig) à leur surface. Après leur activation, les lymphocytes B se transforment en plasmocytes qui sécrètent des immunoglobulines (anticorps). Les différentes chaînes lourdes déterminent les différents isotypes (classes des immunoglobulines) (pour revue (Pieper et al., 2013)).

La diversité et la spécificité des immunoglobulines nécessitent différents processus moléculaires impliqués dans le remodelage des gènes codant pour ces dernières. Ces processus sont basés sur des recombinaisons de segments des gènes codant pour les différentes chaînes de l'immunoglobuline. Des phénomènes de cassure simple et double brin causées à l'ADN sont nécessaires pour ces processus. Ces cassures pourraient induire les dommages non-spécifiques à l'ADN, en dehors de locus des gènes codant pour les immunoglobulines et ainsi produire des translocations chromosomiques dans les cellules B (Hakim et al., 2012; Wang et al., 2009) (pour revues (Nambiar and Raghavan, 2011; Nussenzweig and Nussenzweig, 2010)).

## **2. Dommages à l'ADN et instabilité génomique**

L'ADN est une molécule assez susceptible à de nombreux stress naturels, qu'ils soient endogènes ou exogènes, engendrant des mutations et des lésions chromosomiques au niveau de sa structure, définie en tant que dommages à l'ADN (DA).

### **2.1. Types des dommages de l'ADN**

Chaque cellule humaine est soumise à environ 70 000 différents types de lésions de l'ADN par jour, aboutissant à des modifications chimiques dans la molécule de l'ADN (Lindahl and Barnes, 2000). Parmi ces modifications, on note : les cassures simple et double brin de l'ADN, les liaisons inter- et intra-brins, les pontages ADN-protéines, les réarrangements, les substitutions, les délétions, les insertions, les adduits, les mésappariements et la formation de sites abasiques. Les sites abasiques sont formés par le manque d'une base de l'ADN, due à la déstabilisation de la liaison N-glycosidique entre la base et le squelette composé par le sucre et le phosphate, le squelette sucre-phosphate étant toujours intact. Dans le cas des bases puriques, le site abasique est généré par dépurination et dans le cas des bases pyrimidiques, par la dépyrimidination. Les bases peuvent également subir d'autres types de modifications telles que l'oxydation [par exemple 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG)] et la génération d'interruptions des brins de l'ADN, l'alkylation (habituellement par méthylation, telles que la formation de 7-méthylguanine, 1-méthyladénine, 6-O-méthylguanine), la réduction, l'halogénéation, la déprotonation et l'hydrolyse (telles que la désamination), etc. (Cadet and Davies, 2017; Cadet et al., 1999).

Parmi les mutations les plus fréquentes ce sont les mutations de transversion qui échangent un nucléotide purine contre une autre purine (A > G) ou un nucléotide pyrimidine contre une autre pyrimidine (C > T) (Alexandrov and Stratton, 2014).

L'addition du groupement hydroxyle HO<sup>•</sup> sur la double liaison en position C5 et C6 des bases pyrimidiques (cytosine, thymine) et en position C4 et C8 des bases puriques (adénine, guanine) est compté parmi les lésions principales de l'ADN. Il en résulte plusieurs possibilités de modifications de bases telles que la génération de composés instables qui se transforment spontanément en produits plus stables (pour revue (De Bont and van Larebeke, 2004)).

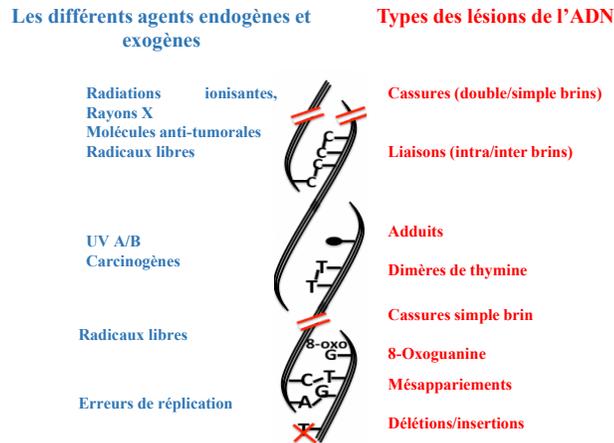
Parmi tous les types de dommages à l'ADN, les cassures double brin de l'ADN (CDB) posent le plus grand défi aux cellules et sont classifiés parmi les types les plus dangereux et les plus délétères (Podhorecka et al., 2011). La majorité des lésions (75 %) sont des cassures simple brin qui sont relativement peu efficace mais qui peuvent être converties en cassures double brin de l'ADN (pour revue (Tubbs and Nussenzweig, 2017)).

Les cassures simples brin sont dues soit à la rupture des liaisons phosphate-sucre suite à l'attaque d'un atome d'hydrogène de la molécule de 2-désoxyribose soit à la coupure de la chaîne de l'ADN causée par la perte d'un atome d'hydrogène du 2-désoxyribose.

Les cassures double brin correspondent à un endommagement simultané des deux brins complémentaires de la double hélice de l'ADN, dans des régions de l'ADN proches l'une de l'autre. La formation de telles lésions peut être expliquée par deux mécanismes. Le premier suppose l'action d'un seul HO<sup>\*</sup> sur le 2-désoxyribose avec transfert de l'hydroxyle sur le deuxième brin alors que le second implique l'attaque de l'ADN par plusieurs groupements hydroxyle dans des zones rapprochées (pour revue (Halazonetis et al., 2008)).

## **2.2. Sources des dommages de l'ADN**

Notre ADN est soumis à l'exposition de différents agents exogènes dans notre vie quotidienne, tels que les agents physiques comme les rayons X, la lumière ultraviolette (UV) et d'autres types de radiations, ainsi que divers produits chimiques, comme les polluants, les carcinogènes dans les aliments, même les agents chimio-thérapeutiques qui peuvent provoquer des changements génétiques. Il est également soumis à des agressions constantes à partir de sources endogènes au cours du métabolisme normal et des processus physiologiques (la réplication et la transcription de l'ADN, la ségrégation des chromosomes, les délétions et les translocations qui surviennent lors de la création du répertoire des récepteurs des lymphocytes T et B) (Podhorecka et al., 2011). L'ADN se trouve ainsi dans une ambiance de stress oxydant induite par les radicaux libres, des agents alkylants et des produits électrophiles générés à partir de réactions oxydatives et autres réactions intracellulaires; tous ces facteurs sont susceptibles d'engendrer des dommages à l'ADN (Dillon et al., 2010; Tanaka et al., 2007) (Figure 2).



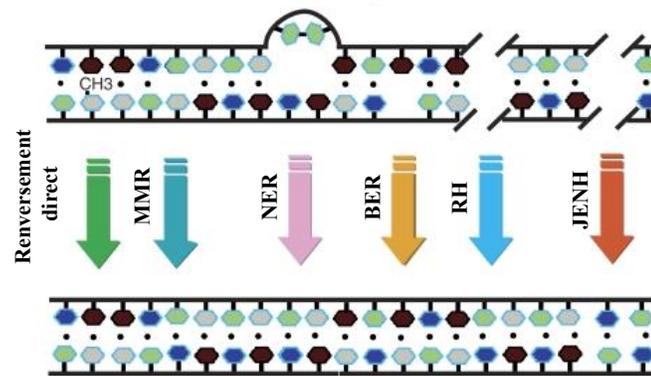
**Figure 2. Les différents agents endogènes et exogènes induisant les différents types de lésions de l'ADN.** Différents agents sont responsables des différents types des lésions. Par exemple, les radiations ionisantes, les rayons X, les radicaux libres et les molécules anti-tumorales aboutissent à la formation des cassures simple et double brin, ainsi à la création des liaisons intra et inter brins, les UV A/B et les carcinogènes peuvent aboutir aux adduits et à la formation des dimères de thymine, on trouve que les radicaux libres, peuvent engendrer des cassures simple brin et la formation de 8-oxoguanine et finalement les erreurs de la réplication pourraient aboutir à des mésappariements, des délétions et à des insertions.

### 2.3. Réponse aux dommages de l'ADN

La cellule possède plusieurs manières pour répondre aux dommages qui attaquent son ADN. De nombreux mécanismes de réponses aux dommages de l'ADN (RDA) dont le but est de réparer spécifiquement chaque type de lésions impliquant environ 700 protéines enzymatiques, ont été identifiés (pour revue (Friedberg, 2008)).

Parmi les voies de réparation de l'ADN, on peut citer la voie de réparation des bases modifiées : le système d'excision de base (BER); la voie de détection et de suppression des bases qui ne sont pas incorporées lors de la réplication de l'ADN : les réparations incompatibles, le mécanisme d'élimination des adduits volumineux dans l'ADN : réparation d'excision nucléotidique (NER); le système de réparation des mésappariements (MMR) « MisMatch Repair » qui prend en charge les mésappariements de bases, la recombinaison homologue (RH) et la jonction des extrémités non homologues (JENH) (pour revue (Tubbs and Nussenzweig, 2017)). Ces deux dernières sont impliquées dans la réparation des cassures double brin de l'ADN (CDB) dont 90 % sont réparées par la JENH dans les cellules mammifères (pour revue (Hakem, 2008)).

Au cours de la RH, les CDB sont réparées par des échanges de régions de l'ADN équivalentes entre des chromosomes homologues sœurs, tandis que durant la JENH, les extrémités sont reliées sans utilisation de modèles. De ce fait, la JENH laisse fréquemment des insertions ou des suppressions au niveau de son intervention et a tendance à engendrer des erreurs, alors que la réparation médiée par la RH est plus fidèle (**Figure 3**). Chacune des voies de réparation de l'ADN doit être coordonnée avec une série de réponses de signalisation qui arrêtent la division cellulaire ou déclenchent la mort cellulaire si les lésions sont irréparables (Haber, 2015).

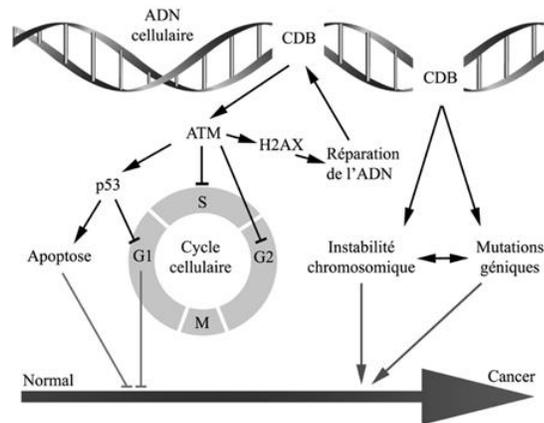


**Figure 3.** Les voies de réparation des dommages de l'ADN. Figure adaptée de (Hakem, 2008).

La formation des CDB déclenche l'activation de nombreux facteurs, y compris la phosphorylation de l'histone H2A variante X (H2AX) dans la position Serine 139 (Ser139), nommé  $\gamma$ H2AX, un marqueur principal des CDB. La phosphorylation de l'H2AX joue un rôle clé dans la RDA, elle est essentielle pour l'assemblage des protéines de réparation de l'ADN au niveau des sites endommagés ainsi que pour l'activation des protéines des points de contrôle « check points » qui arrêtent la progression du cycle cellulaire si cela est nécessaire (Podhorecka et al., 2011).

L'H2AX pourrait être phosphorylée par trois membres de la famille des kinases liées à la phosphoinositide-3-kinase (PIKK) : l'ataxia-telangiectasia muté (ATM), la protéine kinase dépendante de l'ADN (ADN-PK) et l'ATR (ATM et Rad3 liés) (pour revue (Falck et al., 2005)). La kinase ATM est considérée comme un médiateur physiologique majeur de la phosphorylation de l'H2AX en réponse aux CDB. L'ATM est activée par son autophosphorylation à la position Ser1981, ce qui conduit à la dissociation de ses dimères inactifs en molécules protéiques individuelles avec une activité kinase accrue (Shiloh, 2003, 2006). Un complexe tri-protéique appelé le complexe MRN composé de MRE11-RAD50-NBS1 (pour revue (Stracker and Petrini, 2011)) reconnaît les dommages de l'ADN, recrute

l'ATM aux sites endommagés et intervient dans le ciblage de l'ATM pour initier la phosphorylation des substrats de ce dernier (Stracker, 2017; Uziel et al., 2003). La cellule peut aussi répondre aux dommages de l'ADN via les points de contrôle du cycle cellulaire, selon l'importance de ces dommages. Si les dommages sont réparés la cellule continue à proliférer, si non, la cellule se dévie vers la mort cellulaire par apoptose. Dans les cas sévères, les dommages sont réparés d'une manière erronée favorisant ainsi la croissance d'une cellule cancéreuse (Giglia-Mari et al., 2011; Zhou and Elledge, 2000) (**Figure 4**).



**Figure 4. Réponse cellulaire aux cassures double brin de l'ADN.** Les cellules activent la voie de réponse aux dommages de l'ADN, avec le recrutement de l'ATM, une protéine sérine thréonine kinase aboutissant à l'arrêt du cycle cellulaire ou la mort cellulaire programmée (apoptose), réglées par le facteur de transcription p53, ou la mise en place des systèmes de réparation (phosphorylation de la variante d'histone H2AX). La réparation est cruciale pour le maintien de l'intégrité de génome : incorrectement réparée, les lésions de l'ADN peuvent engendrer une instabilité chromosomique (taux accru des aberrations des chromosomes) et l'accumulation des mutations géniques, moteurs fondamentaux dans la progression cancéreuse. Figure adaptée de (Nougayrede and Oswald, 2011).

## 2.4. Dommages à l'ADN, instabilité génomique et cancer

En 1960, Philip Lawley et Peter Brookes ont proposé une hypothèse selon laquelle les cellules anormales cancéreuses se développent majoritairement à cause des dommages de l'ADN (Brookes and Lawley, 1960). En tant que source de diversité génétique et de sélection naturelle, les mutations géniques et les dommages de l'ADN sont nécessaires pour l'évolution.

Chaque jour, des milliers de mutations capables d'endommager l'ADN peuvent avoir lieu. Ces mutations sont bien contrôlées et bien réparées dans le but de conserver l'équilibre, l'intégrité et la transmission de l'information génétique.

Un déséquilibre de l'homéostasie pourrait survenir suite à la perte de gènes de réparation de l'ADN (Loeb et al., 1974; Nowell, 1976) (pour revue (Lahtz and Pfeifer, 2011)), suite à une réparation erronée ou à l'inactivation, même partielle, d'une protéine impliquée dans la RDA (exemple, l'ATM) et/ou dans la maintenance de l'équilibre cellulaire (exemple, la p53 et les points de contrôle de cycle cellulaire) (Chae et al., 2016). Cela conduit à une instabilité génomique, considérée comme source majeure de la tumorigenèse (Jackson and Bartek, 2010; Negrini et al., 2010; Shen, 2011).

Cette instabilité génomique pourrait inclure, diverses formes de mutations quelques soient les dommages de l'ADN, surtout les CDB ayant lieu au niveau des gènes spécifiques aboutissant à l'activation des proto-oncogènes comme le *MYC* ou l'inhibition des suppresseurs de tumeurs comme Bim et p53 (pour revues (Halazonetis et al., 2008; Romero-Laorden and Castro, 2017)). Ainsi, les CDB sont considérées parmi les dommages les plus délétères pour les cellules et qui sont difficilement réparés (Khanna and Jackson, 2001). En outre, les modifications pourrait être des amplifications, des suppressions ou des réarrangements de segments chromosomiques (translocations chromosomiques) et des aberrations chromosomiques (Alexandrov and Stratton, 2014). Ces modifications peuvent également inclure celles qui touchent les bases, par exemple, des mutations de la base thymine en guanine (T> G) sont trouvées au niveau des gènes de l'immunoglobuline et sont considérées comme caractéristique dominante de la leucémie lymphocytaire chronique alors que dans le mélanome, la majorité des mutations remplacent la cytosine par la thymine (C> T) au niveau des résidus de pyrimidine adjacents (Alexandrov et al., 2013).

Les aberrations chromosomiques sont définies comme une anomalie chromosomique consistant en une altération d'un chromosome sur lequel un gène est absent ou au contraire surnuméraire (anomalie de structure), ou en une altération de caryotype (les anomalies de nombre) avec un chromosome entier absent (perte d'un chromosome) ou présent (gain d'un chromosome) (pour revue (Mitelman, 2000)).

L'accumulation de ces altérations génomiques pourrait être à la base de la cancérogenèse (pour revue (Tubbs and Nussenzweig, 2017)).

### **3. Homéostasie redox cellulaire et stress oxydant**

Notre organisme se trouve normalement dans un état d'homéostasie et d'équilibre de plusieurs phénomènes et mécanismes. Dans cette partie, on va aborder le sujet de l'homéostasie redox vis-à-vis du

stress oxydant. Pour parler de l'état redox cellulaire, il faut d'abord définir les espèces réactives de l'oxygène ou « Reactive oxygen species » (ROS) en anglais.

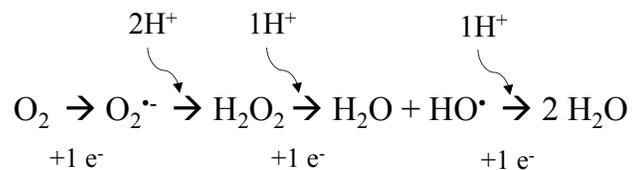
### 3.1. Espèces réactives de l'oxygène, ROS

#### 3.1.1. Chimie des ROS

Les ROS sont les produits d'une cascade de réactions d'oxydo-réduction de la molécule du dioxygène ( $O_2$ ). Ils résultent de la réduction partielle mono-électronique successive de l' $O_2$ , électron par électron.

L' $O_2$  est progressivement réduit en deux molécules d'eau ( $H_2O$ ) suite à une réaction d'oxydo-réduction mettant en jeu quatre électrons :  $O_2 + 4e^- + 4H^+ = 2 H_2O$ .

La configuration électronique du dioxygène montre qu'il est avide d'électrons, ce qui lui confère un caractère oxydant. Le dioxygène réagit en lui transférant un seul électron à la fois, ce qui conduit, par ordre de réduction, à la formation des différents types de ROS successivement : le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) par gain d'un électron, le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par gain de deux électrons et le radical hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ) par gain de trois électrons (Noori, 2012) (**Figure 5**).



**Figure 5.** La réaction de réduction de dioxygène et la formation des métabolites réactifs.

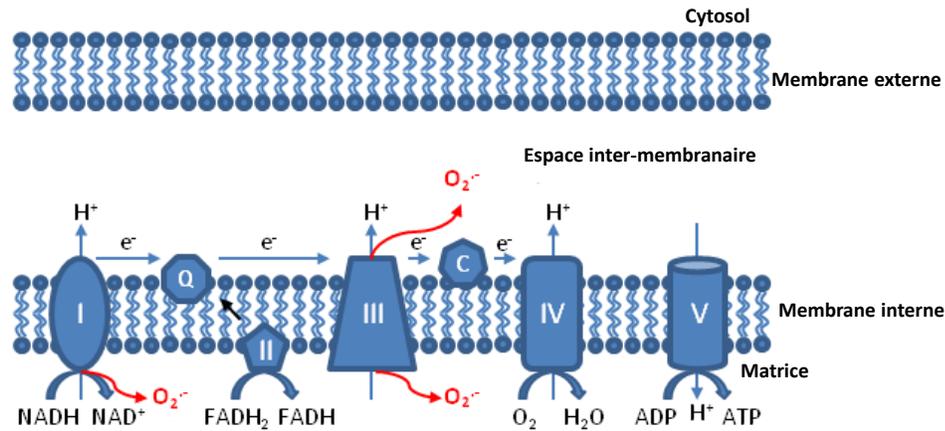
C'est une chaîne de réactions qui mène à la formation de nouvelles espèces qui sont groupées sous le nom d'espèces réactives de l'oxygène. Elles peuvent être radicalaires :  $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO^{\cdot}$ , peroxyde ( $RO_2^{\cdot}$ ) et alkoxyle ( $RO^{\cdot}$ ) ou non radicalaires comme l'acide hypochloreux ( $HClO$ ), l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (pour revue (Russell and Cotter, 2015)). En plus, il existe d'autres espèces que les ROS, les espèces réactives de l'azote (RNS) qui sont des molécules dérivées de l'oxyde nitrique ( $NO^{\cdot}$ ), ces dernières peuvent interagir avec l'anion superoxyde pour former les espèces réactives oxygénées et azotées (RONS), comme le peroxyde nitrite ( $ONOO^-$ ). Il existe divers produits azotés, tels que le nitroxyde ( $HNO$ ), le cation nitrosonium ( $NO^+$ ), les oxydes d'azote supérieurs, les S-nitrosothiols ( $RSNO$ ), etc. (Daiber et al., 2017; Fubini and Hubbard, 2003).

### 3.1.2. Sources des ROS

Il existe plusieurs sources des ROS, elles sont formées à partir de sources exogènes comme les rayons UV, les radiations ionisantes et les polluants ou à partir de sources endogènes.

La source endogène majeure de la production des ROS, dans la plupart des cellules mammifères, c'est les mitochondries (Andreyev et al., 2005) qui permettent la diffusion des ROS au cytosol, au noyau et aux différents organites. Il a été estimé qu'approximativement 90 % des ROS sont produites suite aux processus mitochondriaux, surtout pendant la respiration aérobie, dont les ROS sont générées en tant que sous-produits par la chaîne du transport des électrons située dans la membrane mitochondriale interne (Jensen, 1966; Muller, 2000; Murphy, 2009). Les mitochondries isolées produisent le  $H_2O_2$  (Chance et al., 1979), cet  $H_2O_2$  provient de la dismutation du superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) généré dans les mitochondries (Loschen et al., 1974).

Brièvement, les mitochondries sont les « centrales énergétiques » des cellules, où elles contribuent à la production de l'adénosine triphosphate cellulaire (ATP) en utilisant l'oxygène pour produire de l'énergie, cruciale pour les êtres vivants. Au cours de ce processus, le flux d'électrons passe à travers la chaîne respiratoire qui est constituée essentiellement de cinq grands complexes protéiques numérotés de I à V. La fuite d'un électron au cours de la réduction partielle de l' $O_2$  se rassemble finalement au niveau du complexe IV. Les sites majeurs de la production de l' $O_2^{\cdot-}$  sont les complexes I et III, ce dernier est formé lorsqu'un électron unique réduit partiellement l' $O_2$  (Murphy, 2009) (**Figure 6**).



**Figure 6. Production des ROS mitochondriales.** Les mitochondries ont une structure formée de quatre couches : la membrane mitochondriale externe, l'espace inter-membranaire, la membrane mitochondriale interne et la matrice. La génération des ROS se produit principalement au niveau de la chaîne du transport des électrons situé sur la membrane interne lors de processus de la phosphorylation oxydative, qui utilise de l'oxygène et des sucres simples pour créer de l'ATP. Il existe cinq complexes : complexe I (NADH déshydrogénase), complexe II (succinate déshydrogénase), complexe III (cytochrome c réductase), complexe IV (cytochrome c oxydase) et complexe V (ATP synthase). Les  $e^-$  fournis par le NADH au complexe I et de la flavine adénine dinucléotide (FADH<sub>2</sub>) au complexe II passent par la chaîne et réduisent l'O<sub>2</sub> en eau au niveau du complexe IV. Cependant, ce processus n'est pas parfait, dont la fuite d' $e^-$  dans le complexe I et le complexe III pourrait avoir lieu et conduire à une réduction partielle de l'oxygène pour former le superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Figure adaptée de (Li et al., 2013b).

D'une part la propriété électrophile de l'anion superoxyde et sa courte demi-vie rendent son mouvement à travers la membrane externe mitochondriale difficile, de l'autre part, l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> peut interagir avec une autre espèce réactive le NO<sup>•</sup> formant un oxydant puissant, le peroxynitrite (ONOO<sub>2</sub><sup>•-</sup>). En revanche, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est une molécule électrophobe et plus stable que l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et sa concentration dans les mitochondries est 100 fois supérieure à celle de l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Cadenas and Davies, 2000).

Les ROS peuvent être produites aussi sous forme d'une fonction primaire de certains complexes enzymatiques comme la famille des Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydases (NAPDH) phagocytaires (NOX). C'est un complexe enzymatique membranaire appartenant à la classe des oxydoréductases (enzymes de classe I). Cet enzyme catalyse la réaction d'oxydation du NADPH par le dioxygène (O<sub>2</sub>), ce qui produit du NADP<sup>+</sup>, du H<sup>+</sup> et de l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Ces deux derniers réagissent pour former le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Noori, 2012) (**Figure 7**).



*Figure 7. ROS est produit par une réduction d'oxygène monovalent.*

Ces enzymes produisent une grande quantité des ROS pour exécuter leur rôle dans la défense de l'hôte. La famille NOX se compose de sept isoformes, NOX de 1 à 5 et de la Dual oxydase (Duox) 1 et 2 (pour revue (Ameziane-El-Hassani et al., 2016)) (Ameziane-El-Hassani et al., 2015; Woolley et al., 2013).

Bien que les mitochondries et la famille de NOX sont les sources principales de la formation des ROS, il existe aussi d'autres enzymes qui peuvent produire ces molécules réactives comme les peroxysomes, les enzymes de cytochrome P-450, les lipoxgénases et les cyclooxygénases (pour revues (Lambeth, 2004; Russell and Cotter, 2015)). En addition, il existe d'autres sources non-enzymatiques de ROS, comme par exemple, l'infection virale ou bactérienne (pour revues (Dupré-Crochet et al., 2013; Paiva and Bozza, 2014)) et l'inflammation chronique (Torres et al., 2006).

En ce qui concerne les RNS, le NO<sup>•</sup> est l'espèce réactive azotée principale produite par les cellules, et la source principale de synthèse d'autres RNS. Il est produit par des réactions enzymatiques catalysées par la famille des enzymes les NO synthases (NOS) à partir de L-arginine et d'oxygène. La famille de NOS est constituée de trois isoformes, sont NOS 1 ou nNOS (pour neuronal), NOS 2 ou iNOS (pour inductible), et NOS 3 ou eNOS (pour endothélial). Bien que les isoformes NOS catalysent les mêmes réactions, elles diffèrent par leur expression, leur régulation et leurs rôles. Les deux nNOS et eNOS sont exprimées constitutivement, nNOS est exprimé principalement dans les neurones, et eNOS, dans les cellules endothéliales. De plus, les deux isoformes sont présentes dans d'autres types cellulaires, tels que les cellules musculaires lisses (Liu and Huang, 2008). En outre, eNOS constitutive est capable de produire de faibles niveaux de NO<sup>•</sup>, tandis que nNOS produisent des niveaux modérés de NO<sup>•</sup>. En revanche, lorsque l'expression de l'iNOS est induite, principalement dans les macrophages, dans des conditions pro-inflammatoires, de grandes quantités de NO<sup>•</sup> sont produites (pour revue (Martínez and Andriantsitohaina, 2009)).

### **3.2. Equilibre redox et la défense antioxydante**

Afin d'éviter l'accumulation intracellulaire des ROS et pour garder l'homéostasie cellulaire, un équilibre entre l'oxydation et l'anti-oxydation est essentiel pour maintenir les systèmes biologiques sains.

Pour cette raison, la cellule est équipée d'une variété de systèmes de défense cellulaire antioxydant endogènes, enzymatiques et non enzymatiques, qui entrent en jeu d'une façon bien coordonnée, pour conserver l'état équilibré. Ainsi, existe des sources des antioxydants exogènes et naturels.

Les molécules antioxydantes sont des molécules nucléophiles et réductrices capables de réagir avec des oxydants, qui sont généralement des électrophiles, en leur cédant un ou deux électrons, aboutissant à leur neutralisation.

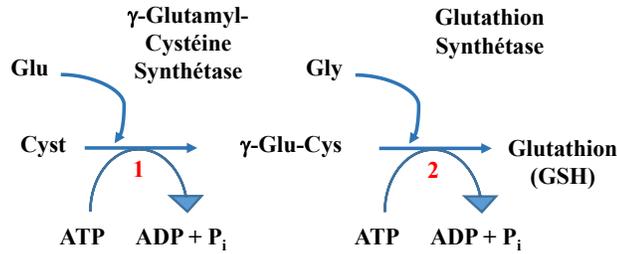
### **3.2.1. Antioxydants endogènes**

#### **3.2.1.1. Non enzymatiques**

Le glutathion (GSH) est un antioxydant endogène important, son importance est traduite par sa distribution dans toutes les cellules de l'organisme humain (Bachhawat et al., 2013). Les cellules des eucaryotes ont différents réservoirs du GSH, majoritairement dans le cytosol de 80 à 85 % et dans les mitochondries de 10 à 15 %. La concentration du GSH dépend fortement de l'organisme, du type cellulaire et des compartiments extracellulaire ou intracellulaire (Deponce, 2013, 2017). Par exemple, dans les hépatocytes humaines, la concentration du GSH est de 10 mM, tandis qu'elle est dans une gamme de micro-molaire dans les cellules épithéliales et dans le plasma humains (pour revue (Forman et al., 2009)). Ainsi, il a été montré que la concentration du GSH est de l'ordre de 7 à 8 mM dans un hybridome de souris et dans les cellules HeLa (Montero et al., 2013).

Le glutathion a été découvert en 1888 par J. de Rey-Pailhade, et c'est grâce à Alton Meister, que son métabolisme et sa synthèse ont été décrits (Griffith and Meister, 1985; Meister, 1988; Meister and Anderson, 1983). Le GSH (forme réduite), est un tri-peptide, formé de trois résidus ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine), son groupement sulfhydrile ou thiol (-SH) lui confère ses principales propriétés biochimiques.

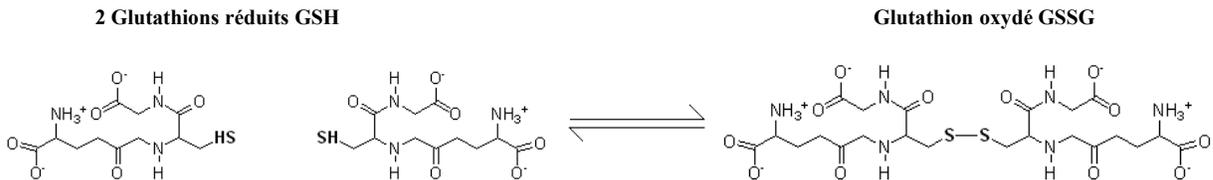
Le glutathion est synthétisé par deux réactions enzymatiques séquentielles dépendantes de l'ATP, à partir de ses acides aminés constitutifs. La première étape de la synthèse est catalysée par l'enzyme gamma-glutamyl-cystéine ligase ( $\gamma$ GCL) connu aussi sous le nom de gamma-glutamyl-cystéine synthétase ( $\gamma$ GCS), et la deuxième étape est médiée par le GSH synthétase (GS) (Meister and Anderson, 1983) (**Figure 8**).



**Figure 8. Réactions de synthèse du Glutathion (GSH).** Le glutathion est synthétisé par deux réactions séquentielles. **(1)** Tout d'abord, la Cystéine (Cys) est liée à l'acide glutamique ou Glutamate (Glu) par une réaction catalysée par  $\gamma$ -Glutamyl-Cystéine-Synthétase. **(2)** L'addition ultérieure du Glycine (Gly) par l'action du Glutathion synthétase et la formation des liaisons peptidiques, aboutissent à la formation du tri-peptide le Glutathion (GSH), tout en dépendant de l'ATP au cours de ces deux réactions enzymatiques.

Le  $\gamma$ GCL ou le  $\gamma$ GCS est un enzyme hétéro-dimérique composé d'une sous-unité lourde de 73 kDa, avec une activité catalytique et d'une autre sous-unité plus légère de 33 kDa, qui a un rôle régulateur (Lu, 2013). Le GS est composé de deux sous-unités identiques (~ 118 kDa). Il a été constaté que la surexpression du GS n'a pas un effet sur l'augmentation du niveau de GSH tandis que la surexpression du  $\gamma$ -GCS a un effet positif sur le niveau du GSH, dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* et dans les cellules endothéliales de l'artère pulmonaire bovine (Grant et al., 1997; Shi et al., 1994), et d'autres études ont montré qu'une répression de l'expression des gènes codants les deux sous-unités du  $\gamma$ -GCS aboutit à la diminution du niveau de GSH cellulaire (pour revue (Richter and Kietzmann, 2016)) (Ferguson and Bridge, 2016; Liu et al., 2012).

Le GSH forme un couple d'oxydo-réduction avec son partenaire la forme oxydée ou GSSG, un hexa-peptide lié par un pont disulfure (Kaplowitz et al., 1985), il permet les échanges d'électrons avec la conséquence que deux molécules du GSH donneuses d'électrons forment du GSSG oxydé (**Figure 9**). Le GSH réduit est la forme prédominante et il représente 98 % du GSH total (Forman et al., 2009).

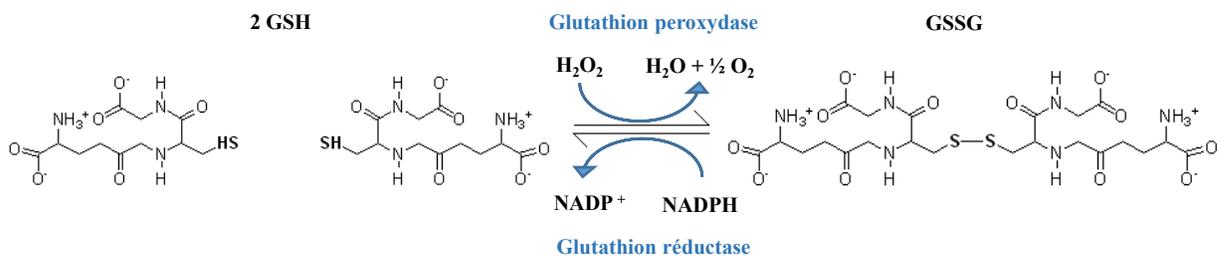


**Figure 9. La réaction d'oxydo-réduction GSH/GSSG.**

Le rapport GSH/GSSG est parmi les marqueurs principaux utilisés dans l'étude de l'état redox cellulaire. Une diminution de la forme réduite GSH est accompagnée le plus souvent par une augmentation de la forme oxydée GSSG ce qui en résulte une diminution du rapport GSH/GSSG. Plusieurs études ont établi un lien entre la diminution du rapport GSH/GSSG et le développement tumoral. Une étude sur le sérum sanguin des patients atteints de cancer pédiatrique, montre une diminution du rapport GSH/GSSG, d'une manière significative durant la croissance tumorale (Navarro et al., 1999; Zitka et al., 2012).

L'équilibre du couple GSH/GSSG dans la cellule n'est pas seulement régulé par la synthèse de novo du GSH, mais aussi par d'autres facteurs tels que sa consommation, son exportation cellulaire et son recyclage.

Le cycle de recyclage du GSH fait intervenir différents enzymes antioxydants importants, tel que le glutathion réductase (GR) et le glutathion peroxydase (GPx). Le GR est l'oxydoréductase critique pour la réduction du GSSG en deux GSH. En outre, le glutathion peroxydase (GPx 1-8) est une sélénoprotéine qui catalyse le métabolisme du  $H_2O_2$  en  $H_2O$ , en convertissant deux molécules du GSH en sa forme oxydée GSSG (**Figure 10**).



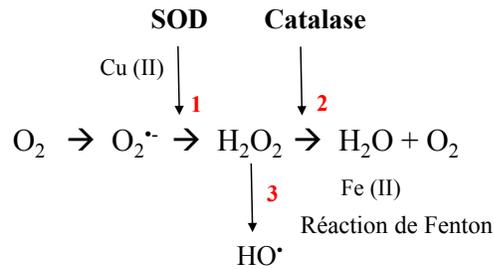
**Figure 10. Cycle de recyclage du Glutathion.**

Le GSH, agit comme une unité de stockage cellulaire majeure de la cystéine, ainsi il est connu par ses différents rôles dans de nombreux phénomènes biologiques importants, soit directement ou indirectement. C'est un cofacteur pour certaines activités enzymatiques, un coenzyme pour plusieurs réactions, un activateur des autres types des antioxydants, il intervient dans la synthèse des protéines, la réduction métabolique, la conjugaison des xénobiotiques, la croissance et la division cellulaire ainsi que l'apoptose (Franco et al., 2007; Liu et al., 2012).

### 3.2.1.2. Enzymatiques

Plusieurs enzymes antioxydants interagissent pour métaboliser les ROS. Parmi les premiers enzymes qui ont été découverts dans le métabolisme de ces espèces, il y a le superoxyde dismutase (SOD) (Mccord, 2016; McCord and Fridovich, 1969). Il existe plusieurs isoformes du SOD, et sont classifiées selon le type de cofacteur. Le Cu/Zn-SOD (qui se lie au cuivre et au zinc) est cytoplasmique et le Mn-SOD (qui se lie au manganèse) est mitochondrial.

Le SOD est responsable de la catalyse de la réaction de la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$  en  $O_2$  ou en  $H_2O_2$ . Cette réaction de dismutation est suivie par une autre réaction catalysée par le catalase (CAT), qui a pour rôle de catalyser la réaction de la dismutation du peroxyde d'hydrogène en une molécule d'eau et en oxygène moléculaire (Al-Dalaen, 2014) (**Figure 11**).

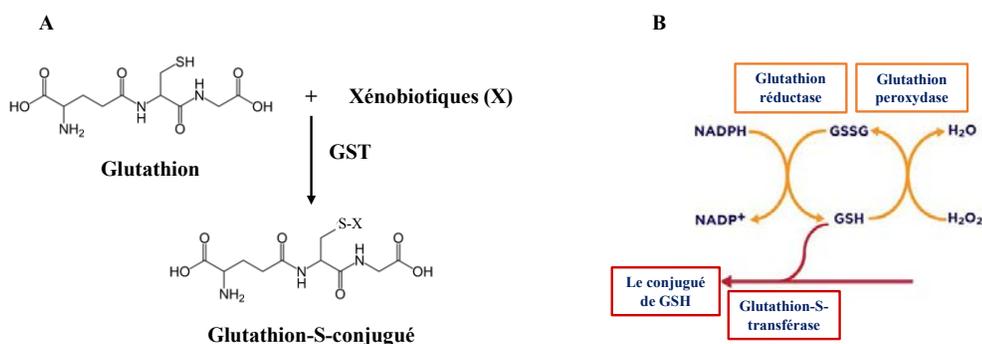


**Figure 11. La réaction de dismutation de l'anion superoxyde.** (1) La réaction de dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$  catalysée par l'isoforme cytosolique Cu-SOD. (2) La réaction de dismutation du peroxyde d'hydrogène en une molécule d'eau et en oxygène moléculaire, catalysée par l'enzyme catalase. (3) La réaction de Fenton c'est la réaction de l' $H_2O_2$  en radical hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ) par oxydation du fer ferreux (Fe II).

Plusieurs autres enzymes antioxydants sont impliqués dans la maintenance de l'homéostasie redox. Comme les enzymes intervenant dans le cycle de recyclage du GSH (GR et GPx), et ceux qui sont impliqués dans la S-glutathionylation.

La S-glutathionylation est un mécanisme cellulaire utilisé pour prévenir le déséquilibre redox, catalysé par les isoformes de la famille des enzymes glutathion-S-transférase (GST), c'est une modification post-traductionnelle présente dans les deux cas physiologique ou de déséquilibre cellulaire, elle est définie par l'addition du groupement GS- à partir du GSH sur le résidu Cys dans les protéines, dont elle peut moduler les fonctions protéiques, en dépendant de l'importance du résidu Cystéine dans les fonctions protéiques (pour revues (Dalle-Donne et al., 2007; Tew et al., 2015)).

Le glutathion S-transférase (ou GST) est une famille des transférases, possédant 22 membres chez les espèces humaines. Le glutathion S-transférase P1 (GSTP1) est un membre de cette famille et il est exprimé d'une façon ubiquitaire dans les cellules et les tissus humains, dont plusieurs études ont montré son importance dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, ainsi que dans la prévention contre certains types de cancer (pour revues (Tew et al., 2011; Townsend and Tew, 2003)) (Li et al., 2013a; Schroer et al., 2011) (**Figure 12**).



**Figure 12. L'implication du GST dans la réaction de S-glutathionylation. (A)** La réaction de la conjugaison du -GS sur les xénobiotiques à partir du GSH catalysée par GST. **(B)** Le cycle de recyclage du GSH ainsi que sa participation dans la réaction de S-glutathionylation catalysée par GST.

### 3.2.2. Antioxydants exogènes

Les principales sources d'antioxydants exogènes sont les sources naturelles à partir des aliments soit d'origine animale, ou d'origine végétale.

Les plantes sont riches en molécules antioxydantes, qui sont localisées dans leurs différentes parties (racines, tiges, écorces, feuilles, fruits et graines) et synthétisées suite au métabolisme secondaire.

Il existe deux types de métabolisme chez les plantes : primaires et secondaires. Les produits de métabolisme primaire sont indispensables à la nutrition, la croissance, le développement et ils rassemblent les acides aminés, les lipides, les sucres et les acides nucléiques. Tandis que les métabolites secondaires sont des molécules qui, par exclusion, n'appartiennent pas au métabolisme primaire, mais peuvent dériver des métabolites primaires.

Les métabolites secondaires sont historiquement plus spécifiques aux plantes, et on les retrouve dans des compartiments végétaux particuliers et à des moments précis de la vie (pour revue (Hadacek et

al., 2011)). À ce jour, entre 100 000 et 200 000 métabolites secondaires ont été identifiés et on estime que chaque végétal produit au moins une centaine de molécules différentes (Hadacek, 2002; Hartmann, 2007). Ils participent à la vie de relation de la plante (ou de leur organisme hôte), et ils ont des rôles très variés. Ils peuvent servir de défense (sécrétions amères ou toxiques pour les prédateurs) ou au contraire, attirer certaines espèces ayant des rôles bénéfiques (pollinisateurs). Ils peuvent également permettre la communication entre les plantes, par des messages d'alerte par exemple, ou faire partie de la structure de la plante (pour la revue (Demain and Fang, 2000)).

On distingue classiquement trois grandes catégories de métabolites secondaires chez les végétaux :

- Les alcaloïdes et les composés azotés : bétalaïne, hétérosides cyanogènes et glucosinolates,
- Les composés phénoliques : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les lignines, les stilbènes et les tanins,
- Les composés terpéniques : hémiterpènes (C5), monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), triterpènes (C30), tétraterpènes (C40) et polyterpènes (+ que C40).

Il a été estimé que les deux tiers des espèces végétales du monde possèdent des métabolites secondaires avec un potentiel antioxydant (pour revue (Krishnaiah et al., 2011)).

Les plantes synthétisent les antioxydants pour deux raisons principales. Tout d'abord, pour remplir leurs fonctions physiologiques normales et/ou se protéger des agents pathogènes microbiens et des herbivores animaux, ainsi qu'en réponse aux conditions de stress environnemental, biotiques et abiotiques, qui aboutissent à un état de stress oxydant par la production excessive des ROS, les plantes augmentent la synthèse de ces composés phytochimiques réducteurs et l'accumulation de plusieurs antioxydants non enzymatiques de faible poids moléculaire (vitamine C, vitamine E, acides phénoliques, etc.) et des métabolites secondaires de haut poids moléculaire, ainsi que des antioxydants enzymatiques (Kasote et al., 2015) (pour revue (Bouayed and Bohn, 2010)).

Près de 20 % des espèces végétales accumulent des alcaloïdes (Ziegler and Facchini, 2008). Les monoterpènes, les sesquiterpènes et les diterpènes se sont révélés posséder une activité antioxydante puissante dans différents essais *in-vitro* (Baratta et al., 1998), mais les antioxydants phénoliques comme les flavonoïdes semblent être les plus importants puisqu'ils ont montré des activités antioxydants potentiels *in-vivo* et *in-vitro*, ils possèdent généralement un ou plusieurs cycles aromatiques avec un ou plusieurs groupes hydroxyles, l'augmentation du nombre des groupements hydroxyles leur confère leur capacité antioxydante (Agati et al., 2012; Rice-Evans et al., 1997).

Vue la quantité, la diversité, l'importance des molécules caractérisées et leur effets antioxydants puissants, s'est rapidement posée la question de leur rôle biologique. Des recherches extensives ont été menées pour établir et comprendre le lien entre les métabolites secondaires et leurs effets au niveau de l'organisme humain.

Néanmoins, l'utilisation des plantes n'est pas une nouvelle investigation. Depuis des temps immémoriaux, l'humanité a recherché des médicaments à bases des plantes (Craig, 1999). Des preuves existent pour l'utilisation des plantes médicinales il y a plus de 60 000 ans, et plus récemment, une dalle d'argile sumérienne datant de plus de 5000 ans, a été découverte pour vérifier l'utilisation des plantes médicinales pour la préparation des médicaments (nommée par la phytothérapie). De nos jours, il a été estimé que plus de 50 % des médicaments disponibles proviennent en quelque sorte des plantes (Abruzzo, 2005).

Beaucoup de recherches ont été menées pour étudier l'effet antioxydant des différents métabolites secondaires extraits des plantes et leurs importances dans la prévention de diverses maladies humaines.

De nombreux polyphénols naturels ont été classifiés comme des composés bioactifs anticancéreux très prometteurs grâce à leurs activités antioxydantes bien connues, en ciblant les processus épigénétiques impliqués dans le développement de cancer par la modulation de stress oxydant et de l'état redox cellulaire (Narayan and Kumar, 2014). Beaucoup d'études ont montré le rôle antioxydant des flavonoïdes (Pandey and Rizvi, 2009; Prasad et al., 2010a), par exemple, une étude sur la lignée cellulaire de leucémie humaine HL-60 a mis en évidence l'effet puissant antioxydant des flavonoïdes (Takamatsu et al., 2003). Ainsi il a été montré le rôle du resvératrol, un type de polyphénol, connu par son rôle antioxydant et par son activité puissante anticancéreuse chimiopréventive et chimiothérapeutique, sur l'augmentation des activités et des niveaux d'expression des enzymes antioxydants dans les cellules cancéreuses, PC-3 du cancer de la prostate, les cellules HepG2 du cancer hépatique et les cellules MCF-7 du cancer de sein (Khan et al., 2013).

En plus, certains polyphénols exercent leur activité anticancéreuse via l'induction des voies pro-inflammatoires, l'inhibition de la prolifération et la croissance tumorale par l'induction des voies apoptotiques (Niedzwiecki et al., 2016).

Par ailleurs, les antioxydants peuvent également causer des dommages directs à l'ADN, car ils sont riches en électrons faiblement liés. Récemment, des essais cliniques ont montré le rôle de certains antioxydants dans l'induction de mort cellulaire en favorisant les dommages de l'ADN. Comme le cas

du gallate d'épigallocatechine (EGCG), un type de flavonoïde de la famille des polyphénols, qui a montré un effet cytostatique sur les cellules normales pulmonaires et cutanées (Lu et al., 2013). D'autres études ont montré l'effet de l'acide gallique (composé phénolique) dans l'induction des dommages de l'ADN et l'inhibition de l'expression des gènes codant de protéines associées à la réparation de l'ADN dans les cellules cancéreuses humaines SCC-4 (Weng et al., 2015).

Au niveau mécanistique, les antioxydants exogènes agissent d'une manière synergique avec les antioxydants endogènes pour renforcer notre système de défense et pour maintenir notre homéostasie redox et cellulaire. Plusieurs antioxydants exogènes peuvent être des médiateurs dans des voies de signalisation et des voies de défense cellulaire et antioxydant, comme les composés phénoliques (Grace, 2007; Moran et al., 1997).

Egalement, la teneur en GSH intracellulaire pourrait être renforcée, par les antioxydants exogènes. Ainsi, la revitalisation de certains antioxydants exogènes et leur activation, nécessitent la forme réduite du GSH, comme par exemple : la réduction de l'acide déhydro-ascorbique après la reconversion du radical  $\alpha$ -tocophéroxyle sous sa forme active «  $\alpha$ -tocophérol » ou la vitamine E, ainsi que l'acide ascorbique ou la vitamine C oxydée peut être restaurée sous sa forme réduite par des réactions enzymatiques, dont le GSH est considéré comme l'un des substrats (pour revue (Ray et al., 2012)).

Il faut noter que la vitamine C est utilisée pour les patients infectés par le VIH, pour ses effets antioxydants vis-à-vis le stress oxydant induit suite à l'infection par le virus. La supplémentation de vitamine C pour les patients séropositifs induit la diminution de la virémie et l'amélioration de la survie des malades. Plusieurs mécanismes peuvent être déclenchés. Elle diminue le taux de malondialdéhyde et augmente l'activité et l'expression de CAT, GPx et SOD, ainsi le niveau du GSH (Makinde et al., 2017).

Une publication récente explique une nouvelle façon de lutter contre la leucémie. La vitamine C est capable de maintenir l'équilibre de phénomènes nécessaires dans le cycle des cellules souches hématopoïétiques, en régulant le phénomène de méthylation de l'ADN. Schonberger et al., ont montré que la vitamine C peut restaurer la fonction de méthylcytosine dioxygénase (Tet2) qui est impliqué dans la deméthylation de l'ADN, en agissant comme un cofacteur, ce qui diminue l'incidence de leucémogénèse (Schönberger and Cabezas-Wallscheid, 2017).

Depuis environ 213 ans, cette recherche a porté presque exclusivement sur l'extraction, l'isolation et l'élucidation de la structure des produits à partir des plantes. La vitesse avec laquelle ce domaine a été

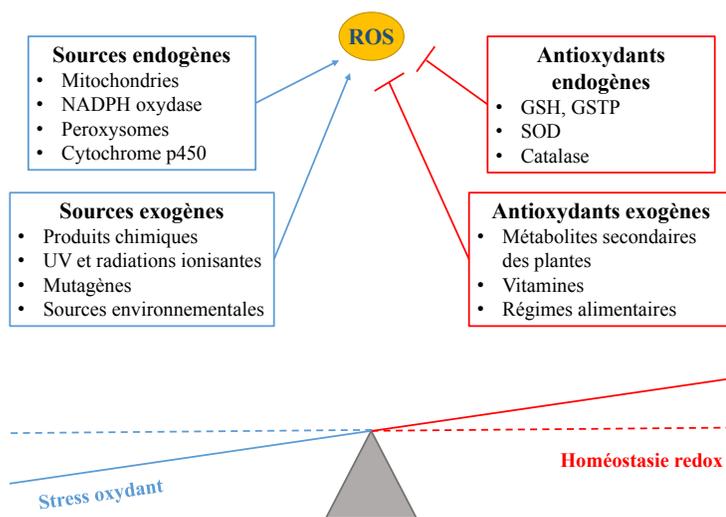
développé, a influencé et a dirigé énormément, les principaux domaines de la chimie organique, en particulier synthétique, analytique et chimie pharmaceutique (Hartmann, 2007).

L'importance des antioxydants exogènes naturels et leurs effets dans la régulation des voies de signalisation impliquées dans de nombreuses maladies humaines ont conduit à des études de structuration et de synthèse des antioxydants synthétiques, dont leurs structures sont proches de celles des antioxydants naturels mais avec une amélioration, facilitant et favorisant leurs interactions et leurs fonctions à équilibrer l'état redox dans l'organisme humain (Augustyniak et al., 2010; Quinchia et al., 2011).

### 3.3. Stress oxydant

#### 3.3.1. Définition du stress oxydant

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre l'exposition aux pro-oxydants et la protection par les antioxydants. C'est la rupture de l'homéostasie redox, soit par une production excessive des ROS et/ou par une diminution des capacités antioxydantes (**Figure 13**).



**Figure 13.** Un déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants, conduit à l'induction du stress oxydant. Un équilibre entre la production des ROS, par les sources endogènes et/ou exogènes, et le système de défense antioxydante, endogènes et/ou exogènes, est nécessaire pour maintenir l'homéostasie redox. La production excessive des ROS et/ou la réduction de la capacité de système de défense antioxydante, aboutit à un état de stress oxydant.

### **3.3.2. Effets physiologiques et pathologiques des ROS**

Les espèces réactives de l'oxygène ont été toujours considérées comme des agents nuisibles, qui pourraient être dangereuses. C'est au cours des deux dernières décennies, qu'ils ont découvert que les ROS peuvent être des médiateurs impliqués dans différentes voies de signalisation (pour revue (Finkel, 2011)) (Sundaresan et al., 1996).

Les ROS sont des espèces à double face, en taux normal sont des médiateurs et des messagers secondaires importants dans plusieurs voies de signalisation physiologique, tandis qu'en condition du stress oxydant, les ROS sont des initiateurs des dommages des macromolécules, et sont ainsi, responsables de la déviation de plusieurs voies de signalisation aboutissant à des conséquences pathologiques et même pourraient être associées à la tumorigenèse. Dans cette partie, on va aborder les bienfaits et les méfaits des ROS.

#### **3.3.2.1. Effets physiologiques des ROS**

Plusieurs preuves suggèrent que la fonction des ROS comme des régulateurs physiologiques est importante, elles sont considérées comme des seconds messagers dans différentes voies de signalisation intracellulaire (pour revue (Finkel, 2011)).

Les ROS participent à la régulation, l'amplification et la maintenance des réponses immunitaires. Elles stimulent l'activation fonctionnelle des lymphocytes T (Hehner et al., 2000), ainsi que la différenciation des lymphocytes B, depuis la réponse des cellules B primaires à la stimulation du récepteur de l'antigène des cellules B (BCR) jusqu'à la formation des plasmocytes (Vene et al., 2010; Wheeler and Defranco, 2012). En plus, la production des ROS a été mise en évidence dans les processus de mort cellulaire comme l'apoptose, la différenciation cellulaire, la régénération tissulaire, et le vieillissement (Banki et al., 1999; Bonini and Malik, 2014) (pour revues (Bedard and Krause, 2007; Circu and Aw, 2010)). Egalement, il a été montré que les ROS, aux concentrations physiologiques, sont impliquées dans la maintenance de la stabilité génomique des cellules souches embryonnaires (Li and Marbán, 2010).

Les ROS possèdent plusieurs cibles qui sont des éléments clés dans certaines voies de signalisation. Elles peuvent les modifier par différentes manières, soit par leur phosphorylation et/ou leur oxydation. Les protéines sont les principales cibles des ROS dans les cellules. Leur oxydation induit des altérations de la charge, de la taille, de l'hydrophobicité et de la polarité des acides aminés, affectant leur structure secondaire et/ou tertiaire et par la suite, la stabilité et l'activité de la protéine entière (pour

revue (Schieber and Chandel, 2014)). Il a été montré que l' $\text{H}_2\text{O}_2$  a un rôle dans l'inhibition des phosphatases, probablement par l'oxydation directe de la cystéine dans le site actif de ces enzymes, comme le cas des protéines tyrosine phosphatases (PTP) (pour revue (Hancock et al., 2001)).

En addition, la phosphorylation réversible des protéines, est un événement biochimique clé dans la plupart des voies de signalisation cellulaire et la transduction du signal, dont les ROS font une partie importante dans leur activation. Plusieurs études ont montré que les protéines kinases activées par des mitogènes (MAP kinases) sont activées par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fialkow et al., 1994) (pour revue (Droge, 2002)). En plus, les ROS peuvent être impliquées dans d'autres voies de signalisations conduisant à la régulation de l'activité de certains facteurs de transcription ce qui pourrait conduire à la modulation de l'expression des certains gènes, comme le « Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 » (Nrf2) (Rochette et al., 2014) et le facteur de transcription nucléaire kappa (NF- $\kappa$ B) (pour revues (Oliveira-Marques et al., 2009; Pantano et al., 2006)).

A signaler ainsi, les RNS sont de médiateurs importants jouant un rôle crucial dans la régulation physiologique de nombreux mécanismes cellulaires, dont le  $\text{NO}^*$  qui est un messager intracellulaire omniprésent capable de réguler les fonctions physiologiques telles que les activités neuronales et cardiovasculaires (pour revue (Martínez and Andriantsitohaina, 2009)).

### **3.3.2.2. Effets pathologiques des espèces réactives**

La production excessive des ROS est associée à plusieurs pathologies, ainsi que dans certaines maladies, les ROS sont obtenues comme conséquences indésirables de ces pathologies. Alors c'est un enchaînement d'évènements, associés à de nombreuses maladies aiguës et chroniques, y compris : le cancer, le diabète, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (pour revue (Prasad et al., 2017a)) (Umeno et al., 2017).

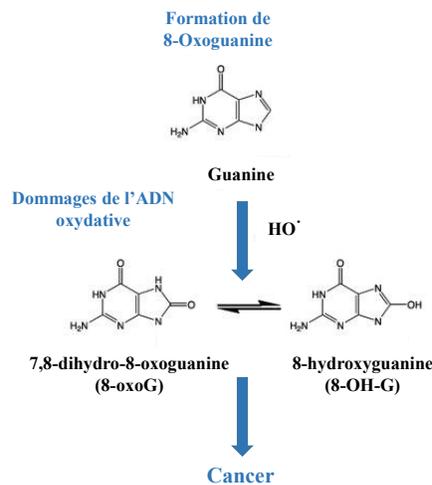
Les ROS sont considérées dangereuses à cause de leur réactivité envers les lipides, les protéines et l'ADN. Les produits de l'oxydation de ces molécules biologiques induits par les ROS, sont utilisés comme des biomarqueurs importants pour la détection de l'état de stress oxydant.

Les ROS, aux concentrations élevées, attaquent les lipides membranaires, principalement par la peroxydation lipidique. C'est une réaction en chaîne qui a pour conséquence l'inactivation des enzymes membranaires, l'oxydation des groupements thiols, l'augmentation de la perméabilité membranaire, le gonflement des mitochondries avec l'inhibition des complexes de la chaîne respiratoire. Le produit de la

peroxydation lipidique le plus dangereux c'est le malondialdéhyde (MDA), un aldéhyde réactif mutagène et cancérigène (Kwiecien et al., 2014).

Les protéines sont aussi des cibles pour l'oxydation par les ROS. Plus de la moitié des résidus des acides aminés peut être oxydée par ces espèces réactives, produisant des composés carbonylés qui pourraient affecter des voies de signalisation intracellulaires, contribuant à diverses maladies humaines (Dalle-Donne et al., 2003).

Il a été estimé qu'une partie importante des DA est causée par les ROS, définissant les dommages oxydants causés à l'ADN (Lu et al., 2001). L'ADN est continuellement attaqué par les ROS qui peuvent affecter et perturber gravement les structures de tous les composants de l'ADN, et si ce dernier n'est pas réparé, des conséquences pathologiques peuvent avoir lieu. En effet, toutes les bases de l'ADN peuvent être oxydées, la guanine est la cible fréquemment attaquée par les ROS (Sheng et al., 2012). Elle peut subir plusieurs types d'attaques par ROS (oxydation, nitration, alkylation, halogénéation, etc.). L'oxydation de la guanine aboutit à la formation du 8-hydroxyguanine (8-OHG) qui peut se coupler avec de l'adénine pendant la réplication de l'ADN, entraînant des substitutions de G à T et de C à A, introduisant des mutations. La 8-OHG est la plus étudiée pour son rôle dans la carcinogenèse (Feig et al., 1994; Floyd, 1990; Olinski et al., 2002) (pour revues ((AbdulSalam et al., 2016; Jena, 2012; Wells et al., 2010; Yasui et al., 2014; Zuo et al., 2015)) (**Figure 14**).



**Figure 14. Réaction de l'oxydation du Guanine.** La réaction de l'oxydation du résidu guanine de l'ADN avec le radical hydroxyle (HO•), pour former le 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoguanine, 8-oxoG), c'est une réaction intermédiaire, réversible avec la formation du 8-hydroxyguanine (8-OH-G). Si elle n'est pas réparée, ce dommage oxydant peut provoquer des mutations favorisant la carcinogenèse.

Bien que les ROS en quantité physiologique sont des médiateurs dans des différentes voies de signalisation, mais une fois leur concentration dépasse le normal dans les conditions du stress oxydant, elles peuvent engendrer l'activation de certaines voies de signalisation d'une manière qui pourrait conduire vers la pathogenèse et la tumorigenèse.

Par exemple, la production excessive de ROS aboutit à l'activation de la voie de MAPK d'une manière constitutive associée à la progression du cancer colorectal (Wang et al., 2017). Aussi, les ROS peuvent affecter la voie de signalisation du NF- $\kappa$ B aboutissant à l'activation chronique de ce facteur, influençant la régulation des gènes codant pour divers types de protéines, qui pourraient être parmi les causes de développement des pathologies et de cancers (pour revue (Storz, 2005)).

En plus, une fois les niveaux de ROS sont augmentés, les réactions entre ROS et RNS peuvent avoir lieu et conduire à un stress nitrosatif. Alors le stress oxydant est étroitement lié au stress nitrosatif. Dont il a été montré que des niveaux élevés de RNS ont été impliqués dans de dommages cellulaires en attaquant diverses cibles cellulaires potentielles comme les lipides, l'ADN et les protéines. Surtout que dans des conditions pathologiques le NO<sup>\*</sup> possède une réactivité forte avec l'O<sub>2</sub><sup>-\*</sup>, formant le peroxy-nitrite qui est un oxydant puissant qui peut interagir avec les molécules biologiques causant de dommages cellulaires et jouant un rôle dans le développement de variétés de processus dégénératifs de certaines maladies humaines (pour revue (Manda-Handzlik and Demkow, 2015)).

### **3.3.3. Le facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B)**

#### **3.3.3.1. Définition du NF- $\kappa$ B et de sa voie d'activation**

Le facteur de transcription nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B) découvert par Ranjan Sen en 1986 dans le laboratoire du lauréat du prix Nobel David Baltimore (Sen and Baltimore, 1986), joue un rôle fondamental dans de nombreux processus physiologiques. Il est le régulateur principal de la réponse inflammatoire et de la maintenance de l'homéostasie immunitaire. Il régule la transcription d'une gamme très vaste de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération et la mort cellulaire ou apoptose (Gasparini and Feldmann, 2012). NF- $\kappa$ B a été identifié dans les cellules B activées et il joue un rôle important dans le développement, la maturation et le maintien des fonctions des cellules B (pour revue (Kaileh and Sen, 2012)).

Le NF- $\kappa$ B peut être composé de différentes sous-unités : RelA/p65, c-Rel, RelB, p50 et p52 qui forment entre eux des hétéro-dimères ou des homo-dimères (au moins 12 différents dimères identifiés).

Toutes les sous-unités du NF- $\kappa$ B contiennent un domaine d'homologie de régulation conservé (RHD) ou « Rel homology domain » qui facilite la dimérisation, la liaison à l'ADN et la localisation nucléaire (pour revue (Basak and Hoffmann, 2008)).

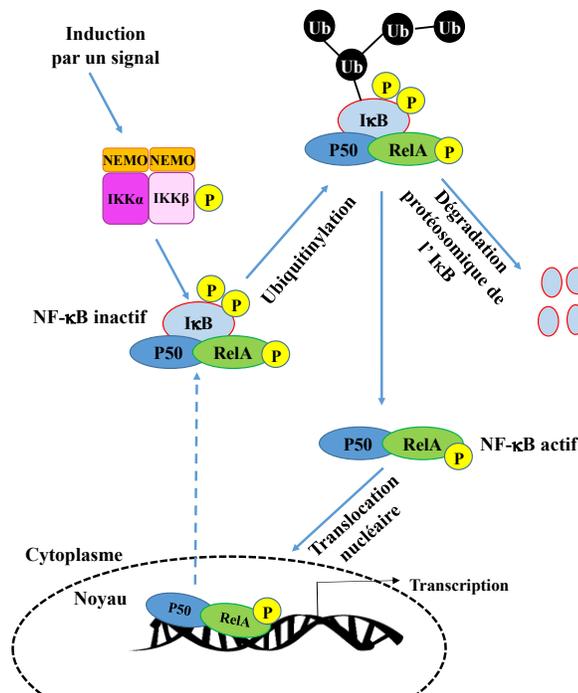
Les sous-unités RelA/p65, c-Rel et RelB contiennent également un domaine de transactivation qui est responsable de l'activité transcriptionnelle des dimères contenant ces sous-unités. Les sous-unités p50 et p52 ne contiennent pas ce domaine et sous forme homo-dimère, agissent principalement comme des répresseurs de la transcription. Les sous-unités p50 et p52 se forment suite à un processus protéolytique d'une protéine précurseur plus grande, la p105 et la p100, respectivement (Hoffmann et al., 2006).

Du fait que les gènes qui sont régulés par NF- $\kappa$ B sont très nombreux et que leur nature et leurs fonctions sont assez importantes et différentes, la dérégulation de la fonction et de l'activité du NF- $\kappa$ B, pourrait avoir des conséquences pathologiques, ce qui nécessite un contrôle strict de l'activité de ce facteur de transcription.

Dans les cellules quiescentes, le NF- $\kappa$ B est séquestré sous forme inactive dans le cytoplasme par une interaction directe avec un membre de la famille des protéines inhibitrices I $\kappa$ B telles que l'I $\kappa$ B $\alpha$ , qui interagit avec le RHD des protéines Rel/NF- $\kappa$ B, couvrant ainsi leur séquence de localisation nucléaire (NLS). Une large variété de stimuli, peut déclencher l'activation du NF- $\kappa$ B, cette signalisation est généralement divisée en trois voies : canonique (classique), non canonique (alternative) et atypique (Gloire and Piette, 2009; Oliver et al., 2009). La voie canonique ou classique de l'activation du NF- $\kappa$ B est déclenchée par de nombreux signaux extracellulaires et intracellulaires, tels que les cytokines pro-inflammatoires (le facteur de nécrose tumorale (TNF) et l'interleukine-1 (IL-1)), les récepteurs de type Tolles « Toll-like » (TLR), les récepteurs antigéniques, ainsi que divers facteurs de stress cellulaire, oxydant et génotoxique (les ROS et les cassures double brin à l'ADN) (pour revue (Ghosh and Hayden, 2012)).

La phosphorylation est l'une des voies essentielles dans l'activation du NF- $\kappa$ B, en aval de tous ces stimuli, surtout la phosphorylation de l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$ . Ce dernier est phosphorylé par un complexe des inhibiteurs des protéines kappa-B kinase (IKK) qui contient deux kinases I $\kappa$ B, IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  avec la sous-unité régulatrice de l'IKK, IKK $\gamma$  ou NEMO pour « NF- $\kappa$ B Essential Modulator ». La phosphorylation de l'I $\kappa$ B $\alpha$  par le complexe IKK déclenche sa poly-ubiquitination et sa dégradation

protéasomique. Ce qui libère le dimère du NF- $\kappa$ B aboutissant à sa translocation dans le noyau où il reconnaît et se lie à des séquences consensus de l'ADN spécifiques appelées sites  $\kappa$ B. En raison de la régulation de l'activation du NF- $\kappa$ B, ce dernier induit l'expression de son inhibiteur (I $\kappa$ B) (Basak and Hoffmann, 2008) et l'I $\kappa$ B $\alpha$  nouvellement synthétisé peut entrer dans le noyau, libérant le NF- $\kappa$ B de ses sites de liaison à l'ADN et le transporter vers le cytoplasme sous sa forme inactive. Ainsi, la phosphorylation de la sous-unité p65 est importante pour l'activation et la translocation nucléaire et elle est la plus étudiée jusqu'au présent. Elle possède 11 sites cibles pour la phosphorylation mais la plupart des études ont concerné le site Serine 536 (S536) (pour revue (Ghosh and Karin, 2002)) (**Figure 15**).



**Figure 15. Activation du NF- $\kappa$ B et sa translocation nucléaire.** La régulation de l'activité du NF- $\kappa$ B est liée à la phosphorylation de son inhibiteur I $\kappa$ B. Dans le cytoplasme, l'hétéro-dimère du NF- $\kappa$ B (p50/RelA) est séquestré par une liaison directe avec l'I $\kappa$ B, suite à un signal, la Kinase phosphorylée active, phosphoryle à son tour l'I $\kappa$ B, conduisant à son ubiquitinylation et à sa dégradation protéolytique. Ce qui permet la dissociation de dimère actif du NF- $\kappa$ B, qui est aussi phosphorylé (RelA-P), aboutissant à sa translocation nucléaire et à l'accomplissement de sa fonction transcriptionnelle. L'activité du NF- $\kappa$ B est régulée d'une manière bien précise, une fois le rôle de ce facteur de transcription est terminé, le dimère est repoussé vers le cytoplasme, où il redevient inactif.

Il existe de nombreuses modifications post-traductionnelles impliquées dans la régulation du complexe IKK et des protéines I $\kappa$ B qui affectent l'activité et la fonction du NF- $\kappa$ B. Il existe aussi

d'autres modifications des protéines de la famille NF- $\kappa$ B elles-mêmes (Ghosh and Hayden, 2012), comme la S-glutathionylation catalysée par le GSTPi (Jones et al., 2016).

Ainsi, il a été démontré que la voie canonique, classique ainsi que la voie atypique, responsable de l'activation de l'hétéro-dimère p65/ p50, sont induites par la présence des ROS (pour revue (Siomek, 2012)).

### **3.3.3.2. NF- $\kappa$ B et le stress oxydant**

Le NF- $\kappa$ B est un détecteur du stress oxydant. La régulation de son activité est considérée comme une réponse cellulaire à ce stress (Mercurio and Manning, 1999) (pour revue (van den Berg et al., 2001)).

En 1991, il a été démontré que l'addition directe de l' $H_2O_2$  à la culture des cellules Jurkat, pourrait activer le NF- $\kappa$ B (Schreck et al., 1991). Depuis cette découverte, plusieurs laboratoires ont essayé de comprendre comment les ROS aboutissent à cette activation. Le point commun entre toutes ces études était que l'activation du NF- $\kappa$ B par le stress oxydant est hautement spécifique de type cellulaire et impliquait plusieurs mécanismes différents (pour revues (Gloire et al., 2006; Li and Karin, 1999)).

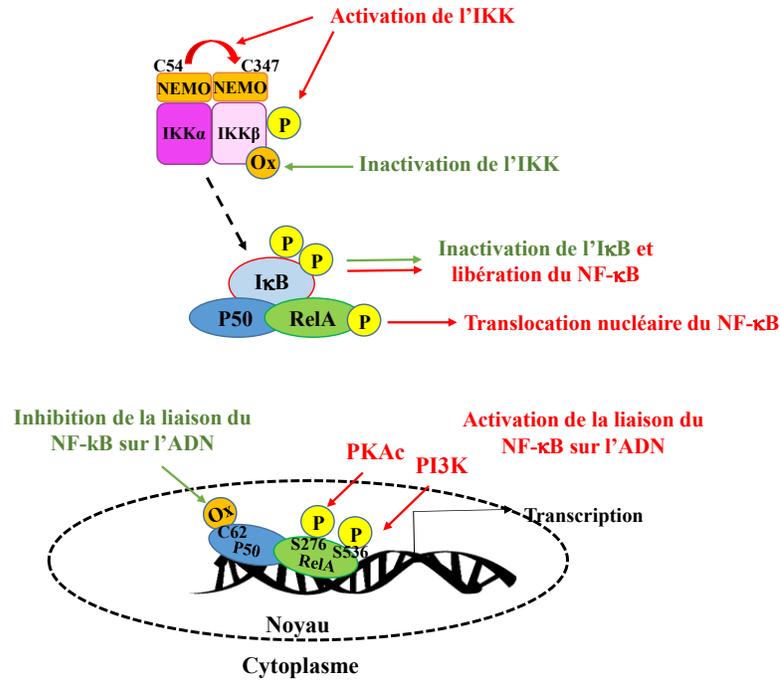
En effet, les ROS peuvent réguler la voie d'activation du NF- $\kappa$ B, en ciblant les éléments clés régulateurs de cette voie, par des phénomènes de phosphorylation/déphosphorylation et/ou oxydation des protéines impliquées dans cette voie (Kamata et al., 2002) (pour revue (Paulsen and Carroll, 2010)). Cette régulation pourrait être positive ou négative, en dépendant de type cellulaire (Byun et al., 2002).

Par exemple, pour la régulation positive, dans la voie classique de l'activation du NF- $\kappa$ B, les ROS induisent l'activation de l'IKK $\beta$  par sa phosphorylation en résidu sérine (Kamata et al., 2002) et favorisent la dimérisation des sous-unités IKK $\gamma$ /NEMO en induisant la formation des liaisons disulfure entre Cys54 et Cys347 (Herscovitch et al., 2008). Le complexe IKK activé, inhibe l'IKB, et phosphoryle les deux résidus Sérine de ce dernier (Ser 32 et 36), conduisant à sa dégradation protéolytique et l'activation du NF- $\kappa$ B, sa libération et sa translocation dans le noyau.

Ainsi, la phosphorylation du dimère du NF- $\kappa$ B (RelA/p65) par la protéine Kinase Calcium dépendante (PKAc) ou la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) qui sont activées par les ROS, au niveau du S276 et S536 respectivement, induit l'activation du NF- $\kappa$ B (Nowak et al., 2008).

En ce qui concerne la régulation négative, les ROS peuvent aussi inhiber l'activation du NF- $\kappa$ B, par exemple, par l'oxydation de la cystéine du p50 (Cys62) dans le RHD ce qui inhibe la liaison du NF- $\kappa$ B sur l'ADN (Toledano et al., 1993). Ainsi, l'oxydation de l'IKK $\beta$  en Cys179, la rend inactive

(Reynaert et al., 2004), cette oxydation est probablement suivie de S-glutathionylation. Le NF- $\kappa$ B glutathionylé a moins d'activité transcriptionnelle (Klatt and Lamas, 2000; Reynaert et al., 2006) (Figure 16).



**Figure 16.** « Crosstalk » des ROS avec les voies d'activation du NF- $\kappa$ B. ROS peuvent agir directement ou indirectement dans la voie de signalisation du NF- $\kappa$ B d'une manière dépendante de type cellulaire. ROS peut activer ou désactiver le complexe IKK, la formation de pont disulfure entre Cys54 et Cys347 de l'IKK $\gamma$ , et la phosphorylation de l'IKK $\beta$  aboutissent à l'activation du complexe IKK, et par la suite à la phosphorylation de l'I $\kappa$ B, conduisant à sa dégradation protéolytique, et la libération du NF- $\kappa$ B. La forme active phosphorylée du NF- $\kappa$ B se dirige vers le noyau. D'autres voies pourraient activer aussi le dimère du NF- $\kappa$ B, par exemple les ROS peuvent activer la kinase PKAc qui à son tour phosphoryle la RelA en position Cystéine 276, ainsi elles pourraient activer la kinase PI3K, qui à son tour phosphoryle la RelA en position Cystéine 536, facilitant la liaison du NF- $\kappa$ B à l'ADN. D'autre part, les ROS peuvent inhiber l'activation du NF- $\kappa$ B en dépendant de type cellulaire, elles aboutissent à l'oxydation de l'IKK $\beta$  ce qui l'inhibe, ainsi l'oxydation de p50 en Cystéine 62, inhibent l'adhésion du NF- $\kappa$ B aux sites  $\kappa$ B de l'ADN.

Par analogie avec les ROS et le stress oxydant, les RNS ont la capacité à réguler la voie d'activation du NF- $\kappa$ B, soit positivement ou négativement, par le phénomène de S-Nitrosylation. Ce processus consiste à l'addition du groupement NO $\cdot$  à une cystéine thiol/sulfhydryle pour former un dérivé de S-nitrosothiol (RSNO). Par exemple, dans les cellules endothéliales, la S-Nitrosylation de la sous-

unité p65 a comme conséquence l'inhibition de l'activation du NF- $\kappa$ B (Martínez and Andriantsitohaina, 2009).

En plus, le NF- $\kappa$ B est parmi les facteurs de transcription les plus importants dans la régulation de l'homéostasie redox cellulaire, soit positivement, soit négativement, tout en dépendant du type et du contexte cellulaire. Il régule l'expression d'une large gamme des gènes que ce soit des gènes codant certains antioxydants, comme le Mn-SOD (Kairisalo et al., 2007), le GSTPi (Morceau et al., 2004; Xia et al., 1996), ou dans certaines conditions, de gènes codants pour des pro-oxydants. En effet, au cours d'une inflammation chronique, le NF- $\kappa$ B induit l'expression du NADPH oxydase NOX2 (Anrather et al., 2006) (pour revue (Wang et al., 2002)). Ainsi dans des conditions pro-inflammatoires, le NF- $\kappa$ B est un régulateur puissant de l'expression de gène codant l'enzyme iNOS et par la suite la régulation de la production induite du NO<sup>\*</sup> (Arias-Salvatierra et al., 2011).

La complexité de cette relation entre le stress oxydant (et/ou nitrosatif) et la voie de signalisation du NF- $\kappa$ B, ainsi que le rôle important du NF- $\kappa$ B comme facteur de transcription, sont toujours associés à des pathologies diverses, suite à une dérégulation d'un seul facteur dans cette voie de signalisation. Ce lien étroite entre le NF- $\kappa$ B et le stress oxydant a été associé dans beaucoup de circonstances à la carcinogenèse (Morgan and Liu, 2011a; De Oliveira et al., 2017).

### **3.3.3.3. L'activité oncogénique du NF- $\kappa$ B**

Le NF- $\kappa$ B est actif dans ~ 95 % des cancers. Selon Hanahan et Weinberg, la tumorigenèse nécessite six altérations essentielles à la cellule normale physiologie : l'autosuffisance des signaux de croissance, l'insensibilité à l'inhibition de la croissance, l'évasion de l'apoptose, l'immortalisation, l'angiogenèse, l'invasion tissulaire et la métastase (pour revue (Hanahan and Weinberg, 2000)). NF- $\kappa$ B est capable d'induire la plupart de ces altérations cellulaires, et il est activé d'une manière constitutive dans certains types de cancer (pour revue (Prasad et al., 2010b)).

Il existe plusieurs mécanismes par lesquels le NF- $\kappa$ B dévie de sa fonction normale de maintien de l'homéostasie cellulaire, menant la cellule normale à une cellule cancéreuse.

Les perturbations dans la voie d'activation du NF- $\kappa$ B, pourrait conduire à la dérégulation de l'expression des gènes contrôlés par ce facteur, y compris des gènes anti-apoptotiques, de la prolifération, ainsi que les gènes impliqués dans les différents processus tumoraux (Huber et al., 2004) (pour revues (Hoesel and Schmid, 2013; Xia et al., 2014)).

L'activation du NF- $\kappa$ B est observée dans de nombreuses leucémies, lymphomes et tumeurs solides humaines (pour revue (Karin et al., 2002)). Différentes techniques de détection de l'activation du NF- $\kappa$ B (l'immunohistochimie, les tests de retardement sur gel et le profil de l'expression des gènes des échantillons de tumeurs primaires et des lignées cellulaires tumorales) ont mis en évidence la localisation nucléaire persistante de la sous-unité active du NF- $\kappa$ B par rapport aux contrôles normaux, surtout l'hétérodimère p50/p65, qui est le complexe le plus fréquemment signalé à être activé dans de nombreux cancers humains (Alizadeh et al., 2009; Hinz et al., 2002).

Les différents éléments dans la voie d'activation du NF- $\kappa$ B pourraient être des cibles pour des altérations pro-oncogéniques : l'hyperactivation de la cascade de signalisation du NF- $\kappa$ B, l'hyperactivation du complexe IKK, des mutations qui inactivent l'inhibiteur I $\kappa$ B ou des aberrations chromosomiques impliquant divers gènes de la famille Rel/NF- $\kappa$ B. Toutes ces altérations ont été observées dans de nombreuses tumeurs humaines (pour revues (Gilmore et al., 2004; Rayet and Gélinas, 1999)).

Ainsi, une activité aberrante du complexe IKK et une demi-vie plus courte de l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$ , pourraient être les causes de développement des lymphomes B. De même, une mutation de l'I $\kappa$ B $\alpha$  pourrait contribuer au lymphome Hodgkinien et une production excessive du TNF- $\alpha$ , pourrait conduire à une activation constitutive du NF- $\kappa$ B et au développement du lymphome de Burkitt. Des translocations aboutissant à une activation constitutive du NF- $\kappa$ B, ont été observées dans les lymphomes diffus à grandes cellules B (Davis et al., 2001) (pour revue (Prasad et al., 2010b)).

### **3.4. Les ROS, la déficience en antioxydant et les dommages oxydants causés à l'ADN dans l'oncogénèse**

Au cours du dernier demi-siècle, des études *in-vitro* et *in-vivo*, ont montré que les cellules tumorales humaines produisent beaucoup plus de ROS que les cellules normales (Szatrowski and Nathan, 1991) (pour revue (Liou and Storz, 2010)). Ainsi, la plupart des cellules cancéreuses sont plus sensibles au stress oxydant, avec une activité de défense antioxydante très atténuée (Raj et al., 2011) (pour revues (Behrend et al., 2003; Prasad et al., 2017b)). Cette perturbation de l'état redox dans les cellules tumorales est accompagnée par des dommages oxydants causés à l'ADN induits par les ROS (pour revue (Valko et al., 2004)).

Les dommages oxydants causés à l'ADN, s'ils ne sont pas réparés, sont impliqués dans l'induction de la première étape de la carcinogenèse (Halliwell and Gutteridge, 1991) (pour revue (Zuo et al., 2015)). De nombreuses études ont tenté d'établir une relation entre les niveaux de dommages oxydants causés à l'ADN et le cancer. Une production excessive des ROS et une déficience en pouvoir antioxydant conduisent à des niveaux élevés de dommages oxydants causés à l'ADN produits dans un environnement tumoral (Poulsen, 2005). L' $H_2O_2$  exogène même à faible concentration pourrait favoriser la prolifération cellulaire des cellules HeLa en augmentant les taux de ROS intracellulaires (Wang et al., 2013). Ainsi, un état de stress oxydant constitutif dans le cancer du sein a été détecté (Johar et al., 2015; Toyokuni et al., 1995). En plus, plusieurs études ont montré l'importance des ROS mitochondriales dans les voies impliquées dans la promotion de la prolifération tumorale (Cheng et al., 2013), surtout que les cellules cancéreuses ont besoin de l'ATP pour leur croissance et leur prolifération (pour revues (Sabharwal and Schumacker, 2014; Yang et al., 2016)).

Plusieurs types de lymphomes, ont été caractérisés par une production excessive des ROS, et une atténuation de l'activité de système de défense. Certaines études ont montré l'implication des ROS dans le développement du lymphome du manteau et dans la résistance contre le traitement (Chen et al., 2016). De même d'autres études ont montré la participation des ROS dans le développement de DLBCL, dont elles affectent la réponse au traitement par les glucocorticoïdes, l'un des composants de la chimiothérapie contre les lymphomes (Tome et al., 2005).

Une étude *in-vivo* dans le sang des souris porteurs de tumeurs ascitique d'Ehrlich, et une autre étude sur le sérum sanguin des patients atteints de cancers pédiatriques, montrent une diminution du rapport entre GSH/GSSG, d'une manière significative durant la croissance tumorale (Navarro et al., 1999; Zitka et al., 2012). En plus, une étude a montré que des souris déficientes en SOD1, développent un cancer hépatique caractérisé par des dommages oxydants causés à l'ADN intéressants (Elchuri et al., 2005) (pour revues (Gill et al., 2017; Lu et al., 2008)). Ainsi, une répression de l'expression de gène codant le GSTP1 a été trouvée dans divers cancers (Bakker et al., 2002; Li et al., 2013a; Lin and Nelson, 2003; Singal et al., 2001).

En plus, les produits de l'oxydation de l'ADN induites par les ROS sont classifiés parmi les molécules à caractère tumorigène, comme le 8-oxo-2'-désoxyguanosine, dont sa concentration a été détectée très élevée dans la plupart des cancers, et persistante dans l'ADN des lymphocytes des patients atteints d'un carcinome colorectal (Siomek et al., 2007).

La production excessive de ROS, la déficience en antioxydants et les dommages oxydants causés à l'ADN contribuant à la carcinogenèse, ont été associés avec les propriétés oncogéniques de certains virus (pour revue article (Kgatle et al., 2017)).

#### **4. Virus oncogénique**

Les virus qui contribuent à l'induction de la transformation des cellules normales en cellules tumorales sont appelés virus oncogéniques ou « oncovirus ». L'histoire de la virologie tumorale a commencé avec Peyton Rous en 1911 en découvrant un virus aviaire induisant des tumeurs chez les poulets (Rous, 1911). Au début, les virus étaient considérés comme des agents infectieux particuliers capables d'induire un cancer chez les animaux mais pas chez les humains, mais leur découverte rend raisonnable l'existence d'agents similaires qui pourraient induire des tumeurs chez l'espèce humaine (pour revue (Brian et al., 2016)). Cependant, les scientifiques ont eu besoin de 40 ans pour identifier des virus qui sont associés avec des tumeurs humaines. Ce qui a ouvert la porte dans les années 1960 et 1970 pour la découverte des premiers virus associés aux tumeurs humaines : le virus de l'Epstein Barr (EBV) (Epstein, 1965), le virus de l'hépatite B et le papillomavirus (HPV) (Bosch et al., 1995; zur Hausen, 1996). L'identification de nouveaux virus tumoraux humains supplémentaires a continué, et dans les années 1980 et 1990, ils ont découvert d'autres virus comme le virus associé au sarcome de Kaposi (Hymes et al., 1981; MMWR(Weekly), 1981). Parmi les virus qui sont associés aux cancers humains, on peut citer le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), qui peut contribuer à la tumorigenèse suite à l'immunodépression, dont il a été considéré comme un cancérigène humain par l'Agence internationale de recherche sur le cancer (Chang et al., 2017). Une étude récente montre que les virus oncogéniques sont associés au développement de plus de 10 % des tumeurs humaines (de Martel et al., 2012).

Les mécanismes moléculaires de l'oncogenèse virale sont complexes et variés, parmi eux on peut citer l'induction de l'inflammation chronique et la production excessive des ROS (pour revues (Hanahan and Weinberg, 2000; Mesri et al., 2014)). Récemment, plusieurs études ont montré le rôle des virus oncogéniques dans la modulation des fonctions mitochondriales et dans la perturbation des complexes de la chaîne respiratoire (pour revue (Song et al., 2017)), aboutissant à l'augmentation de la production des ROS nécessaire pour la carcinogenèse (Jung and Kim, 2013; Ladha et al., 2005; Tian et al., 2012).

## **4.1. Virus de l'immunodéficience humain VIH**

### **4.1.1. Description du VIH-1**

#### **4.1.1.1. Structure du VIH-1**

Le VIH est un petit rétrovirus enveloppé, d'environ 80 à 120 nm de diamètre. Son enveloppe renferme une matrice, une capsidie et deux molécules d'ARN de polarité positive.

L'enveloppe virale est composée d'une bicouche phospholipidique dérivant de la membrane plasmique de la cellule hôte. Elle contient des protéines cellulaires et virales. L'une des glycoprotéines virales c'est la gp41 transmembranaire et l'autre externe gp120. Cette dernière contient les sites de liaison au récepteur cellulaire CD4, CR2 ou CD21 et aux corécepteurs CCR5, CXCR4. La capsidie, est formée par l'assemblage des protéines p24. Elle renferme d'une part le génome composé de deux brins d'ARN monocaténares associés aux protéines de nucléocapsides p6 et p7, et d'autre part, les enzymes viraux indispensables à la réplication et à la maturation du virus : le transcriptase inverse formé des sous-unités p66 et p51, le protéase p15 et l'intégrase p32. La matrice, formée de protéines p17 entoure la capsidie, contribue à la stabilisation du virion et participe au recrutement des protéines de l'enveloppe (pour revue (Sierra et al., 2005)).

#### **4.1.1.2. Voies de contamination par le VIH-1 et ses cellules cibles**

Le VIH peut être transmis par voie sanguine et par d'autres fluides corporels comme le sperme, les sécrétions vaginales (voie sexuelle) et le lait maternel (transmission verticale) (Shaw and Hunter, 2012).

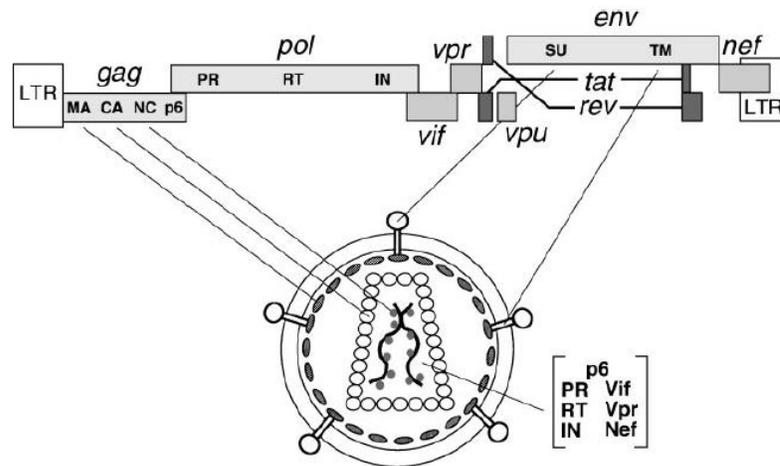
La première étape d'une infection par le VIH est l'attachement puis l'entrée dans la cellule cible. Les cellules infectées par le VIH, sont celles qui portent l'antigène CD4 à leur surface (comme les cellules T et les monocytes). C'est une interaction de haute affinité entre la gp120 de l'enveloppe virale et le marqueur membranaire CD4 de la cellule cible, mais cette liaison gp120/CD4 n'est toutefois pas suffisante pour assurer la pénétration du VIH : l'expression de corécepteurs membranaires présents sur les lymphocytes T4 et sur les monocytes, est nécessaire pour cette pénétration. Il s'agit de la molécule CXCR4 dans le cas des lymphocytes T4 et il s'agit de la molécule CCR5 dans le cas des monocytes ou des macrophages. De fait, il existe plusieurs souches du VIH : les souches qui utilisent le corécepteur CCR5, infectent donc les monocytes et les macrophages (souches à tropisme M) et les souches qui utilisent le corécepteur CXCR4, infectent donc les lymphocytes T4 (souches à tropisme T) (Lobritz et al., 2010; Yang et al., 2017).

#### 4.1.1.3. Cycle biologique et génome viral du VIH-1

On peut résumer le cycle biologique du VIH-1 en huit étapes principales : 1) l'attachement ou la fusion de virus, 2) la pénétration dans la cellule cible, 3) la décapsidation, 4) la transcription reverse et l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte, 5) la traduction des ARNm viraux, 6) l'assemblage, 7) le bourgeonnement, 8) la maturation des particules virales nouvellement produites et la libération des virions (Wilén et al., 2012).

Le matériel génétique du VIH-1 est composé d'un ARN simple brin de 9 181 nucléotides. Il est composé de neuf gènes, réparti en trois gènes principaux (Gag, Pol, et Env), ainsi que quatre gènes accessoires (vif, vpr, vpu et nef) et deux gènes de régulation, de petite taille (Tat et Rev). Il comporte de plus des séquences spécifiques, situées à ses extrémités (5'UTR et 3'UTR ou région non transcrite « UnTranscribed Region ») (Mushahwar, 2007).

Une fois rétro-transcrit sous la forme d'un ADN double brin, le génome de virus s'exprime par le biais de deux ARN messagers, qui aboutissent à la synthèse de trois protéines. Ces protéines sont ensuite clivées par des protéases, pour aboutir aux différentes protéines virales (**Figure 17**).



**Figure 17. Organisation du génome viral du VIH-1.** Figure extraite de (Frankel and Young, 1998).

Les neuf gènes du VIH-1 codent pour des protéines responsables de son développement, de sa survie et de sa multiplication. La connaissance des fonctions de ces protéines apparaît importante pour déterminer une cible potentielle sur le plan thérapeutique. Voici ci-dessous un tableau résumant les différentes protéines, leurs gènes codants et leurs fonctions principales (**Tableau 1**).

**Tableau 1. Produits de génome viral du VIH-1 et les fonctions protéiques.**

<b>Gènes</b>	<b>Protéines et fonctions</b>
Gag « Group-Specific-Antigen »	Protéines de la matrice et de la capsid du virus
Pol (polymérase)	Assure la production des enzymes et responsable de la réplication virale (transcriptase reverse, intégrase, protéase)
Env (enveloppe)	Enveloppe gp120 : protéines de l'enveloppe virale
Nef (facteur négatif de la régulation)	Propagation des virus, évolution de l'infection et diminution de l'expression de CD4
Rev « Regulateur de l'expression virale »	Export des transcrits non épissés vers le cytoplasme
Vif (Facteur d'infectivité virale)	Permet une meilleure maturation des virions et diminue le nombre des particules virales défectueuses
Vpr (protéine virale R)	Transfert de complexe viral de pré-intégration de cytoplasme de la cellule hôte vers son noyau
Vpu (protéine virale U)	Libération des particules virales et dégradation des CD4
Tat (Transactivateur de la transcription)	Régulateur de la transcription virale et cellulaire

#### **4.1.2. Les pathologies liées au VIH**

Au début des années 1980, le monde soudainement a été confronté à une nouvelle épidémie dévastatrice lorsque les premiers cas de syndrome de l'immunodéficience humaine (SIDA) ont été observés (Gottlieb et al., 1981). Ce syndrome a été attribué à un mutant du virus T-lymphotropique humain (HTLV-1), qui était le premier rétrovirus humain (virus à ARN) découvert par Robert Gallo et son équipe. C'est en 1983, qu'un rétrovirus plus tard appelé virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) a été isolé et identifié comme l'agent étiologique du SIDA par Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier (Barré-Sinoussi et al., 1983). Cette découverte a conduit à trois décennies de recherche intense sur ce virus, son interaction avec l'hôte et ses pathogénèses, ainsi que sur le développement des approches pour tester, traiter et prévenir l'infection par le VIH (pour revue (Barré-Sinoussi et al., 2013)).

##### **4.1.2.1. Physiopathologie de l'infection par le VIH-1**

Comme étant donné que le VIH-1 est le virus responsable de l'apparition du SIDA, on peut résumer l'évolution clinique de l'infection par ce virus, par trois phases chronologiques : une phase de

primo-infection, une phase asymptomatique ou phase de latence clinique et une phase correspondant à l'apparition du SIDA (pour revue (Weber, 2001)).

1- La phase aiguë ou primo-infection dure quelques semaines : Les symptômes de cette phase ressemblent à ceux de la mononucléose infectieuse, elle peut passer parfois inaperçue. C'est la phase de la réplication virale intense associée à une dissémination virale rapide et à des altérations précoces de système immunitaire.

2- La phase asymptomatique ou phase de latence clinique peut durer pour plusieurs années : La plupart des personnes infectées ne présentent aucun signe (ou peu) de l'infection par le VIH, tandis que la multiplication du VIH continue ainsi que la diminution du taux des cellules CD4+.

3- Le stade SIDA : est caractérisé par la déplétion des lymphocytes T CD4+ circulants ( $CD4 < 200$  cellules/mm<sup>3</sup>) et par une augmentation rapide de la réplication virale (pour revues (Cohen et al., 2011; Simon et al., 2010)).

La diminution du nombre des CD4+ aboutit à la détérioration de système immunitaire graduellement et à l'affaiblissement de l'organisme, qui devient très vulnérable et sensible à plusieurs infections, dites opportunistes (car normalement sont tenus inactifs par un système immunitaire normal), causant plusieurs pathologies et tumeurs conduisant même au décès des sujets infectés par le VIH.

Différents types de tumeurs pourraient se développer chez les patients séropositifs, y inclut le sarcome de Kaposi, le lymphome non-Hodgkinien, le cancer de col de l'utérus, le cancer des poumons, le lymphome Hodgkinien et le cancer de foie, etc. (pour revue (Phillips et al., 2008)).

#### **4.1.2.2. VIH-1 et la lymphomagenèse**

Le lymphome est le cancer le plus fréquent chez les patients infectés par le VIH. Depuis l'introduction de la cART dans les années 1990, l'incidence de la plupart des lymphomes associés au VIH a été diminuée, suivie par l'amélioration de la survie des patients infectés, en raison d'un meilleur contrôle de la réplication du VIH et de la maintenance de la fonction immunitaire (Granich et al., 2013; Reniers et al., 2014; Stebbing et al., 2004a).

Il a été remarqué que la fréquence de certains lymphomes chez les patients séropositifs reste élevée, même après la cART, constituant une cause importante de morbidité et de mortalité chez les sujets atteints (Riedel et al., 2016). Ce qui est intéressant c'est que la majorité de ces lymphomes sont des lymphomes B agressifs. Parmi eux les plus communs, sont le lymphome diffus à grandes cellules B, le lymphome de Burkitt et ainsi que les lymphomes Hodgkiniens (Dunleavy and Wilson, 2012; Gibson

et al., 2014; Howlader et al., 2016a; Jin et al., 2017; Lewden et al., 2005; Parkin et al., 2014). En outre, selon la classification de l'OMS, l'incidence chez les patients séropositifs est accrue de 60 à 200 fois pour le DLBCL (Beral et al., 1991; Chao et al., 2010).

Les cellules B ne sont pas parmi les cellules cibles infectées par le VIH, mais il a été montré que le VIH peut interagir avec les lymphocytes B directement ou indirectement. Une liaison pourrait être établie entre les protéines de complément du virus circulant *in-vivo* et le CD21 des cellules B matures (Schnittman et al., 1986), aboutissant à l'induction des différentes voies de signalisation dans les cellules B, y inclut leur hyperactivation (Lane et al., 1983). En plus, une interaction indirecte entre le VIH et les cellules B peuvent être mise en place par la libération de plusieurs cytokines et de facteurs de croissance par les cellules infectées, y compris l'interféron- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ), le facteur de nécrose tumorale (TNF), l'interleukine-6 (IL-6) et IL-10 (pour revue (Moir and Fauci, 2009)).

En plus, certaines protéines du VIH, comme la protéine Tat et le Nef, sont sécrétées par les cellules infectées par le VIH comme les cellules T et peuvent pénétrer dans les cellules non infectées comme les cellules B (pour revue (Tsfasman et al., 2012)).

Plusieurs hypothèses ont été lancées concernant la mécanistique de la lymphomagenèse associée au VIH. L'hypothèse la plus courante c'est que la lymphomagenèse est la conséquence de la suppression immunitaire et la diminution des cellules T CD4+ (Bower et al., 2009a), ainsi qu'à des niveaux élevés de virémie circulante, favorisant dans ces conditions l'apparition et la participation des différents virus oncogènes (en particulier l'EBV) (Grogg et al., 2007). Cependant ce scénario actuel n'explique pas d'une manière convaincante l'incidence élevée des lymphomes surtout B chez les patients infectés par le VIH et soumis sous la cART (Achenbach et al., 2014; Howlader et al., 2016b; Jin et al., 2017; Riedel et al., 2015).

Récemment des recherches ont montré l'existence de mécanismes autres que la suppression immunitaire, impliquant des effets biologiques médiés par des produits du VIH qui sont sécrétés par les cellules infectées et s'accumulent dans les cellules non infectées, où ils peuvent agir comme des facteurs micro-environnementaux critiques favorisant le développement de lymphome chez les personnes infectées par le VIH (Dolcetti et al., 2015, 2016). Mais toujours le(s) mécanisme(s) avec le(s)quel l'incidence des lymphomes B, chez les patients infectés par le VIH, reste augmentée, malgré la cART, sont jusqu'aujourd'hui inconnus. Ces données modifient le paradigme actuel en supposant que le VIH n'est qu'indirectement lié à la lymphomagenèse.

La protéine transactivatrice Tat du VIH-1 peut pénétrer dans les cellules B (pour revues (Musinova et al., 2016; Romani et al., 2010a)). Plusieurs études ont montré le rôle de cette protéine favorisant le développement des lymphomes associés au VIH. Environ 30 % des souris transgéniques exprimant Tat développent des lymphomes B (Curreli et al., 2013; Kundu et al., 1999). En étant libérée par des cellules infectées, Tat pourrait agir comme un facteur capable d'entrer dans les lymphocytes B et interagir fonctionnellement.

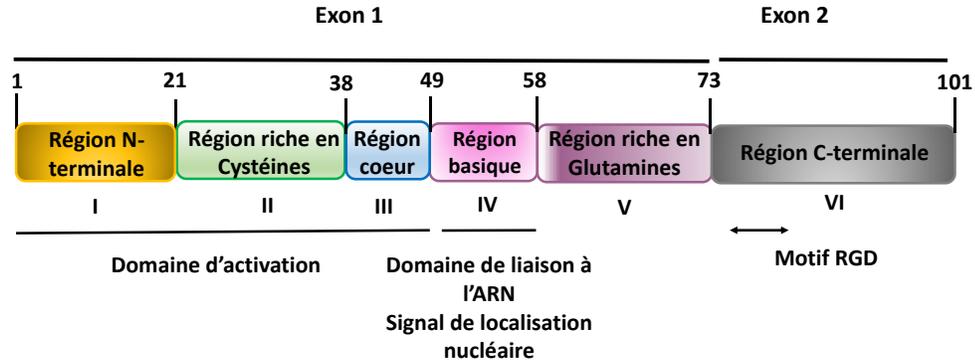
Notre équipe a pu récemment identifier le mécanisme par lequel la protéine Tat favorise le développement du lymphome de Burkitt chez les patients infectés par le VIH. Nous avons montré que Tat libérée par les cellules infectées dans la circulation sanguine peut remodeler le noyau des cellules B induisant la colocalisation entre les partenaires potentiels de la translocation *MYC* et *IGH*, favorisant aussi la translocation spécifique t (8; 14) caractéristique du lymphome de Burkitt (Germini et al., 2017). En même temps, les mécanismes d'apparition des autres lymphomes B liés au VIH-1 ne pourront pas être expliqués par ce mode d'action de la protéine Tat. D'où la nécessité des recherches sur d'autre(s) mécanisme(s) alternative(s) aboutissant au développement de ces lymphomes.

Dans la partie suivante on va aborder la définition de la protéine virale Tat et ses différentes fonctions.

### **4.1.3. Protéine transactivatrice de la transcription (Tat)**

#### **4.1.3.1. Gène et structure de la protéine Tat-VIH-1**

Tat est une petite protéine hydrophobe de 14 à 16 kDa, de structure relativement conservée et de taille variable entre 86 et 104 acides aminés (aa) localisée dans le noyau et plus précisément dans le nucléole. Elle est codée par deux exons de génome viral. La séquence principale de Tat peut être divisée en six domaines : un N-terminal acide riche en proline (1-21 aa), une région riche en cystéine (22-37 aa), une région hydrophobe (38-48 aa), une région basique riche en arginine (49-57 aa), une région riche en glutamine (58-73 aa) et une région C-terminal (74-101 aa) (Viglianti and Mullins, 1988) (**Figure 18**).



**Figure 18. Organisation de la protéine Tat.**

Chacun de ces domaines possède une fonction bien déterminée :

- Le domaine I (1-21 aa), N-terminal riche en prolines, contient un résidu tryptophane conservé en position 11, essentiel pour le relargage de Tat par les cellules infectées et pour sa translocation dans le cytosol des cellules avoisinantes. Une mutation dans ce domaine n'abolit pas totalement l'activité transcriptionnelle de Tat (Johri et al., 2011).
- Le domaine II (20-40 aa), constitué de 7 cystéines hautement conservés en position 22, 25, 27, 30, 31, 34 et 37, est important pour l'activité de Tat. La mutation au niveau de ces cystéines (à l'exception de Cys en position 31) entraîne la perte totale de l'activité de transactivation de Tat (Johri et al., 2011).
- Le domaine III (40-48 aa), cœur ou « Core », c'est une région riche en résidus hydrophobes. Il présente une phénylalanine conservée en position 38 et la séquence 41KGLGISYG48 conservée entre les résidus 41 et 48 (Johri et al., 2011).
- Le domaine IV (49-57 aa), basique, comporte la séquence de localisation nucléaire. Il est impliqué dans l'interaction et la pénétration de Tat extracellulaire dans les différents types cellulaires infectés ou non (Mann and Frankel, 1991).
- Le domaine V (57-72 aa), riche en acides glutamiques, permettant la liaison à l'ARN.
- Le domaine VI (72-101 aa), codé par l'exon 2. Cette partie est facultative pour la transactivation *in-vitro* dont elle est nécessaire *in-vivo* (Campbell et al., 2010).

#### **4.1.3.2. Fonctions de la protéine Tat**

Une fois sécrétée par les cellules infectées, Tat s'accumule dans le milieu extracellulaire d'où elle peut pénétrer dans les cellules voisines infectées ou non. La sécrétion de Tat est hautement active, dont

la concentration pourrait atteindre jusqu'au 500 ng/ml dans le surnageant des lymphocytes T infectés en culture et dans les sérums des individus infectés par le VIH-1 (Barillari and Ensoli, 2002). La pénétration de Tat dans les différents types cellulaires peut s'effectuer par diverses manières. Grâce au domaine basique riche en arginine, Tat peut pénétrer dans les cellules infectées ou non par le VIH, dont elle était utilisée comme un vecteur facilitant la transduction intracellulaire des protéines ou des macromolécules d'intérêts (Mann and Frankel, 1991). D'autres études ont montré que Tat a la capacité de reconnaître plusieurs sites de liaison à la surface cellulaire (Tyagi et al., 2001), mais le processus le plus courant de pénétration de Tat, est essentiellement par endocytose (Vendeville et al., 2004).

#### **4.1.3.2.1. Tat : facteur de transcription des gènes viraux et cellulaires**

Le transport des molécules vers le noyau dépend de leur taille moléculaire (Davis, 1995). Des petites protéines peuvent entrer et sortir de noyau à travers des pores nucléaires par diffusion passive, ce qui permet leur oscillation entre le noyau et le cytoplasme. Par conséquent, la taille de la protéine hydrophobe Tat ( $\approx 14$  kDa) ainsi que la présence de la séquence de la localisation nucléaire dans son domaine basique, explique théoriquement sa capacité d'osciller librement entre le noyau et le cytoplasme (Stauber and Pavlakis, 1998), montrant l'importance de cette protéine dans la régulation de la transcription.

Tat est connue par son rôle essentiel dans la régulation des gènes impliqués dans le cycle biologique du VIH, dès l'entrée de virus dans la cellule hôte, jusqu'au l'assemblage des nouvelles particules virales et leur libération (pour revue (Romani et al., 2010a)). En plus, elle est aussi capable à moduler l'expression des gènes cellulaires (Marban et al., 2011; Reeder et al., 2015).

Elle peut réguler la transcription des gènes *via* trois mécanismes distincts : Tat pourrait activer la transcription en se liant à des éléments de réponse trans-activant (TAR pour « trans-activating response element ») dans la région 5'-non traduite de nouveau ARN, ou en se liant à la région promotrice des gènes cibles et ainsi elle pourrait exercer son rôle via l'interaction avec des facteurs de transcription cellulaires principaux (pour revue (Clark et al., 2017)).

Les gènes régulés par Tat sont impliqués dans plusieurs mécanismes cellulaires, y compris, la réparation des dommages de l'ADN (Imai et al., 2005), dont il a été montré que Tat induit des défauts dans les mécanismes de réparation de l'ADN qui pourraient être à la base de la lymphomagenèse (Nunnari et al., 2008).

Tat peut aussi réguler l'expression des gènes codant des facteurs de croissance comme le facteur de nécrose tumorale bêta (TNF- $\beta$ ) et l'interleukine-6. A signaler que les altérations de mode d'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-6, affectent la différenciation des cellules lymphoïdes, conduisant à des pathologies associées au SIDA comme le lymphome B (Ambrosino et al., 1997; Mayne et al., 2000). *In-vivo*, Tat est capable de déréguler l'expression de cytokines IL-4 et IL-10, ces molécules pro-inflammatoires sont les plus exprimées dans les monocytes traitées par Tat, en comparaison avec des cellules non traitées (Badou A, Bennasser Y, Moreau M, Leclerc C, Benkirane M, 2000).

#### **4.3.1.2.2. Tat : modulateur de système immunitaire**

Tat peut réguler l'expression de récepteur de la surface CXCR4 dans les cellules T CD4+ quiescentes ce qui augmente leur susceptibilité à l'infection par le VIH (Secchiero et al., 1999).

Un panel de 94 gènes est dérégulé dans les cellules T primaires, lorsque Tat est présente dans les milieux de culture. Parmi ces gènes, on cite l'IL-8 et l'IL-1 $\beta$  induisant une activation des lymphocytes T (Johnson et al., 2013). La production et les fonctions des cytokines sont également affectées par Tat. L'expression de TNF- $\alpha$ , de l'IL-6, de l'IL-8 et de l'IL-10, est affectée par Tat indirectement en activant une série de cascades de signalisation, qui comprennent des MAP kinases, des PKC et le NF- $\kappa$ B (pour revue (Clark et al., 2017)).

#### **4.1.3.2.3. Tat : régulateur de l'apoptose**

L'apoptose est un processus hautement contrôlé de mort cellulaire programmé, qui est activé en réponse aux stimuli internes et externes (pour revue (Elmore, 2007)). Le processus apoptotique provoqué par le virus est la principale cause de la chute de la population des lymphocytes T et l'immunodépression, chez les patients infectés par le VIH (pour revue (Cummins and Badley, 2010)). Tat peut interférer avec le processus apoptotique soit en ciblant la voie de transduction de signal direct, par l'activation de la cascade TNF- $\alpha$  (Kim et al., 2010), soit en ciblant la voie mitochondriale, par la production excessive des ROS mitochondriales (Buccigrossi et al., 2011; Gülow et al., 2005; Kruman et al., 1998).

#### **4.1.3.2.4. VIH-1, Tat et le stress oxydant**

##### ***VIH et le stress oxydant***

Les personnes infectées par le VIH-1 ont un niveau très élevé de production des ROS (Nakamura et al., 2002; Pace and Leaf, 1995), depuis le début de l'infection par le VIH-1, et tout au long de cycle de sa réplication (pour revues (Agarwal, 2011; Ivanov et al., 2016a; Sharma, 2014)). En effet, la majorité

des ROS détectée était d'origine mitochondriale, dont plusieurs études ont montré le dysfonctionnement mitochondrial chez les patients du VIH conduisant à la production accrue des ROS (Manda et al., 2011). Il a également été signalé que l'infection par le VIH-1 diminue l'activité du complexe I mitochondrial aboutissant à la production élevée des ROS dans les cellules T (Ladha et al., 2005) (pour revue (Song et al., 2017)).

En plus, il a été montré que la mortalité chez les patients du VIH augmente suite à l'état de stress oxydant (Masia et al., 2016). Cette perturbation de l'état redox est étroitement liée à une perte de l'activité de défense antioxydante, constituant la base de la progression du SIDA ainsi que des pathologies liées au VIH (pour revue (Agarwal, 2011)) (Huang et al., 2016).

Cette perturbation de l'homéostasie redox cellulaire n'est pas limitée juste au rôle pro-oxydant du VIH, en outre, le VIH-1 utilise ses protéines virales (Tat, gp120, Nef et Vpr) pour perturber leur état redox (Deshmane et al., 2009; Pocernich et al., 2005; Price et al., 2005; Vilhardt et al., 2002) (pour revue (Mollace et al., 2001a)). En revanche, les rôles pro-oxydants du VIH et de ses protéines virales n'ont pas été étudiés dans les cellules non infectées par le VIH-1 comme les cellules B. En plus, il a été démontré que la production des ROS mitochondriales active le NF- $\kappa$ B, ce qui permet d'augmenter l'expression des gènes importants dans la réplication du VIH-1 dans les cellules Jurkat (Pyo et al., 2008). NF- $\kappa$ B agit à son tour également dans la régulation de l'expression des gènes codants des nombreuses cytokines inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$  et ainsi que des gènes codants des régulateurs du stress oxydant dans les cellules infectées par le VIH. En addition, l'introduction de la cART bien qu'elle reconstitue le système immunitaire mais aussi elle peut augmenter les niveaux des ROS chez les personnes séropositives (Elias et al., 2013; Mandas et al., 2009; Watanabe et al., 2016).

Dröge et al., ont été les premiers à signaler que les sujets séropositifs ont des niveaux inférieurs de cystine dans le plasma et par la suite des niveaux très bas du GSH dans les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) (Dröge W, Eck HP, Näher H, Pekar U, 1988). Des études ultérieures aussi ont montré que le taux du GSH dans les érythrocytes et les PBMC des individus VIH +, est bien atténué (Morris et al., 2012, 2014; Sbrana et al., 2004), et que le rapport GSH/GSSG est très bas dans le plasma des personnes infectées par le VIH (Buhl et al., 1989; Suresh et al., 2009). En addition la carence d'autres antioxydants chez les patients infectés, a été détectée, comme la vitamine A (Chiu et al., 2008) et la vitamine E (Mehta et al., 2010; Pacht et al., 1997). A signaler que l'expression de certains enzymes

antioxydants a été réprimée, citant par exemple le GSTP1 (Strange et al., 2001) et ainsi que le  $\gamma$ -GCS (Morris et al., 2014; Saing et al., 2016).

***Tat : un pro-oxydant puissant***

Malgré l'ART, le niveau des ROS reste augmenté chez les sujets séropositifs (Watanabe et al., 2016). Les protéines virales du VIH-1 jouent un rôle important dans la perturbation redox dans les cellules infectées par le virus (Banerjee et al., 2010). Parmi ces protéines, Tat était détectée dans le sérum des patients infectés à des niveaux significativement élevés (pour revue (Musinova et al., 2016)), même après la cART (Mediouni et al., 2012).

Tat déclenche la production des ROS dans les cellules infectées par le VIH via plusieurs mécanismes indépendants. Le premier concerne les NADPH (Gu et al., 2001). Le second implique l'induction de la spermine oxydase (SMO) (Capone et al., 2013) et le troisième repose sur le dysfonctionnement mitochondrial (Perry et al., 2005).

Des recherches ont montré le rôle de Tat dans la production excessive des ROS majoritairement à partir des mitochondries. Plusieurs études *in-vitro* suggèrent que Tat peut interférer directement ou indirectement avec des fonctions mitochondriales, elle peut induire le dysfonctionnement mitochondrial et provoquer la perméabilisation de la membrane des mitochondries isolées du foie, du cœur et du cerveau des échantillons de souris et des humains (Lecoeur et al., 2012). Cette perturbation de la fonction mitochondriale a été décrite à la base de la production excessive des ROS, et de l'instabilité redox cellulaire (Lin and Beal, 2006).

En plus de la production excessive des ROS, Tat induit un déséquilibre de la balance pro-oxydant/antioxydant, en perturbant l'activité de système de défense antioxydante. Elle peut inhiber l'expression de plusieurs gènes codants des enzymes antioxydants ainsi que leur activité, comme le MnSOD, le GPx dans les cellules HeLa (Flores et al., 1993; Richard et al., 2001), et le  $\gamma$ -GCS chez des souris transgéniques exprimant Tat-VIH-1 (Choi et al., 2000a).

L'effet de Tat sur la régulation de l'expression et/ou l'activité des enzymes antioxydants, surtout le  $\gamma$ -GCS chez des souris transgéniques exprimant Tat-VIH-1 (Choi et al., 2000a), peut expliquer sa participation dans la diminution de taux du GSH chez les patients infectés par le VIH. Des nombreuses recherches ont déclaré le rôle de Tat dans la diminution du bagage de l'antioxydant intracellulaire « le glutathion » dans les cellules infectées par le VIH comme les macrophages (Bhaskar et al., 2015). Les études menées sur les souris transgéniques exprimant Tat ont montré la diminution de la biosynthèse du

GSH ainsi que la teneur en GSH total intracellulaire, suite à l'action de Tat, sur l'expression de l'ARNm et/ou de la concentration de  $\gamma$ -glutamyl-cysteine synthétase (Choi et al., 2000b). Le même effet de Tat sur la biosynthèse du GSH, sur l'enzyme de sa biosynthèse ( $\gamma$ -GCS), ainsi que sur l'expression des enzymes de sa synthèse de novo (GR et GPx) a été observé dans les érythrocytes et les cellules hépatiques des patients infectés par le VIH (Morris et al., 2014). En addition la diminution du rapport GSH/GSSG, a été signalé dans les cellules endothéliales du cerveau des sujets séropositifs à cause de l'activité pro-oxydante de Tat (Price et al., 2005).

La diminution de taux du GSH réduit et du GSH total intracellulaire a été aussi observée dans plusieurs types des lymphomes que ce soit lymphomes B ou T (Aukrust et al., 1995; Silber et al., 1992; Trachootham et al., 2008).

En addition, il faut bien signaler l'importance de Tat dans la régulation de l'activité de plusieurs facteurs de transcription cellulaire, principalement le NF- $\kappa$ B. Une étude sur des cellules HeLa infectées par le VIH-1, a démontré le rôle de Tat dans l'activation de ce facteur (Westendorp et al., 1995), qui à son tour pourrait réguler l'état redox cellulaire positivement ou négativement (Mandas et al., 2009). A noter, qu'aucune étude de l'effet de Tat pro-oxydant, n'a été menée sur les cellules B des patients infectés par le VIH.

#### **4.1.3.2.5. Tat et NF- $\kappa$ B**

Plusieurs études ont mis en évidence l'influence de Tat sur des nombreux éléments clés dans la voie de signalisation du NF- $\kappa$ B dans les cellules infectées par le VIH. Certaines études ont démontré la présence d'une interaction physique directe entre Tat et l'inhibiteur I $\kappa$ B. Cette interaction mène à une compétition entre Tat et cet inhibiteur qui piège le NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme, une fois Tat complexe l'I $\kappa$ B, le NF- $\kappa$ B est libéré dans le noyau des cellules HeLa (Puca et al., 2007). En outre, Tat peut également, interagir directement avec la sous-unité p65 du NF- $\kappa$ B, ce qui favorise l'affinité de liaison de p65 à l'ADN et stimule son activité transcriptionnelle dans la lignée cellulaire HL3T1, traitée par Tat, ou dans les cellules Jurkat, respectivement (Demarchi et al., 1996; Liu et al., 1992). D'autres études sur des cellules HeLa MEF, p50<sup>-/-</sup> p65<sup>-/-</sup>, ont trouvé que Tat peut se lier à l'élément amplificateur de promoteur de certains gènes régulés par le NF- $\kappa$ B, favorisant le recrutement et l'activation de ce dernier (Fiume et al., 2012a).

En plus, Tat peut agir sur les enzymes cruciaux impliqués en amont de la voie d'activation du NF- $\kappa$ B, telles que l'IKK et d'autres protéines kinases différentes impliquées dans la phosphorylation de

I $\kappa$ B $\alpha$ , conduisant à sa dégradation protéasomique (Demarchi et al., 1996). Il a été démontré aussi que Tat peut induire la liaison du NF- $\kappa$ B à l'ADN suite à l'induction de la phosphorylation et de la dégradation de I $\kappa$ B, via la perturbation de l'état redox intracellulaire dans la lignée de leucémie myéloïde humaine immortalisée K562 (Blazquez et al., 1999) (pour revue (Courret and Chang, 2017)). Et d'autre part, Kwon et al., ont montré que Tat peut inhiber la déacétylation de l'ADN et augmenter l'accessibilité du NF- $\kappa$ B à l'ADN dans Les cellules MEF dérivées de SIRT1 ou Sirtuin 1<sup>-/-</sup> (Kwon et al., 2008).

Tat peut aussi potentialiser la voie du NF- $\kappa$ B par l'activation du TNF- $\alpha$  en perturbant l'état redox cellulaire dans les cellules infectées par le VIH (pour revue (Nakajima and Kitamura, 2013)). L'activation du NF- $\kappa$ B en réponse au TNF- $\alpha$  a été médiée par des conditions pro-oxydatives, dans les cellules HeLa transfectées de manière stable avec le gène Tat du VIH-1 (cellules HeLa-Tat) (Westendorp et al., 1995), cette activation a été observée dans la lignée lymphoïde des poumons humains U937, en particulier par les ROS mitochondriales (Hughes et al., 2005), qui peuvent affecter plusieurs protéines clés impliquées dans la voie NF- $\kappa$ B, comme la phosphorylation de p65, I $\kappa$ B $\alpha$ , IKK $\alpha$  et l'oxydation de certaines cystéines ainsi que l'inhibition des phosphatases (pour revues (Blaser et al., 2016; Morgan and Liu, 2011a)).

#### **4.1.3.2.6. Tat et les aberrations chromosomiques**

À ce jour, plusieurs aberrations chromosomiques ont été trouvées dans la plupart des principaux types tumoraux (Fröhling and Döhner, 2008; Kim et al., 2013).

Le rôle de la protéine Tat dans l'induction des aberrations chromosomiques au niveau des cellules ou systèmes humaines n'a été pas étudié. Une seule étude sur le rôle de Tat dans l'induction des aberrations au niveau de nombreux chromosomes en affectant la mitose, a été effectuée sur des embryons de *Drosophila* syncytial injectés par la protéine purifiée Tat du VIH-1 (Battaglia et al., 2005).

#### **4.1.3.2.7. Tat et oncogénèse**

L'un des mécanismes d'action avec lesquels le VIH pourrait être associé à la tumorigénèse c'est *via* ses protéines virales. Tat est la protéine candidate la plus importante, dont beaucoup des études ont montré son rôle oncogénique dans les cellules infectées par le VIH.

Il a été montré que Tat possède des propriétés oncogéniques dans les cellules de cancer colorectal (Huynh et al., 2007). D'autres études sur des fibroblastes transformés *in-vitro* ainsi que chez les souris nues et immunocompétentes, ont montré que Tat est impliquée dans la pathogénèse du sarcome de

Kaposi associé au SIDA (Chen et al., 2009). Ainsi que des études sur des souris transgéniques exprimant Tat ont montré que ces derniers ont la capacité de développer des lymphomes B (Curreli et al., 2013; Kundu et al., 1999). En plus, Tat est suspectée d'être impliquée dans la pathologie néoplasique chez les patients atteints du SIDA. Les souris transgéniques, qui expriment constitutivement la protéine Tat dans le foie, développent une dysplasie des cellules hépatiques, représentant une lésion pré-néoplasique (Altavilla et al., 2000). En ce qui concerne les lymphomes B associés au VIH, les mécanismes d'action avec lesquels le VIH pourrait participer dans leur développement, restent inconnus, surtout les lymphomes B possédant des incidences élevées malgré la cART (DLBCL et LB).

Bien que le VIH n'infecte pas les lymphocytes B, mais ses protéines virales comme Tat, sont capables de pénétrer dans les cellules non infectées. La flexibilité structurelle de la protéine Tat, la facilité de son entrée à travers les membranes cellulaires, sa forte affinité pour la liaison à l'ADN et ses diverses fonctions (Johri et al., 2011), nous permettent de la considérer comme un candidat pour la lymphomagenèse observée chez les sujets infectés par le VIH.

La présence de Tat dans le plasma des patients séropositifs, l'état de stress oxydant élevé chez les patients du VIH ainsi que l'augmentation de l'incidence de certains types des lymphomes B chez les sujets atteints, même après la cART, nous ont poussés à lancer l'hypothèse que Tat pourrait être un candidat puissant impliqué dans le développement des lymphomes à haute incidence (DLBCL et HL) avec d'autre(s) mécanisme(s) alternative(s), surtout que le rôle de Tat comme pro-oxydant et oncogène dans les cellules B, n'est jamais été étudié.

Le projet de ma thèse est divisé en trois grandes parties : la première partie concerne le rôle pro-oxydant de Tat dans les cellules B normales traitées et le(s) mécanisme(s) d'action de cette protéine, ainsi l'étude de l'état du stress oxydant dans les cellules B des patients du VIH. En plus de l'étude de rôle oncogène de Tat dans la lymphomagenèse B et l'induction des dommages oxydants causés à l'ADN dans les cellules B humaines (Article acceptée dans *Redox Biology journal*). La deuxième partie consiste sur l'extraction de molécules actives à partir des plantes endémiques du Liban et l'étude de leurs effets antioxydants *in-vitro* et sur les cellules B humaines. La troisième partie concerne le travail publié de notre équipe dont j'ai participé, sur l'étude de rôle de Tat et ses mécanismes d'action favorisant le développement du lymphome de Burkitt dans les cellules B humaines (Germini et al., 2017).

## *Hypothèses et objectifs*



Depuis l'identification du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) et son isolation, ce virus a été défini comme l'agent étiologique du SIDA. Cette découverte a conduit à trois décennies de recherche intense sur ce virus, son interaction avec l'hôte, ses pathogénèses. Ainsi que sur le développement des approches pour comprendre les différents mécanismes d'action de virus et de ses protéines virales dans les cellules infectées; ainsi que pour tester, traiter et prévenir l'infection par le VIH. Cette infection est accompagnée par l'affaiblissement de système immunitaire et le développement de différents types des cancers et des lymphomes. L'introduction de la cART, a augmenté la survie des patients infectés par le VIH en améliorant leur système immunitaire et en diminuant l'incidence des lymphomes, sauf certains lymphomes B agressifs comme le DLBCL, le LH et le LB. Leur fréquence reste élevée causant la morbidité et la mortalité des personnes séropositives, malgré que le VIH, n'infecte pas les cellules B. Les mécanismes d'action avec lesquels le virus est associé au lymphomagenèse B restent largement inconnus.

Les patients infectés par le VIH possèdent un niveau important du stress oxydant dans le plasma et dans les cellules infectées par le virus, cette perturbation de l'état redox est le résultat de plusieurs mécanismes y incluent le rôle pro-oxydant de la protéine virale transactivatrice Tat. Cette protéine est connue par son rôle pro-oxydant et oncogénique dans les cellules infectées par le VIH comme les cellules T et les macrophages mais ces rôles n'ont jamais été étudiés dans les cellules B humaines des patients du VIH.

La capacité de la protéine Tat de pénétrer dans les cellules non infectées (comme les cellules B), son rôle pro-oxydant et oncogénique dans les cellules infectées par le VIH, sa présence dans le plasma des patients infectés par le VIH, ainsi que l'incidence élevée des lymphomes B agressifs chez les patients infectés par le VIH même après les différents types des cART, nous ont permis de lancer l'hypothèse que la protéine Tat pourrait être parmi les candidats principaux responsables de développement des lymphomes B associés au VIH.

Dans ce cadre général, les problématiques de mon travail de thèse s'inscrivent à la fois dans un cadre fondamental pour la détermination **des mécanismes d'action de la protéine Tat du VIH-1** associées à la **lymphomagenèse B**.

La première partie qui est le sujet principal de ma thèse, consiste à montrer, pour la première fois, le rôle **pro-oxydant** de Tat et ses mécanismes d'action impliqués dans l'induction du **stress oxydant** et des **dommages oxydants causés à l'ADN**, dans les cellules B humaines isolées du sang des donneurs

sains et traitées par la protéine Tat recombinante. Dans cette partie nous avons étudié pour la première fois le rôle de Tat oncogénique dans l'induction des **aberrations chromosomiques** dans des cellules humaines, la lignée cellulaire lymphoblastoïdes RPMI 8866. L'ensemble des résultats obtenus sont décrits et commentés dans la première partie des résultats (Résultats I) et font l'objet d'une publication acceptée dans *Redox Biology Journal*.

La deuxième partie qui fait le deuxième sujet principal de ma thèse, a été effectuée au Liban dans le but d'extraire des **molécules antioxydantes** à partir des **plantes endémiques du Liban**, et l'utiliser pour une **raison mécanistique et thérapeutique**. Deux différentes plantes ont été choisies dont nous avons étudié **leurs rôles antioxydants *in-vitro* et sur les cellules B traitées par Tat**. L'ensemble des résultats et des données obtenus sont décrits et commentés dans la deuxième partie des Résultats (Résultats II).

La troisième partie dont j'y ai participé pour accomplir ce travail, consiste à montrer le rôle de la protéine Tat dans le développement du LB, dont notre équipe a étudié le mécanisme d'action avec lequel Tat est capable de induire la colocalisation des loci *MYC* et *IGH*, impliqués dans la translocation t (8; 14) caractéristique du lymphome de Burkitt. L'ensemble des résultats et des données obtenus sont décrits et commentés dans la troisième partie (Annexe), et font l'objet d'une publication dans *Leukemia Journal* en 2017.

## *Matériels & Méthodes*



## **1. Modèles cellulaires**

### **1.1. Isolation des lymphocytes B du sang des donneurs sains**

#### **1.1.1. Isolation des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) par gradient du Pancoll**

Les PBMC sont les cellules du sang périphérique ayant un seul noyau. Ces cellules sont constituées des lymphocytes T, des lymphocytes B, des cellules NK « Natural Killers » et des monocytes.

Afin d'isoler les PBMC des autres constituants du sang (comme les érythrocytes, les plaquettes) nous avons procédé au gradient du Pancoll, basé sur la centrifugation à gradient de densité (PAN biotech Aidenbach, Allemagne, milieu de séparation des lymphocytes).

Dans ce but, des prélèvements sanguins ont été réalisés au sein de l'Hôpital Saint-Louis à Paris, en France, à partir des donneurs sains, par l'Etablissement Français du Sang, Rungis, conformément à la législation nationale française. Brièvement, le sang a été dilué par le même volume du tampon phosphate salin PBS 1X stérile. Dans des tubes de 50 ml, le sang a été coulé lentement sur les parois des tubes au-dessus du Pancoll (12 ml) qui réside au fond des tubes. Après centrifugation pour 30 minutes à \*630 rcf « Relative Centrifugal Force » et à température ambiante (accélération faible, sans frein), les anneaux blancs obtenus au centre des tubes contenant les PBMC ont été collectés dans des tubes contenant du PBS 1X stérile. Trois lavages avec le PBS 1X stérile ont été faits pour se débarrasser du Pancoll (toxique pour les cellules). Les PBMC obtenues ont été incubées dans un milieu de culture RPMI 1640 supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (FBS) et de 1 % des antibiotiques pénicilline/streptomycine (P/S) pendant la nuit à 37 °C et avec 5 % de Dioxyde de Carbone (CO<sub>2</sub>) dans l'incubateur, pour se débarrasser des débris et des cellules mortes, et pour adhérer les macrophages (ou une incubation de 20 minutes avec 20 % de FBS, est suffisante pour adhérer et se débarrasser des macrophages).

#### **1.1.2. Purification des lymphocytes B**

Les cellules B ont été purifiées par tri négatif en utilisant le kit d'isolement des cellules B II (Macs Milteny Biotec, Bergisch-Gladbach, Allemagne).

Brièvement, toutes les cellules de PBMC à l'exception des cellules B ont été marquées avec un cocktail des anticorps biotinylés CD2, CD14, CD16, CD36, CD43 et CD235a (glycophorine A). Ces

cellules ont été ensuite magnétiquement étiquetées avec des micro-billets anti-Biotine « Anti-Biotin MicroBeads ». Les cellules B très pures ont été obtenues par tri négatif, après avoir attiré les cellules non-B marquées magnétiquement. Les cellules B purifiées ont été cultivées *in-vitro* dans le milieu RPMI additionné de 10 % de FBS inactivé par la chaleur, en présence de 1 % de P/S (milieu complet).

## 1.2. Isolation des lymphocytes B du sang des patients du VIH

Des échantillons du sang total ont été obtenus auprès de huit patients séropositifs, traités dans le département de l'immunologie clinique, de l'Hôpital Saint-Louis, à Paris, en France. En accord avec la loi française, cette étude a été enregistrée comme étude non interventionnelle à l'Agence Nationale de Sécurité de Médicament (2016-A01316-45) et un consentement éclairé a été obtenu de toutes les matières. Leurs caractéristiques physiopathologiques sont résumées dans le **Tableau 2**.

**Tableau 2. Principales caractéristiques physiopathologiques des huit individus infectés par le VIH testés dans notre étude**

Patients	Test	Durée d'ART efficace	ARN plasmatique du VIH	Cellules T CD4+	Concentration de Tat sérique
#, Sexe (Age, années)	#	(Mois)	(log <sub>10</sub> copies/ml)	(x 10 <sup>8</sup> /l)	(ng/ml)
1, F (48)	1	54	<1,3	428	0,40
2, F (56)	1	100	<1,3	502	2,83
3, M (59)	1	66	<1,3	747	1,14
4, M (47)	1	25	<1,3	417	2,91
5, F (51)	1	102	<1,3	556	0,21
6, M (52)	1	228	<1,3	494	0,27
7, M (33)	1	11	<1,3	619	4,06
8, F (62)	1	73	<1,3	536	9,02

L'isolation des PBMC et la purification des lymphocytes B à partir du sang des patients séropositifs, ont été réalisées avec les mêmes procédures suivies pour les cellules B normales isolées du sang des donneurs sains, mais en raison de sécurité, les procédures ont été réalisées dans les laboratoires de haute sécurité de niveau 3.

### **1.3. Culture des lignées cellulaires lymphoblastoïdes RPMI 8866**

Les lignées lymphoblastoïdes (RPMI 8866) ont été fournies par l'équipe de Dr Joëlle Wiels, IGR, CNRS, UMR 8126. Les LCL ont été obtenues après immortalisation des lymphocytes B normaux par le virus d'Epstein Barr (EBV). Cette lignée a été cultivée en milieu RPMI 1640 supplémenté en L-glutamine (2 mM), en pyruvate de sodium (1 mM), en glucose (20 mM), en pénicilline prophylactique (100 Unité/ml), en streptomycine (100 µg/ml) et 10 % de FBS. Les cellules ont été cultivées dans l'incubateur réglé à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été passées deux fois par semaine.

## **2. Préparation et extraction des plantes du Liban**

### **2.1. Préparation des extraits bruts (Extraction par macération)**

Les plantes *Vicia canescens* (VC) et *Euphorbia macroclada* (EM) ont été récoltées en Juillet 2015, des montagnes des cèdres du Liban (Oyoun Orghosh). Afin d'obtenir les différents extraits bruts à partir de ces plantes fraîches, l'extraction par macération a été effectuée. Ce type d'extraction consiste à laisser séjourner un solide dans un solvant organique froid pour en extraire les composés solubles.

Les feuilles et les fleurs fraîches du *Vicia canescens* et de l'*Euphorbia macroclada* respectivement, ont été coupées en des petits morceaux pour augmenter la surface de contact avec le solvant ce qui facilite l'extraction des molécules. L'extraction a été réalisée dans 70 % de l'éthanol (1 : 3 (p/v)) pour une semaine (**Tableau 3**).

**Tableau 3. Un tableau résumant les différentes parties des plantes VC et EM, ainsi que leurs masses, le temps de macération et le solvant organique d'extraction utilisé.**

Plantes	Parties des plantes	Masse	Solvant organique d'extraction	Temps de macération	Références
<i>Vicia canescens</i>	Feuilles	980 g	70 % Éthanol	Une semaine	
<i>Euphorbia macroclada</i>	Fleurs	559,8 g	70 % Éthanol	Une semaine	(Farhan et al., 2012)

Pour se débarrasser de tous les débris indésirables, les extraits bruts obtenus après l'extraction par macération ont été filtrés et essorés par la filtration sous vide (filtration sur Büchner). C'est une sorte de purification dont les insolubles sont retenus sur le papier filtre.

Une évaporation rotative sous pression, a été ensuite réalisée pour les filtrats des extraits bruts, dans le but d'évaporer les solvants d'extraction (l'éthanol), en utilisant l'évaporateur rotatif Heidolph HB digital ou rotavap. Ce type d'évaporation consiste à distiller rapidement des solvants, dans le but de concentrer les produits solubles (on enlève tout le solvant). Le principe est basé sur la distillation simple sous vide, qui permet d'éliminer rapidement de grandes quantités de solvant. Cette technique d'évaporation utilisée permet d'abaisser la température d'ébullition des solvants, pour protéger la dégradation des molécules sensibles à haute température, alors dans ce but la pression est diminuée grâce, à une trompe à eau et la solution est chauffée -en fonction du solvant à éliminer- pour compenser le caractère endothermique de la réaction. Pour augmenter la surface de contact avec l'air, pour homogénéiser la distribution de la chaleur, pour éviter des bulles d'ébullition trop grosses ou mousseuses et pour éviter l'aspiration de la solution lors de la baisse de pression, dans ces buts, la solution est mise en rotation dans un ballon adapté.

## **2.2. Préparation des fractions à partir des extraits bruts par décantation**

Pour séparer les différentes molécules solubles dans l'extrait brut, un fractionnement a été réalisé, selon la méthode de séparation par décantation. C'est une opération d'extraction liquide-liquide, sous l'action de la gravitation, des solvants non-miscibles de densités différentes (phase aqueuse et phase organique).

Elle consiste à faire passer une substance d'un solvant à un autre. Cette opération, réalisée par simple agitation dans des ampoules à décanter pour séparer les deux phases. Il suffit de laisser reposer le mélange pour que le liquide le plus dense se place en dessous du liquide le moins dense, et qu'apparaisse une surface de séparation horizontale entre les deux liquides.

Le fait de mettre un solvant apolaire en contact avec une solution aqueuse et d'agiter le tout fait migrer les molécules organiques du milieu polaire vers le milieu apolaire ou les molécules polaires vers le milieu aqueux.

Brièvement, la solution à décanter (extrait brut) a été placée dans l'ampoule à décanter, et ensuite le solvant organique a été ajouté. Trois différents solvants organiques à polarité croissante ont été utilisés : l'hexane, le dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) et l'acétate d'éthyle (AcOEt).

La première étape consiste à ajouter l'hexane sur l'extrait brut, après agitation, les molécules polaires passent dans la phase aqueuse et les molécules apolaires sont dissoutes dans le solvant apolaire l'hexane (comme la chlorophylle). Après séparation des deux phases, le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  est ajouté sur la phase aqueuse, et après agitation les molécules solubles dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y passent. Finalement, l'AcOEt est ajouté sur la phase aqueuse et les molécules très polaires y passent (comme les phénols). A la fin on obtient quatre fractions contenant les différentes molécules polaires et/ou apolaires qui sont dissoutes dans les solvants organiques appropriés.

Une évaporation des différents solvants a été effectuée, d'où la précipitation des différents produits extraits, sous forme des cristaux ou de poudre ou des molécules huileuses.

La phase aqueuse et l'extrait brut (dont le solvant organique a été évaporé), ont été lyophilisés, afin de se débarrasser de l'eau. La lyophilisation, ou anciennement cryodessiccation, c'est la dessiccation d'un produit préalablement congelé, par sublimation, qui est le passage direct d'un corps de l'état solide à l'état gazeux, sans passer par l'état liquide (le solvant sublimé est généralement de l'eau).

Finalement, une partie des trois fractions organiques, de la phase aqueuse et de l'extrait brut ont été dissouts dans le DMSO afin d'effectuer les différentes expériences sur les cellules B. Et les autres parties ont été dissoutes dans de l'éthanol absolu pour effectuer le test de piégeage du DPPH'.

### **3. Traitement**

#### **3.1. Traitement des lymphocytes B normaux par la protéine transactivatrice de la transcription Tat et par sa forme mutante TatC22**

Pour la plupart des expériences, le nombre des cellules B utilisé a été fixé à  $10^6$  cellules/ml de milieu. Pour le traitement avec la protéine Tat purifiée, nous avons utilisé la protéine Tat recombinante produite par Ablinc et obtenue dans le cadre du programme de recherche et de réactif NIH-AIDS « National Institutes of Health- Acquired Immune Deficiency Syndrome », USA (Etats unis). Selon le fabricant, la protéine Tat est pure plus que 95 % après purification par la Chromatographie d'affinité avec l'héparine et par la Chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC « High-performance liquid chromatography » en phase inverse qui a pour but d'éliminer les endotoxines (Dudley, 2006). La protéine Tat a été utilisée à une concentration de 250 ng/ml dans toutes les expériences, sauf pour l'expérience de l'effet dose dépendante de Tat, nous avons traité les cellules B par une autre concentration de 15 ng/ml.

TatC22 est une protéine Tat mutante avec une Glycine 22 au lieu de Cystéine 22 (Garcia et al., 1988; Rossi et al., 1997), dont la fonction de transactivation a été abrogée. Le produit est commercialisé chez Abcam (ab83352), UK (Royaume-Uni). La protéine TatC22 a été utilisée à une concentration de 250 ng/ml.

#### **3.2. Traitement des lymphocytes B normaux par Tempol, N-acétylcystéine (NAC) et Bay 11-7082**

Les cellules B ont été incubées, en présence de Tat 250 ng/ml simultanément avec l'antioxydant N-acétylcystine (NAC) de 1 mM (Sigma-Aldrich), ou avec le piègeur des ROS le Tempol 10  $\mu$ M (Sigma-Aldrich), ou l'inhibiteur du NF- $\kappa$ B, Bay 11-7082, 1 mM (Calbiochem). Après 6 heures de traitement, les différentes expériences ont été réalisées.

#### **3.3. Traitement des lymphocytes B normaux par Roténone, Plastoquinonyl-decyl-triphenylphosphonium Bromide (SkQ1), Dinitrophénol (DNP)**

Les cellules B ont été incubées pour une heure, avec différents types des antioxydants ou des inhibiteurs mitochondriaux : l'inhibiteur du complexe I mitochondrial, la Roténone 10  $\mu$ M (Sigma-

Aldrich) (Del Prete et al., 2008; Vene et al., 2010), ou l'antioxydant contenant de la plastoquinone spécifique ciblant les mitochondries, 10- (6 'plastoquinonyl) décyltriphénylphosphonium (SkQ1) 20 ng/ml (synthétisé par GA Korshunova et NV Sumbatyan, Institut Belozersky de Biologie Physico-Chimique, Université d'Etat de Lomonosov Moscou), ou le désamorçage mitochondrial 2,4-Dinitrophénol (DNP) 10  $\mu$ M. Ces différentes incubations des lymphocytes B ont été suivies par le traitement par Tat 250 ng/ml pour 6 heures. Des différentes expériences ont été réalisées après 6 heures du traitement.

### **3.4. Traitement des lymphocytes B normaux par les extraits bruts du VC et de l'EM**

Les cellules B ont été traitées par Tat 250 ng/ml seule ou en présence de 90  $\mu$ g/ml de l'extrait brut dissout dans le DMSO, de chaque plante (VC et EM) séparément, pendant 6 heures du traitement suivie par des différentes expériences.

Pour tester si les extraits bruts des plantes ont des effets toxiques sur les lymphocytes B, le test de cytotoxicité a été réalisé en utilisant le bleu de trypan, qui est un colorant vital utilisé pour colorer sélectivement les cellules mortes. Chez une cellule vivante, le bleu de trypan rentré est par la suite rejeté hors de la cellule, contrairement aux cellules mortes, dont il est prisonnier. Nous avons pu distinguer les cellules mortes qui ont été colorées en bleu alors que les cellules vivantes ne l'ont été pas.

Les cellules B ont été traitées par Tat 250 ng/ml en présence de 90  $\mu$ g/ml de chacun des extraits bruts de VC et de l'EM séparément, dissouts dans le DMSO. Après une incubation pendant 48 heures à 37 °C et à 5 % CO<sub>2</sub>, la viabilité des cellules B a été testée par le test de bleu de trypan en utilisant la machine de comptage des cellules Vi-CELL XR, Cell Counter - Beckman Coulter.

## **4. Test de détection des ROS et des radicaux libres et de potentiel antioxydant**

### **4.1. Détection des anions superoxydes totaux par marquage au Dihydroéthidium (DHE) dans les cellules B fixées**

Les niveaux de superoxyde ont été mesurés à l'aide de la sonde fluorescente bleue le Dihydroéthidium (DHE), qui est perméable aux cellules (kit MCH100111, « Muse Oxidative Stress, Millipore »). En présence de l'anion superoxyde, le DHE est rapidement oxydé en oxyéthidium, qui s'intercale à l'ADN et émet de la fluorescence rouge dans les gammes de 570-580 nm lorsqu'il est excité

à 488 nm. Les cellules B, après les traitements appropriés, ont été adhérentes sur des lamelles polylysines et rapidement lavées dans du PBS 0,3X (une minute), et par la suite fixées dans de paraformaldéhyde PFA à 4 % (Euromedex) dans du PBS 0,3X (10 minutes, à température ambiante) et incubées pendant 15 minutes dans l'obscurité et à température ambiante sous agitation douce, en présence du DHE diluée à 1 : 8000 dans le tampon de dilution 1X correspondant (solution intermédiaire 1/100 suivie d'une dilution finale au 1/80). Après l'incubation avec le DHE, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS 1X, montées à l'aide du milieu de montage Vectashield avec DAPI marqueur fluorescent des acides nucléiques (laboratoires vectoriels), et analysées sous un microscope à fluorescence (excitation/émission : 520/610 nm, fluorescence rouge). Les images des champs de vision adjacents ont été acquises en utilisant le logiciel Cartograph (Microvision), pour créer une carte d'image avec plusieurs champs adjacents d'acquisition. La fluorescence a été quantifiée à l'aide de logiciel ImageJ, normalisée au nombre de cellules après la coloration DAPI. Un minimum de 1000 à 2000 cellules a été analysé par condition. Après la soustraction de bruit de fond « background » en utilisant l'algorithme de « balle de roulement » ou « rolling ball algorithm » (Daugaard et al., 2013), la valeur de densité intégrée de chaque cellule a été mesurée automatiquement par le logiciel.

Dans les représentations graphiques des résultats, la valeur correspondant aux cellules B non traitées (utilisées comme témoin négatif) a été définie à 1 et la valeur des conditions testées était représentée par le changement par rapport au contrôle négatif.

Cette expérience a été effectuée sur les cellules B traitées par Tat 250 ng/ml pour une cinétique de 1, 6 et 12 heures, pour l'effet dose dépendante de Tat avec deux concentrations de 15 et 250 ng/ml après 6 h de traitement, pour l'expérience du traitement par Tat 250 ng/ml en présence de Tempol 10  $\mu$ M ou NAC 1 mM ou Roténone 10  $\mu$ M ou SkQ1 20 ng/ml ou DNP 10  $\mu$ M ou Bay 1 mM, pour l'expérience de traitement par TatC22 de 250 ng/ml après 6 h de traitement, ainsi que pour l'expérience du traitement par Tat 250 ng/ml en présence de 90  $\mu$ g/ml de l'extrait brut de chaque plante correspondante pendant 6 h. En plus, cette expérience a été réalisée sur les cellules B isolées du sang des patients infectés par le VIH.

## **4.2. Détection des anions superoxydes mitochondriaux par MitoSOX Red dans les cellules B vivantes**

Le réactif MitoSOX Red est un indicateur qui cible sélectivement les anions superoxydes mitochondriaux dans les cellules vivantes. Il est oxydé rapidement par l'anion superoxyde et non pas par d'autres dérivés réactifs de l'oxygène et dérivés réactifs d'azote. Le produit oxydé est extrêmement fluorescent en cas de liaison avec l'acide nucléique (fluorescence rouge émise).

Brièvement, après l'adhésion des cellules B sur des lames recouvertes de Poly-L-Lysine et le lavage avec du PBS 1X, elles ont été incubées pendant 20 minutes, à 37 ° C et à l'obscurité, avec 1,5 ml de solution de 5 µM comme concentration finale de MitoSOX Red diluée dans la solution stock de réactif (la concentration initiale de MitoSOX est de 5 mM) (Thermo Fisher). Ensuite, les cellules B ont été lavées doucement trois fois avec du PBS 1X chaud, puis colorées avec Hoechst et analysées à l'aide de deux différents types de microscope, confocal (Leica SP8) et fluorescent (Scanner Microvision instruments). Max d'absorption/émission : ~510 à 580 nm.

Cette expérience a été effectuée sur les cellules B traitées avec Tat 250 ng/ml seule ou en présence de l'antioxydant mitochondrial le SkQ1, 20 ng/ml après 6 heures de traitement.

## **4.3. Production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : dosage de peroxydase/peroxyde d'hydrogène par Amplex Red dans les cellules B vivantes**

Le kit d'essai Amplex Red contient le réactif Amplex Red (10-acétyl-3,7-dihydroxyphénoxazine) qui permet la détection de la concentration du radical libre le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou l'activité peroxydase. Le réactif Amplex Red, en présence de la peroxydase de raifort (HRP : « horseradish peroxidase »), a été utilisé pour détecter le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> libéré par les cellules. En outre, le réactif Amplex Red peut être utilisé pour le dosage ultrasensible de l'activité de peroxydase lorsque l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est en excès. En présence de peroxydase, le réactif Amplex Red réagit avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans un rapport stœchiométrique 1 : 1 pour créer le produit d'oxydation rouge fluorescent, la résorufine, qui présente une excitation et une émission maximale d'environ 571 nm et 585 nm.

La production de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les cellules B traitées par Tat 250 ng/ml pour 6 heures, a été quantifiée par l'essai Amplex Red (Sigma-Aldrich). Les cellules (7,5-10 x 10<sup>6</sup> cellules) ont été incubées dans la solution saline tamponnée au phosphate de Dulbecco (D-PBS) additionnée par le Dichlorure de Calcium (CaCl<sub>2</sub>) et le Dichlorure de Magnésium (MgCl<sub>2</sub>) avec de D-glucose (1 mg/ml), de HRP (0,5 U

ml; Roche) et Amplex Red (50 mM, Sigma-Aldrich). La fluorescence a été mesurée immédiatement dans un lecteur de microplaque (Victor3; PerkinElmer) à 37 °C pendant 40 minutes, en utilisant une excitation à 530 nm et une émission à 595 nm. La concentration de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> libérée (nmol.heure-1.10<sup>7</sup> cellules) a été quantifiée en utilisant des courbes d'étalonnage standards (Carré et al., 2015; Dmitriev et al., 2016).

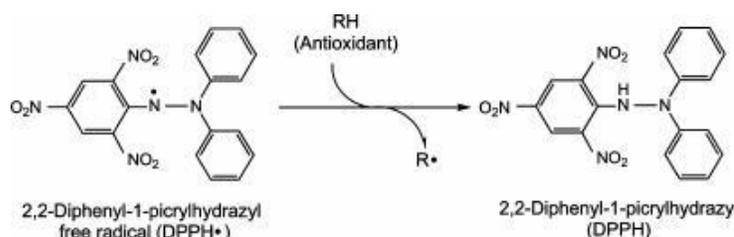
Cette expérience a été effectuée sur les cellules B traitées avec Tat 250 ng/ml seule après 6 heures de traitement.

#### 4.4. Etude de l'effet antioxydant des extraits des plantes par le test au DPPH'

Dans le but de la valorisation des extraits des plantes du VC et de l'EM en tant qu'antioxydants, la méthode du piégeage du radical libre stable le DPPH' a été appliquée pour mesurer l'activité antioxydante. Le test de la réduction du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH') est classifié parmi les principales méthodes d'évaluation de potentiel antioxydant des produits naturels, à cause de sa simplicité et sa sensibilité (Brand-Williams et al., 1995).

Ce radical libre possède un électron non apparié sur un atome de pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, i.e. DPPH' reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. Il s'agit d'une poudre cristalline de couleur violette pourpre foncée. En présence de piégeurs de radicaux libres (antioxydants), le DPPH' violet est réduit en 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl DPPH de coloration jaune.

La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette et l'apparition de la coloration jaune due à la réduction des radicaux DPPH'. Cette réduction peut être contrôlée à l'aide de spectromètre UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 515-517 nm (Molyneux, 2004). Voici ci-dessous, la réaction de piégeage du DPPH' par une molécule antioxydante (**Figure 19**).



**Figure 19.** La réaction de piégeage du DPPH' et sa conversion en DPPH par un composé antioxydant (RH).

Brièvement, la solution du DPPH<sup>•</sup> à 75 µM (dissout dans de l'éthanol absolu) a été préparée à l'avance (au moins 1 à 2 heures) car la solubilisation est difficile, et elle ne se conserve pas plus de 4 à 5 jours à -5 °C et à l'obscurité. Les fractions organiques et l'extrait brut de chaque plante ont été dissouts dans de l'éthanol absolu, 1 ml de chaque solution (de différentes concentrations : 50, 100, 200, 400, et 800 µg/ml) a été mélangé avec 1 ml de la solution éthanoïque du DPPH<sup>•</sup>. Le mélange réactionnel a été agité vigoureusement pendant 10 secondes. Après 30 minutes d'incubation à la température ambiante et à l'obscurité, les différentes solutions ont été transférées dans des cuvettes spécifiques pour la plaque de lecteur spectrophotométrique.

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, la détermination de la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % du DPPH<sup>•</sup>, a été calculée. L'activité est définie par l'indice de la réduction de l'activité anti-radicalaire en pourcentage SA % (Scavenger Activity), où l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant est reliée avec l'absorbance (Abs) du mélange sans aucun antioxydant (solution témoin ou contrôle) à un temps t, selon la formule  $SA \% = [1 - ((Abs \text{ échantillon} - Abs \text{ blanc}) / Abs \text{ négatif contrôle})] \times 100$  (A. Meddour, M. Yahia<sup>1</sup>, N. Benkiki<sup>1</sup>, 2013).

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (vitamine C) et la catéchine (dans notre cas).

Pour s'affranchir de l'influence de la concentration, dans la majorité des études, la réactivité est estimée par la concentration effectrice CE 50 de l'antioxydant, qui correspond à une réduction de 50 % de l'activité (de l'absorbance) du DPPH<sup>•</sup> dans le milieu réactionnel. La capacité antioxydant d'un composé est d'autant plus élevée que sa CE 50 est petite. L'indice CE 50 montre les concentrations de l'antioxydant qui sont nécessaires pour faire décroître la concentration initiale du DPPH<sup>•</sup> avec 50 % (exprimée en mol Antioxydant/mol DPPH<sup>•</sup> ou mg Antioxydant/g DPPH<sup>•</sup>).

Pour chaque fraction, un blanc (1 ml de l'échantillon + 1 ml de l'EtOH), un contrôle (1 ml EtOH + 1 ml DPPH<sup>•</sup>) et l'échantillon (1 ml de la fraction + 1 ml DPPH<sup>•</sup>) ont été préparés. Après la lecture spectrophotométrique et l'obtention des différentes densités optiques, les résultats ont été analysés selon la formule citée ci-dessus (SA %), à partir de la courbe d'étalonnage qui a été tracée avec les différentes concentrations testées. La concentration effectrice des contrôles positifs pour la réduction du DPPH<sup>•</sup> a

été de l'ordre de CE = 2,5 µg/ml. Tous les essais ont été effectués trois fois afin de vérifier la reproductibilité.

## **5. Test de détection des dommages de l'ADN dans les cellules B**

### **5.1. Test des comètes en condition alcaline et quantification des dommages de l'ADN**

Le test des Comètes ou « Single Cell Gel Electrophoresis Assay » en conditions alcalines, est défini comme une technique rapide, simple et sensible, qui permet d'évaluer *in-vitro* et *in-vivo* les cassures simple et double brin de l'ADN (Rydberg and Johanson, 1978).

Brièvement, le test des comètes en condition alcaline est réalisé à l'aide du kit Trevigen CometAssay kit (*Trevigen #4250050-k*) en utilisant des lames de 20 puits spécifiques au test des comètes, revêtues d'une fine couche d'agarose à point de fusion normal (20-well CometSlide™, *Trevigen #4252-500-01*), avec quelques modifications apportées suite aux optimisations du protocole.

Premièrement, les cellules B ont été lavées 2 fois avec du PBS 1X. La viabilité cellulaire est estimée par le test au bleu de Trypan à l'aide du compteur de cellules Vi-Cell (*Beckman-Coulter*) sachant qu'une viabilité de plus que 75 % est requise pour éviter les faux positifs. Les cellules ont été enfin récoltées et suspendues dans du PBS 1X pour effectuer le test des comètes.

L'agarose à faible point de fusion (LMAgarose©) a été tout d'abord fondu par chauffage à 95 °C pendant 5 minutes puis sa température est a été stabilisée à 37 °C pendant, au moins, 20 minutes afin que les cellules ne soient pas endommagées par ce facteur thermique. Les cellules ont été alors dispersées et suspendues dans cet agarose ( $10^5$  cellules/ml et à un ratio de 1/10 (v/v)). Puis, 50 µl du mélange ont été déposés sur chaque puits de la lame (*Trevigen CometSlide™*).

Les lames ont été alors placées à +4 °C à l'obscurité pour que l'agarose se gélifie tout en encapsulant les cellules. Les lames sont ensuite immergées pendant 1 heure à +4 °C dans une solution de lyse pré-refroidie composée de : 2,5 M Chlorure de Sodium (NaCl), 100 mM d'acide éthylène-diamine-tétra-acétique acide édétique (EDTA), 10 mM Trizma Base, 200 mM Hydroxyde de Sodium (NaOH), 1 % Triton 100X et 10 % Diméthylsulfoxyde (DMSO). L'étape de dénaturation de l'ADN fait suite à la lyse en incubant les lames dans une solution alcaline de dénaturation (200 mM NaOH, 1mM EDTA pH>13) pendant 1 heure à l'obscurité et à température ambiante. L'électrophorèse a été par la suite effectuée en condition alcaline à 21V 300 mA pendant 30 minutes et à +4 °C. La solution alcaline

d'électrophorèse a la même composition que la solution de dénaturation de l'ADN. Dans ces conditions, les cassures simples brin de l'ADN sont également révélées, contrairement à l'électrophorèse à pH neutre. Les lames ont été ensuite immergées deux fois dans de l'eau distillée dH<sub>2</sub>O pendant 5 minutes, puis dans l'éthanol à 70 % pendant 5 minutes pour bien fixer les cellules. Les lames sont alors séchées à 37 °C pendant 30 minutes. L'étape de séchage des lames permet d'avoir les comètes dans un seul plan facilitant ainsi leur visualisation. Finalement, 50 µL de SYBR Green diluée 10 000X dans le tampon TE (10 mM Tris-HCl pH=7,5, 1 mM EDTA) ont été déposés sur chaque puits, les lames ont été gardées pendant 10 minutes à +4 °C à l'obscurité, et enfin l'excès de la solution du SYBR Green a été éliminé et les lames ont été maintenues à l'obscurité et à température ambiante afin de permettre leur séchage complet. Toutes les étapes du test des comètes ont été effectuées à l'obscurité afin d'éviter toute source externe de dommages de l'ADN.

Pendant l'étape d'électrophorèse, les fragments de l'ADN endommagés migrent vers l'anode donnant l'aspect d'une queue de comète, par contre l'ADN non endommagé, vu sa taille plus grande, reste dans le noyau, formant ainsi la « tête » de la comète, d'où le nom de la technique « Test des comètes ». Plus les fragments de l'ADN sont petits, plus ils migrent rapidement et loin dans l'agarose. La quantité de l'ADN qui a migré révèle le degré d'endommagement de l'ADN. La quantité de l'ADN présente dans la tête ou dans la queue de la comète est directement proportionnelle à l'intensité du signal fluorescent, donc plus le signal dans la queue des comètes est fort, plus la quantité de l'ADN endommagé est importante.

La visualisation des comètes obtenues se fait au microscope à fluorescence (excitation maximale du SYBR Green : 494 nm, émission maximale à 521 nm, grossissement 20X). Des images comprenant au moins 100 comètes isolées par condition ont été prises et les dommages de l'ADN sont analysés à l'aide du logiciel Tritex CometScore, mesurant ainsi plusieurs paramètres de la comète dont : le pourcentage de l'ADN dans la queue des comètes, la longueur de la queue des comètes mesurée à partir de la pointe de la tête de la comète, et le moment de la queue des comètes (Tail Moment, TM) qui est le produit de la longueur de la queue des comètes par l'intensité de son signal fluorescent.

Dans le but de générer des résultats statistiquement significatifs, des valeurs moyennes issues d'au moins 100 comètes analysées par condition, ont été calculées.

Cette expérience a été effectuée sur les cellules B traitées avec Tat 250 ng/ml seule, avec une cinétique de 1, 6 et 12 heures de traitement.

## 5.2. Immunofluorescence des sites de $\gamma$ H2AX

Une parmi les techniques de détection des cassures double brin la plus courante, c'est le marquage par immunofluorescence de l'histone H2A variante X phosphorylée suite aux dommages de l'ADN ( $\gamma$ H2AX), particulièrement les cassures double brin (Kuo and Yang, 2008).

Dans le but de détecter la présence des cassures double brin dans les cellules B, ces derniers ont été purifiées et ensemencées sur des lamelles de 15 x 15 mm revêtues de Poly-L-lysine (20 minutes, 37 °C et 5 % CO<sub>2</sub>). Après l'adhésion, les cellules B ont été lavées avec du PBS 0,3X pour une minute, puis fixées avec du paraformaldéhyde à 4 % (Euromedex) dans du PBS à 0,3X (10 minutes, à température ambiante), suivi de 3 lavages dans du PBS 1X pour 5 minutes. Après les cellules ont été perméabilisées avec une solution de 2 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich #T8787), suivie de 3 lavages dans du PBS 1X pour 5 minutes. Après perméabilisation, les sites non spécifiques ont été bloqués avec 0,5 % de l'albumine de sérum bovin « Bovine serum albumin » (BSA) (Euromedex) dans du PBS 1X (40 minutes, à température ambiante) suivie par deux lavage avec du PBS 1X. Puis les cellules ont été marquées avec l'anticorps monoclonal de souris anti- $\gamma$ H2AX (anti-phospho-Ser 139 H2AX (Active Motif), dilution 1 : 500 dans 0,5 % BSA, pour deux heures à température ambiante. L'incubation avec l'anticorps primaire a été suivie par 3 lavages dans du PBS 1X et par une incubation d'une heure et à température ambiante, avec un anticorps secondaire conjugué à Alexa Fluor-488 (Life Technologies, 1 : 200). Après l'incubation, les cellules ont été lavées 3 fois par PBS 1X, et marquées par le milieu de montage Vectashield avec DAPI. Le marquage immunofluorescent a été visualisé par un microscope confocal, TCS SP8 (Leica Microsystems) avec un objectif d'immersion en huile 63X. Les piles Z ont été acquises en utilisant une taille de trame de 1024 × 1024 et de 0,5  $\mu$ m en z, avec un balayage multipiste séquentiel à l'aide de longueur d'onde de laser excitation/émission : 488/519 nm, fluorescence verte. L'analyse des images a été réalisée en utilisant le logiciel ImageJ.

Cette expérience a été effectuée sur les cellules B traitées avec Tat 250 ng/ml seule pour 1, 6 et 12 heures de traitement. Aussi pour les cellules B traitées avec Tat 250 ng/ml en présence de Tempol 10  $\mu$ M ou NAC 1 mM ou SkQ1 20 ng/ml ou Bay 1 mM, par Tat C22, 250 ng/ml seule, après 6 h de traitement, ainsi que pour l'expérience du traitement par Tat 250 ng/ml en présence de 90  $\mu$ g/ml de l'extrait brut de chaque plante correspondante pendant 6 h. Cette expérience a été réalisée aussi sur les cellules B isolées du sang des patients infectés par le VIH.

## **6. Détection de l'activation de NF-κB dans les cellules B**

### **6.1. Immunofluorescence**

Les mêmes étapes citées ci-dessus ont été suivies pour la détection de l'activation du NF-κB, en changeant les différents anticorps de détection. Dans cette partie, nous avons utilisé deux anticorps monoclonaux de lapin : le premier c'est contre la sous-unité phosphorylé P-RelA/NF-κB p65 (protéine phosphoRelA/NF-κB p65, Active Motif, 1 : 100), et le deuxième c'est contre le NF-κB total dans les cellules B (protéine NF-κB p65, Cell Signaling, 1 : 400). En ce qui concerne l'anticorps secondaire, nous avons utilisé l'anticorps conjugué à Alexa Fluor-488 (Life Technologies, 1 : 200).

Cette expérience a été effectuée sur les cellules B traitées avec Tat 250 ng/ml seule, ou avec Tempol 10 μM, ainsi qu'en présence de TatC22 à 250 ng/ml, après 6 heures de traitement.

### **6.2. Western blot**

Les fractions des nucléoprotéines et des protéines cytoplasmiques ont été préparées à partir de  $10^8$  de cellules B, en utilisant le kit d'extraction nucléaire et cytoplasmique Thermo Scientific NE-PER. Ce kit permet de réaliser efficacement la lyse des cellules et l'extraction de fractions de protéines cytoplasmiques et nucléaires séparées, en moins de deux heures.

Brièvement, les cellules B ont été collectées. Après centrifugation, les culots des cellules ont été suspendus avec du PBS 1X froid dans des tubes éppendorfs 1,5 ml. Deux centrifugations successives à 2500 RPM et à +4 °C pendant 5 minutes chacune, ont été réalisées, séparées par l'ajout de 100 μl de tampon sucrose (0,32 M saccharose, 10 mM Tris-HCl pH=8, 3mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM Acétate de Magnésium MgOAc, 0,1 mM EDTA, 0,5 % NP-40/H<sub>2</sub>O, 1 mM Dithiothréitol DTT et 0,5 mM de l'inhibiteur de protéase Phénylméthylsulfonyl fluorure (PMSF)). Après centrifugation, les surnageant ont été collectés contenant la fraction cytoplasmique (conservée à -80 °C jusqu'au moment d'utilisation).

En ce qui concerne la fraction nucléaire, les culots ont été ensuite lavés par 1 ml de tampon sucrose (sans NP-40, Sigma-Aldrich), puis après une centrifugation à 2500 RPM et à +4 °C pendant 5 minutes, les surnageant ont été jetés, et les culots ont été suspendus dans « Low Salt Buffer » (30 μl) : 20 mM Acide (4- (2-hydroxyéthyl) -1-pipérazine-éthanesulfonique) HEPES (pH=7,9), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Chlorure de Potassium KCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT et 0,5 mM PMSF. Puis, une agitation

douce a été effectuée, accompagnée avec l'ajout de 30 µl de « High Salt Buffer » : 20 mM HEPES (pH=7,9), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 800 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 1 % NP-40, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF et 4 µg/ml de protéases. Après une incubation pour 30 à 40 minutes dans la glace, une centrifugation à 16100 rpm pour 15 minutes à +4 °C a été effectuée. Après la centrifugation, les surnageant ont été collectés, contenant la fraction nucléaire (conservée à -80 °C jusqu'au moment d'utilisation).

Les protéines ont été quantifiées à l'aide du kit de dosage de protéines Pierce BCA (Thermo Scientific) avec une absorbance mesurée à 562 nm à l'aide d'une Nano-Drop 2000c (Thermo Scientific). Les fractions des protéines ainsi obtenues ont été mélangées avec le tampon d'échantillon NuPAGE LDS 4x (Thermo Scientific) et dénaturées à 85 °C pendant 10 minutes, puis chargées sur un gel de 4 à 12 % Bis-Tris (Thermo Scientific), pour une migration à 190 Volt (V) pour une heure à température ambiante. Les protéines ont été transférées à partir des gels sur des membranes PVDF (Merck Millipore) en utilisant une cellule de transfert demi-sèche (25 V pendant une nuit à +4 °C). Des transferts ont été révélés avec AmidoBlack et après lavage avec du H<sub>2</sub>O stérile ont été bloqués dans de BSA à 5 % (p/v) dans du SCT et à 0,1 % de Tween (1 heure, à température ambiante). Après trois lavages dans le TBS et 0,1 % de Tween (5 minutes, à température ambiante), la membrane a été incubée avec des anticorps contre la sous-unité Phospho-RelA/NF-κB p65 humaine (R & D Systems, 1 : 1000), et des anticorps de souris contre le marqueur cytoplasmique α-tubuline (Sigma, 1 : 1000) et le marqueur nucléaire la topoisomérase II (Merck Millipore, 1 : 10000) pendant deux heures à température ambiante avec une agitation douce. Après trois lavages dans 0,1 % de TBS et de 0,1 % de Tween, la membrane a été incubée pour une heure et à température ambiante, avec un anticorps secondaire anti-lapin conjugué à la peroxydase de raifort HRP (Jackson ImmunoResearch). Les transferts ont été révélés en utilisant le substrat « Immobilon Western Chemiluminescent HRP » (Millipore) et un ImageQuant Las 4000 mini (GE Healthcare). Les bandes obtenues ont ensuite été analysées par mesure de densité à l'aide du logiciel ImageJ. Pour la quantification, les niveaux de protéines dans les témoins ont été fixés à 1.

Cette expérience a été effectuée sur les cellules B traitées avec Tat 250 ng/ml seule après 6 heures de traitement.

## **7. Détermination de la concentration de Tat par Dot blot**

La concentration de la protéine Tat dans le sérum des individus infectés par le VIH a été déterminée par le test de point blot ou « dot blot assay ». Brièvement, chaque sérum a été filtré par le

filtre centrifuge ultra Amicon 0,5 ml (30 kDa, Merck Millipore, Darmstadt, Germany), selon les instructions de fabricant. Un volume de 2 µl des échantillons a été transféré sur une membrane de nitrocellulose et séché à température ambiante pour 15 minutes. Après blocage pour une heure, à température ambiante et avec agitation douce, dans 5 % BSA (p/v) dilué dans de tampon Tris salin (TBS, 200 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH=7,5), avec 0,1 % Tween, le blot a été lavé (5 minutes, à température ambiante) 3 fois dans 1 % BSA (p/v) dilué dans du TBS et 0,1 % Tween suivie par une incubation pour une heure avec agitation et à température ambiante, en présence de l'anticorps primaire de souris anti-Tat (Santa Cruz Biotech, Inc., Santa Cruz, CA, USA, dilution 1 : 500). Après trois lavages (chacune 5 minutes, à température ambiante) dans 1 % BSA (p/v) dilué dans TBS et 0,1 % Tween, le blot est ensuite incubé (40 minutes, à température ambiante) avec HRP conjugué à l'anticorps de souris anti - IgG (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA, dilution 1 : 1000). Les blots ont été détectés en utilisant le substrat « Immobilon Western Chemiluminescent HRP » (Merck Millipore) et l'ImageQuant Las 4000 Mini (GE Healthcare, Little Chalfont Bucks, UK). La courbe standard de Tat a été préparée en utilisant comme référence standard la protéine recombinante purifiée Tat obtenue de « NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, US ». Les échantillons et les dilutions de Tat pour la courbe standard, ont été faits en triplet pour chaque condition.

## **8. Cytométrie en flux FACS**

### **8.1. Détection de la pureté des lymphocytes B**

Pour vérifier la pureté des cellules B, la fluorescence tri cellulaire (FACS) est une méthode supérieure dans laquelle on peut suivre la pureté des populations cellulaires.

Le niveau de pureté des cellules B, suite au tri négatif à partir des PBMC, a été analysé par FACS en utilisant un double marquage B/T anti-CD19/anti-CD3, l'anticorps anti-CD19 marqué par l'Isothiocyante de fluorescéine FITC (Biolegend, marqueur à la surface des cellules B) et l'anticorps anti-CD3 marqué avec le Polyéthylène PE (BD Pharmingen, marqueur à la surface des cellules T).

### **8.2. Détection de l'apoptose dans les lymphocytes B**

Pour montrer que Tat n'induit pas les voies apoptotiques dans les cellules B, nous avons recours à la détection de l'induction de l'apoptose en utilisant le kit « The BD Pharmingen™ Annexin V FITC

apoptosis detection kit ». L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus physiologique normal pour l'élimination des cellules indésirables. L'un des premiers événements de l'apoptose c'est la translocation de la phosphatidylsérine membranaire (PS) du côté interne de la membrane plasmique vers la surface. L'annexine V, une protéine liant les phospholipides dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ , a une forte affinité pour la PS. L'annexine V est marquée au fluorochrome l'Isothiocyante de fluorescéine (FITC) peut être utilisée pour la détection de la PS exposée en utilisant FACS (Hingorani et al., 2011).

Brièvement, les cellules B ont été traitées par 250 ng/ml Tat pour 48 heures, puis après centrifugation à 300 g pour 5 min, les culots ont été suspendus dans du PBS 1X à un nombre de cellules égales à  $2.5 \cdot 10^5$  cellules/ml, puis 5  $\mu\text{l}$  de l'annexin V-FITC avec 5  $\mu\text{l}$  de l'iodure de propidium (IP) (un colorant vital utilisé pour l'identification des cellules. Les cellules viables avec des membranes intactes excluent l'IP, alors que les membranes des cellules mortes et endommagées sont perméables à l'IP). ont été ajoutés. Après incubation pour 5 minutes et à l'obscurité, la quantification par FACS a été réalisée (Excitation = 488 nm; Emission = 350 nm), en utilisant un détecteur de signal FITC (FL1) et une coloration PI par le détecteur de signal d'émission de phycoérythrine (FL2).

### **8.3. Détection des taux du Glutathionne (GSH) intracellulaire**

Le monochlorobimane MCIB (Sigma-Aldrich) est essentiellement une molécule non fluorescente. Il se conjugue facilement au groupement thiol dans des molécules comme le glutathion. Le conjugué monochlorobimane-GSH émet une fluorescence bleue violacée détectée a un maximum d'absorption/émission de 394/490 nm.

Après une heure de traitement des lymphocytes B par Tat 250 ng/ml, les cellules ont été lavées et suspendues dans du PBS 1X contenant 100  $\mu\text{M}$  du MCIB (Chen et al., 2008; Narasimhan et al., 2012; Vene et al., 2010). Après une incubation de 20 minutes à l'obscurité, à 37 °C et à 5 %  $\text{CO}_2$ , les cellules ont été lavées, et suspendues dans du PBS 1X froid, et marquées par l'iodure de propidium (agent intercalant des acides nucléiques), les mesures ont été effectuées immédiatement par la cytométrie en flux (CyAn, Beckman Coulter). Les résultats ont été analysés par Summit V4.3 software.

## 9. Détection de taux du GSH total intracellulaire et du rapport GSH/GSSG

Dans les cellules saines, plus de 90 % de la totalité du glutathion est sous sa forme réduite (GSH). Lorsque les cellules sont exposées à un stress oxydant, la forme oxydée GSSG s'accumule et le rapport GSH/GSSG diminue.

Pour détecter le taux du GSH total dans les cellules B traitées avec Tat 250 ng/ml, nous avons utilisé le kit GSH/GSSG Ratio Detection Assay Kit II (Fluorometric – Green-Abcam ab205811). Ce kit se base sur l'utilisation d'un colorant non fluorescent qui devient fortement fluorescent lors de la réaction directe avec le glutathion, et son signal peut être détecté facilement par un lecteur de microplaque à fluorescence à Excitation/Emission = 490/520 nm.

Brièvement,  $5 \times 10^5$  de cellules B ont été collectées, et lavées par du PBS 1X froid, après centrifugation, les culots ont été suspendus avec 100  $\mu$ l du PBS 1X/0,5 % NP-40, une homogénéisation rapide plusieurs fois a été accomplie, suivie d'une centrifugation pour 15 minutes à +4 °C à la vitesse maximale, en utilisant une micro-centrifugeuse froide pour éliminer toute matière insoluble. Puis les surnageant ont été collectés dans des nouveaux tubes (garder les tubes toujours dans la glace).

Les échantillons peuvent contenir des enzymes qui peuvent interférer avec l'analyse de taux du GSH. Dans le but de se débarrasser de ces enzymes, une « Deproteinizing » par l'acide trichloracétique TCA a été recommandée. La précipitation des protéines a été faite en ajoutant de TCA 100 % froid 1 volume pour 5 volumes des échantillons (p/v), mixée (par vortex) brièvement pour bien mélanger, puis incubée dans la glace pour 10 minutes. Une centrifugation à 12 000 x g pendant 5 minutes à +4 °C a été effectuée, dans un centrifugeur à froid et les surnageant ont été transférés dans des nouveaux tubes. Puis les échantillons ont été neutralisés en ajoutant du Bicarbonate de Sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ) au surnageant suivie d'un vortex brève. La neutralisation a été effectuée en ajoutant le  $\text{NaHCO}_3$  goutte à goutte jusqu'à ce que le pH se stabilise entre 4 à 6. Puis une centrifugation a été effectuée à 13 000 x g pendant 15 minutes à +4 °C suivie de la collection des surnageant utilisés pour la suite de l'expérience.

Deux courbes d'étalonnage ont été tracées, une en utilisant le GSH comme standard et l'autre la forme oxydée GSSG. Dans une plaque de 96 puits, 50  $\mu$ l des différentes dilutions des standards préparés fraîchement ainsi que 50  $\mu$ l des surnageant des échantillons préparés (en duplicata) ont été ajoutés. La plaque a été divisée en deux parties : une partie où 50  $\mu$ l de la solution GAM « GSH Assay Mixture » constituée de 100X Thiol Green diluée dans DMSO (1 : 100) a été ajoutée dans chaque puit contenant

les différentes dilutions de standard GSH ainsi que dans les puits contenant les différents échantillons (pour la détection du GSH), et une deuxième partie où 50 µl de la solution TGAM « Total GSH Assay Mixture » constituée de la sonde GSSG diluée dans la solution GAM (1 : 25) a été ajoutée dans chaque puit contenant les différentes dilutions de standard GSSG ainsi que dans les puits contenant les différents échantillons (pour la détection du GSH + GSSG). Une incubation à température ambiante pendant 10 à 60 minutes protégée de la lumière a été effectuée, suivie d'une mesure à l'aide d'un lecteur de microplaque à fluorescence avec une Excitation/Emission = 490/520 nm.

Le calcul de la concentration du GSH total et du rapport GSH/GSSG est détaillé dans le protocole correspondant au kit GSH/GSSG Ratio Detection Assay Kit II (Fluorometric – Green-Abcam ab205811).

## **10. Extraction d'ARN, Transcription inverse et Réaction en chaîne par polymérase quantitative (RT-qPCR)**

Les ARN totaux ont été extraits des cellules à l'aide du kit « Nucleospin RNA isolation kit II » (Macherey-Nagel #740955). La transcription inverse a été effectuée sur 100 ng d'ARN par échantillon, à l'aide de la transcriptase inverse « RevertAid Reverse Transcriptase » (Thermo Fisher #EP0441) selon le protocole décrit par le fournisseur afin d'obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc). Ensuite, la PCR a été réalisée sur 1 µl de l'ADNc en utilisant le « FastStart SYBR Green Master » (Roche #04673484001) contenant la Taq polymérase, les nucléotides ainsi que le marqueur fluorescent SYBR Green I, pour 1 µl de l'ADNc, 10 µl du FastStart SYBR Green Master mix a été mélangé avec 1 µl de l'amorce sens à 10 µM, 1 µl de l'amorce anti-sens à 10 µM et 7 µl d'eau stérile pour obtenir un volume final de 20 µl. Les réactions de PCR ont été effectuées sur le thermocycleur StepOne Plus (Life technologies) selon le programme suivant : une étape à 95 °C 10 minutes, suivie de 40 cycles d'amplification incluant une étape à 95 °C 15 secondes et une étape à 60 °C, 1 minute. L'expression relative de chaque gène a été calculée suivant la méthode de quantification  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Les amorces utilisées dans les expériences de RT-qPCR sont listées dans le (**Tableau 4**). Le gène de ménage choisi pour la normalisation des résultats d'expression des gènes, est la Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase GAPDH. Pour la quantification, les niveaux d'expression ont été mis à 1 dans les contrôles négatifs (cellules B non traitées).

**Tableau 4. Liste des amorces sens (F) et anti-sens (R) utilisées dans les expériences de RT-qPCR.**

	<b>Amorce sens 5'-3'</b>	<b>Amorce anti-sens 5'-3'</b>
<b>γ-GCS- HS</b>	AGGCCAGATACCTTTATGATCAGT	GCTGTCTATTGAGTCATATCGGGATTTAC
<b>γ-GCS- LS</b>	TGTCTTGGGAATGCACTGTATCTCATGC	TTCAATAGGAGGTGAAGCAATGATCAC
<b>GAPDH</b>	CTGCACCACCAACTGCTTAG	AGGTCCACCACTGACACGTT

## **11. Préparation des étalements chromosomiques et caryotype**

Cette expérience consiste que les cellules soient en phase de multiplication active. Dans cette manipulation nous avons cherché l'effet de la protéine Tat sur l'induction des aberrations chromosomiques dans les lignées cellulaires lymphoblastoïdes en culture. Les LCL RPMI 8866 (approximativement  $5 \cdot 10^6$ ), traitées ou non par Tat 250 ng/ml, ou Tat avec 10  $\mu$ M de Tempol ont été synchronisées dans la phase G2/M du cycle cellulaire pendant la nuit par un traitement avec l'inhibiteur de ROK-RO-3306 (Sigma-Aldrich), à la concentration finale de 5 $\mu$ M.

La première étape consiste à bloquer les cellules en métaphase afin de pouvoir observer les chromosomes. Pour cela, après rinçage avec du PBS 1X, les cellules ont été bloquées en métaphase par un poison du fuseau de division la Colcémide (concentration finale : 0,1  $\mu$ g/ml) à 37 °C pendant 45 minutes, ce qui empêche la progression de la mitose vers l'anaphase. Un autre lavage avec du PBS 1X a été fait pour les cellules. Pour obtenir un étalement correct des chromosomes, les cellules ont été remises en suspension délicatement dans 18 ml de la solution hypotonique KCl 75 mM préchauffée et incubées à 37 °C pendant 13 minutes (sorte d'un choc hypotonique entraînant le gonflement des cellules).

Ensuite les cellules enflées ont été préfixées par l'addition de 1 ml de la solution de fixation fraîchement préparée (3 : 1, méthanol : acide acétique) et incubées pendant 5 minutes à température ambiante. Après centrifugation (5 minutes, 150 rcf), les cellules ont été bien remises en suspension dans le fixateur (d'abord dans 0,5 ml pour permettre une bonne séparation des cellules les unes des autres, puis 6 ml ont été ajoutés) et incubées pendant 20 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été agglomérées par centrifugation pendant 10 minutes à 400 rcf, fixées à nouveau dans 6 ml de

fixateur glacé pendant 15 minutes à +4 °C, centrifugées pendant 10 minutes à 400 rcf (+4 °C) et remises en suspension dans 0,5 ml du fixateur glacé.

Les étalements mitotiques ont été préparés en déposant les cellules gonflées fixées sur une lame microscopique propre et sèche d'une hauteur d'environ 10 cm. La lame chromosomique résultante a été séchée à l'air et conservée à -20 °C jusqu'à utilisation. L'analyse chromosomique de la bande G a été réalisée à l'hôpital Saint Antoine-Paris-France, par Dr Chrystèle Bilhou-Nabera.

## **12. Acquisition et analyse des images microscopiques**

Les images suite au marquage avec le DHE et l'essai des comètes ont été acquises à l'aide d'un microscope à fluorescence (Scanner Microvision instruments) avec un objectif 20X. Pour créer une image complète de l'échantillon, les images des champs adjacents ont été assemblées à l'aide du logiciel Cartograph (Microvision). Les images suite au marquage par le MitoSOX Red et l'immunofluorescence de  $\gamma$ H2AX et de NF- $\kappa$ B ont été acquises avec un microscope confocal TCS SP8 (Leica Microsystems) avec un objectif d'immersion à l'huile 63X. Les piles Z ont été acquises en utilisant une taille de trame de 1024 x 1024 et des pas z de 0,5  $\mu$ m, avec un balayage multipiste séquentiel utilisant les longueurs d'onde laser de 405, 488 et 543 nm.

## **13. Analyses statistiques**

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 5,00 (GraphPad Software, San Diego California USA). Les résultats des différentes expériences sont analysés à l'aide de différents tests statistiques, suivant les paramètres des expériences, le test paramétrique de l'analyse de la variance (one-way analysis of variance, ANOVA) a été effectué afin de comparer 3 échantillons ou plus, le test paramétrique de Student (test t) « Student t-test/two-tail distribution » a été réalisé pour comparer strictement deux groupes des échantillons. Une valeur p (p-value) inférieure à 0,05 est considérée comme le seuil de la significativité des tests statistiques.

# *Résultats I*



## 1. La protéine Tat du VIH-1 induit des dommages de l'ADN dans les lymphocytes B du sang périphérique humain via la production des ROS mitochondriales

El-Amine R, et al. HIV-1 Tat protein induces DNA damage in human peripheral blood B-lymphocytes via mitochondrial ROS production. *Redox Biology* (accepted)

Les lymphomes B sont les types les plus courants de cancer lié au VIH (Gibson et al., 2014), ils sont responsables d'une mortalité significative chez les patients infectés par le VIH (Achenbach et al., 2014; Howlader et al., 2016b). L'incidence de certains sous-types de lymphomes spécifiques, reste élevé malgré la cART, y compris le DLBCL, le LB et le LH (Chao et al., 2010). Les mécanismes moléculaires d'oncogenèse de ces lymphomes sont très différents.

Il est connu que les patients du VIH ont un niveau élevé du stress oxydant, perturbant l'homéostasie redox, en augmentant la production des ROS et diminuant le taux des antioxydants y compris le GSH, dans les cellules infectées par le VIH. Le virus peut aboutir à ce déséquilibre redox par plusieurs mécanismes *via* le fait de ses protéines virales à caractère pro-oxydant, comme la glycoprotéine de l'enveloppe gp120, les protéines Vpr, Nef et Tat (Banerjee et al., 2010; Ivanov et al., 2016b). En effet, les cellules B ne sont pas parmi les cellules cibles du VIH, mais les protéines virales comme Tat, peut pénétrer librement dans les cellules non infectées (les cellules B) (Musinova et al., 2016; Romani et al., 2010b).

Tat est une petite protéine hydrophobe (~ 12 kDa) à l'intérieur de la cellule infectée, c'est un facteur de transcription qui peut réguler l'expression des gènes viraux et cellulaires (Dandekar et al., 2004). Tat a été détectée présente dans le sang des patients du VIH même après la cART. Elle est connue par son rôle pro-oxydant dans les cellules infectées (Capone et al., 2013; Gu et al., 2001; Lecoeur et al., 2012). Les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent oxyder l'ADN nucléaire (Hayyan et al., 2016; Klaunig et al., 1998). Ces lésions connus par les dommages oxydants causés à l'ADN sont considérées comme une source majeure des mutations et d'instabilité génomique dans les cellules (Barzilai and Yamamoto, 2004; Klaunig et al., 1998).

A partir de ces données de la littérature, nous nous sommes intéressés dans cette première partie à étudier le rôle pro-oxydant de la protéine Tat dans l'induction des DA dans les cellules B humaines non

infectées. Nous avons aussi étudié l'état du stress oxydant dans les cellules B isolées du sang des donneurs infectés par le VIH.

Ce chapitre de la partie « Résultats I » relate et résume le projet principal de ma thèse. J'ai effectué les tests de détection du stress oxydant (DHE, MitoSOX Red et Amplex Red), des expériences de détection de la concentration du GSH (MCIB et rapport GSH/GSSG), des expériences de détection des dommages de l'ADN (immunofluorescence  $\gamma$ H2AX et test des comètes), des RT-qPCR pour étudier l'expression des gènes régulateurs de l'état redox, des expériences de traitement par Tat et des différents antioxydants et inhibiteurs mitochondriaux, les expériences de l'activation du facteur de transcription nucléaire NF- $\kappa$ B (immunofluorescence et western blot) ainsi que l'expérience de dot blot pour étudier la concentration de Tat dans le sérum des patients du VIH.

**HIV-1 Tat protein induces DNA damage in human peripheral blood B-lymphocytes via mitochondrial ROS production**

Rawan El-Amine<sup>1,2,4,5,6</sup>, Diego Germini<sup>1,2</sup>, Vlada V. Zakharova<sup>1,2,3</sup>, Tatyana Tsfasman<sup>1,2</sup>, Eugene V. Sheval<sup>2,3</sup>, Ruy A.N. Louzada<sup>7</sup>, Corinne Dupuy<sup>7</sup>, Chrystèle Bilhou-Nabera<sup>9</sup>, Aline Hamade<sup>5</sup>, Fadia Najjar<sup>6</sup>, Eric Oksenhendler<sup>8</sup>, Marc Lipinski<sup>1,2</sup> Boris V. Chernyak<sup>2,3</sup>, and Yegor S. Vassetzky<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>UMR 8126, Paris Saclay University, Paris-Sud University, Institut Gustave Roussy, CNRS, Villejuif, 94805, France;

<sup>2</sup>LIA 1066 French-Russian Joint Cancer Research Laboratory, 94805 Villejuif, France – 119334 Moscow, Russia;

<sup>3</sup>A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia;

<sup>4</sup>Doctoral school of Sciences and technology (EDST), Lebanese University, Hadath-Lebanon;

<sup>5</sup>Department of Life and Earth Sciences, Faculty of Sciences II/Doctoral School of Sciences and Technology (EDST), Lebanese University, Jdeidet El Metn-Fanar, Lebanon;

<sup>6</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences II/EDST, Lebanese University, Jdeidet El Metn-Fanar, Lebanon;

<sup>7</sup>UMR 8200, Paris-Sud University, Institut Gustave Roussy, CNRS, Villejuif, 94805, France;

<sup>8</sup>Department of Clinical Immunology, Hôpital Saint-Louis, 75010 Paris, France;

<sup>9</sup>Biological Hematology Service-U.F. of Onco-Hematology Cytogenetics-Hôpital Saint-Antoine, 75012 Paris, France.

\*Corresponding author [vassetzky@igr.fr](mailto:vassetzky@igr.fr)

**Keywords:** HIV-1, Tat, oxidative stress, mitochondria, DNA damage, B-cell lymphomas

## **SUMMARY**

Human immunodeficiency virus (HIV) infection is associated with B-cell malignancies in patients though HIV-1 is not able to infect B-cells. The rate of B-cell lymphomas in HIV-infected individuals remains high even under the combined antiretroviral therapy (cART) that reconstitutes the immune function. Thus, the contribution of HIV-1 to B-cell oncogenesis remains enigmatic. HIV-1 induces oxidative stress and DNA damage in infected cells via multiple mechanisms, including viral Tat protein. We have detected elevated levels of reactive oxygen species (ROS) and DNA damage in B-cells of HIV-infected individuals. As Tat is present in blood of infected individuals and is able to transduce cells, we hypothesized that it could induce oxidative DNA damage in B-cells promoting genetic instability and malignant transformation. Indeed, incubation of B-cells isolated from healthy donors with purified Tat protein led to oxidative stress, a decrease in the glutathione (GSH) levels, DNA damage and appearance of chromosomal aberrations. The effects of Tat relied on its transcriptional activity and were mediated by NF- $\kappa$ B activation. Tat stimulated oxidative stress in B-cells mostly via mitochondrial ROS production which depended on the reverse electron flow in Complex I of respiratory chain. We propose that Tat-induced oxidative stress, DNA damage and chromosomal aberrations are novel oncogenic factors favoring B-cell lymphomas in HIV-1 infected individuals.

## INTRODUCTION

Despite recent advances in combined antiretroviral therapy (cART), the incidence of cancer remains high in HIV-infected individuals. B-cell lymphomas are the most common types of HIV-related cancer [1]; they also cause significant mortality in HIV-infected patients [2,3]. HIV-positive subjects have an increased risk to develop specific lymphoma subtypes including diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), Burkitt lymphoma (BL) and Hodgkin lymphoma (HL) [1,4,5]. Molecular mechanisms of these lymphomas are quite different. While BL has a defining translocation involving the *MYC* locus on chromosome 8 and one of the Immunoglobulin gene loci on chromosomes 2, 14 or 22 [6], DLBCL, the most common subtype of non-Hodgkin's lymphoma (NHL), is characterized by several translocations involving the immunoglobulin locus, including t(8;14), t(3;14), and t(14;18) [7,8]. However, a significant percentage of DLBCLs lack specific genetic abnormalities [9]. HL is characterized by increased genomic instability, even if some chromosomal aberrations and translocations involving the 3q27, 6q15, 7q22, 11q23, 14q32 loci occur with an increased frequency, there are no specific genetic aberrations that are characteristic for malignant transformation [10,11].

We have recently addressed the link between HIV and BL and have shown that HIV-1 transactivator of transcription (Tat) protein that is released by infected cells into the blood stream, could remodel the B-cell nucleus bringing together the potential translocation partners, the *MYC* and *IGH* loci thus increasing the probability of the t(8;14) translocation characteristic of BL [12]. At the same time, an increased occurrence of DLBCL and HL in HIV-infected individuals cannot be explained by the proposed mechanism as these lymphomas are associated with chromosomal translocations that are neither specific nor well defined, though remodeling of the nucleus was observed in HL cells [13]. We have hypothesized that HIV-1 Tat might play a role in oncogenesis of HL and DLBCL via an alternative mechanism(s).

Genome instability results from mutations and chromosomal rearrangements within the genome. These mutations can be the consequence of the accumulation of DNA damage (DD) [14]. There are different exogenous and endogenous sources of DD in the cells [15]; some of this damage is due to DNA exposure to free radicals and the reactive oxygen species (ROS) [16,17]. Oxidative DNA damage is a major source of mutation load and genomic instability [18,19] in cells. Double-stranded DNA breaks (DSBs) induced by ROS may be converted into chromosomal translocations [20–23].

In aerobic cells, ROS are generated during mitochondrial oxidative metabolism as well as in cellular response to UV radiation, xenobiotics, bacterial invasion and viral infection [24]; the mitochondria are thought to be the largest contributors to intracellular ROS production in most cell types [25–27]. Several enzymes in

mitochondria are potentially capable of producing ROS [28] with nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase (Complex I) playing an important role in this process (Hancock et al., 2001b). ROS participate in cell signaling as secondary messengers, at the same time, overproduction of ROS and the deficiencies in the antioxidant systems leads to oxidative stress (OS) (Butterfield et al., 2001) that may induce different OS-related human diseases [30]. ROS can induce oxidative DNA damage, a major source of the mutation load in living organisms, with more than one hundred oxidative DNA adducts identified. They include DNA strand breaks and oxidized base residues [31–34].

HIV pathogenesis triggers OS via several proteins including the envelope glycoprotein gp120, the Vpr, Nef and Tat proteins [35,36]. HIV-1 Tat is a small (~12 kDa) hydrophobic protein excreted by HIV-infected cells. Tat can penetrate other cell types, including B-cells [37,38]. Inside the cell, Tat can activate both viral and cellular genes [39–42]. Tat induces ROS production by activating NADPH and spermine oxidases in T-cells [43,44]. It may also induce mitochondrial membrane permeabilization and inactivation of cytochrome *c* oxidase [45]. ROS may in turn oxidize nuclear DNA leading to oncogenic transformation [19]. Indeed, when expressed in mice, Tat induces B-cell lymphomas [39,46].

Normally, living organisms tolerate the presence of ROS through the balance with the antioxidant defense system. The antioxidant system controlling ROS in living cells is divided into two groups: enzymatic and non-enzymatic antioxidants. The major intracellular non-enzymatic antioxidants are represented by the thiol groups, the most important is the glutathione (GSH) [47–50]. GSH concentration is strongly dependent on the organism, cell type and extracellular or intracellular compartments [51,52]. GSH exists in two forms, oxidized (GSSG) and reduced (GSH). The ratio of GSH/GSSG is used to measure cellular OS [53]. The reduced form of GSH exerts its antioxidant effect by providing an electron ( $e^-$ ) to ROS to neutralize them [54]. The diminution of GSH/GSSG ratio is one of the marker of human cancer (reviewed in [55]) and disease (reviewed in [56]). GSH synthesis is catalyzed by  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS).

After the disruption of redox homeostasis, OS can trigger the activation of different signaling pathways, and it can be detected by several markers. The nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B), a versatile transcription factor is one of the potential biomarkers for OS [57]. Interestingly, activation of NF- $\kappa$ B could regulate the redox state in the cells; it can be pro- or antioxidant, depending on the cellular model [58].

Here, for the first time, we have studied the effect of Tat on OS and DD in human B-cells that are not infectable by HIV and found that Tat induced mitochondrial OS in B-cells by modifying the intracellular GSH level and

transcriptional deregulation of some OS key regulator genes. This induced abnormal activation of NF- $\kappa$ B and DD in B-cells.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **HIV patients and controls**

Whole blood samples were obtained from eight HIV-positive individuals treated in the Department of Clinical Immunology, Hôpital Saint-Louis, Paris, France. In agreement with the French law, this study was registered as a non-interventional study at the Agence Nationale de Sécurité du Médicament (2016-A01316-45) and informed consent was obtained from all subjects. Their clinicopathological characteristics are summarized in Table 1. Blood samples were also obtained from healthy donors through the Etablissement Français du Sang, Rungis, France in accordance with the French national legislation.

### **Blood sample processing**

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from blood by Pancoll (PAN biotech) density gradient centrifugation. B-cells were purified by negative cell selection using the B-cell isolation kit II (Mac Milteny Biotec). Purity levels were determined by CD19 (Biolegend) and CD3 (BD Pharmigen) staining followed by FACS analysis. Purified B-cells were cultivated *in vitro* in the RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) in the presence of 1% penicillin/streptomycin (complete medium). B-cells from HIV-infected individuals were purified in a Biosafety Level 3 (BSL3) laboratory as described above.

### **B-cell treatment**

B-cells were plated at  $10^6$  per ml and treated with purified recombinant Tat protein produced by Ablinc and obtained through the NIH AIDS Research and Reagent Program. According to the manufacturer, the Tat protein was >95% pure and purified by heparin-affinity chromatography and reverse phase HPLC which removed endotoxins [59]. If not stated differently, Tat was used for all experiments at a concentration of 250 ng/ml. TatC22 is a mutant Tat protein with a 22 Cysteine → 22 Glycine substitution whose transactivation function was abrogated [60,61]. Produced by Abcam, the TatC22 recombinant protein was used at 250 ng/ml. Some Tat treatments of B-cells were performed in the presence of the ROS scavenger Tempol at a final concentration of 10  $\mu$ M (Sigma Aldrich) or N-acetylcystein at 1 mM (NAC; Sigma Aldrich) or the mitochondrial complex I inhibitor Rotenone at 10  $\mu$ M (Sigma Aldrich) or a specific mitochondria-targeting antioxidant 10-(6'-plastoquinonyl)decyltriphenyl-phosphonium (SkQ1) at 20 ng/ml (synthesized by G. A. Korshunova and N. V. Sumbatyan, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University) or the mitochondrial uncoupler 2,4-Dinitrophenol (DNP) at 10  $\mu$ M, or Bay 11-7082, a NF- $\kappa$ B inhibitor, at 1 mM (Calbiochem). B-cells were incubated with all mitochondria-targeting reagents for 1 hour prior to Tat treatment.

### **Microscope image acquisition and analysis**

DHE staining and Comet assay images were acquired using a fluorescent microscope (Scanner Microvision instruments) with a 20X objective. To create a full image of the specimen, images of adjacent fields were stitched together using Cartograph software (Microvision). Images of MitoSOXRed and  $\gamma$ H2AX staining were acquired using a TCS SP8 confocal microscope (Leica Microsystems) with a 63X oil immersion objective. Z-stacks were acquired using a frame size of 1024 $\times$ 1024, and 0.5  $\mu$ m z-steps, with sequential multitrack scanning using the 405, 488 and 543 nm laser wavelengths.

### **Immunofluorescence**

Purified B-cells were seeded on Poly-L-lysine-coated 15 $\times$ 15 mm coverslips (20 min, 37°C and 5% CO<sub>2</sub>). After adhesion, B-cells were washed with 0.3X PBS and fixed in 4% paraformaldehyde (Euromedex) in 0.3X PBS (10 min, RT) followed by 3 washes in 1X PBS. After blocking with 0.5% BSA (Euromedex) in 1X PBS (40 min, RT), cells were stained with mouse monoclonal antibodies against  $\gamma$ H2AX (phospho Ser139 H2AX, Active Motif, 1:500) or with rabbit monoclonal antibodies against NF- $\kappa$ B (phosphoRelA/NF- $\kappa$ B p65 protein, R&D Systems, 1:100), or with rabbit monoclonal antibodies against total NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B p65 protein, Cell Signaling, 1:400). Incubation with the primary antibodies (2 h, RT) was followed by 3 washes in 1X PBS and by incubation (1 h, RT) with a secondary antibody conjugated to Alexa Fluor-488 (Life Technologies, 1:200).

### **Alkaline Comet assay and scoring for DNA damage**

The alkaline comet assay was performed using the Trevigen CometAssay kit (Trevigen # 4250050-k) and 20-well CometSlide™ (Trevigen). Briefly, the cells were combined at 10<sup>5</sup>/ml with a molten low melting point agarose (LMAgarose) at 37°C at the ratio of 1/10 (v/v) and 50  $\mu$ l were deposited onto a 20-well pre-coated CometSlide™. The agarose was allowed to solidify by placing the slides at 4°C in the darkness for 15 minutes. The slides were then immersed in a pre-chilled lysis solution (Trevigen) for 1 h at 4°C to remove the membrane, cellular proteins and histones. Following lysis, the slides were incubated in a freshly prepared alkaline DNA unwinding solution (200 mM NaOH, 1 mM EDTA pH>13) for 1 h at room temperature. The slides were then subjected to electrophoresis at 21V for 30 minutes at 4°C in the same alkaline solution, washed twice with H<sub>2</sub>O for 5 minutes each, washed in 70% ethanol for 5 minutes, dried at 37°C for 30 minutes, and stained with 50  $\mu$ l of diluted SYBR Green solution (1/10 000 in TE buffer pH 7.5, Trevigen). The slides were allowed to dry completely at room temperature before observation under the epifluorescence microscope (Microvision instruments, using the 488 nm laser wavelengths, 20X zoom). Images of 100 randomly selected non-overlapping cells were captured and analyzed using Tritex CometScore software. A variety of measurements including the percentage of DNA in the tail (expressed as % of total DNA), the tail length (measured from the

leading edge of the comet head) and tail moment (the measure of tail length multiplied by tail intensity) were calculated to evaluate the extent of DNA damage. Mean values from at least 100 nuclei were used in calculations. All steps were conducted in the dark to minimize extraneous sources of DNA damage.

### **RT-qPCR**

For quantitative evaluation of gene transcription levels, total RNA was extracted from purified B-cells using the NucleoSpin® RNA II kit according to the manufacturer's recommendations (Macherey-Nagel). Total RNA (1 µg) was primed in a 20 µl reaction mixture with an oligo (dT) primer and reverse transcriptase (Thermo Scientific). The obtained cDNA was amplified using specific primers and the FastStart Universal SYBR Green Master mix (Sigma-Aldrich). Expression of target genes was analyzed using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method with normalization against GAPDH and comparison of expression between variously treated cells. For quantification, expression levels were set to 1 in controls. The following primer sequences were used: *gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit (gamma-GCS-HS)*, forward 5'-AGGCCAGATACCTTTATGATCAGT-3', reverse 5'-GCTGTCTATTGAGTCATATCGGGATTTAC-3'; *gamma-glutamylcysteine synthetase light subunit (gamma-GCS-LS)*, forward 5'-TGTCTTGGAATGCACTGTATCTCATGC-3', reverse 5'-TTCAATAGGAGGTGAAGCAATGATCAC-3'; *GAPDH* forward 5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3', reverse 5'-AGGTCCACCACTGACACGTT-3'.

### **DHE staining**

Superoxide levels were measured using the Dihydroethidium probe (DHE) (Muse oxidative stress kit, Millipore). In the presence of the superoxide anion, DHE is rapidly oxidized to oxyethidium, which binds DNA and emits light in the 570–580 nm ranges when excited at 488 nm. B-cells after appropriate treatments were rapidly washed in 0.3X PBS, fixed in 4% paraformaldehyde (Euromedex) in 0.3X PBS (10 min, RT) and incubated in a DHE-containing ROS staining solution diluted to 1:8000 in a proprietary assay buffer for 15 minutes in the dark at room temperature while shaking, washed 3 times with 1X PBS, mounted using a DAPI mounting medium (Vector laboratories) and observed under a fluorescent microscope (excitation/emission: 520/610 nm, red fluorescence). Images from adjacent fields were stitched together by using Cartograph software (Microvision) to create one large image of the specimen. The fluorescence of at least 1000 cells per sample was quantified using ImageJ software, normalized to cells number following DAPI staining. After background subtraction using the "rolling ball" algorithm [62], the integrated density value of each cell was measured automatically by the software.

In the graphical representations, the value corresponding to untreated B-cells (used as negative control) was set as 1 and the value of the tested conditions was represented as the fold change compared to the negative control.

### **Amplex red assay**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation by Tat-treated B-cells was quantified by the Amplex red/horseradish peroxidase assay (Sigma Aldrich). Cells (7.5-10 x 10<sup>6</sup>) in the Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS) supplemented with CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub> were incubated with D-glucose (1 mg/ml), horseradish peroxidase (0.5 U/ml; Roche), and Amplex red (50 mM; Sigma Aldrich); the fluorescence was immediately measured in a microplate reader (Victor3; PerkinElmer) at 37°C for 40 min using excitation at 530 nm and emission at 595 nm. Released H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration (nmol.hour<sup>-1</sup>.10<sup>7</sup> cells) was quantified using standard calibration curves [63,64].

### **MitoSOXRed staining**

After adhesion on Poly-L-Lysine coated slides, and washing with 1X PBS, B-cells were incubated in darkness with 1.5 ml of 5 μM solution of MitoSOXred (Thermo Fisher) for 20 minutes at 37°C. The B-cells were then washed gently three times with warm 1X PBS, stained with Hoechst, and analyzed using confocal (Leica SP8) and fluorescent (Scanner Microvision instruments) microscopes.

### **GSH and GSH/GSSG ratio determination**

Total glutathione concentrations were measured in B lymphocytes isolated from the blood of healthy donors using GSH/GSSG Ratio Detection Assay Kit II (Abcam #205811), according to the manufacturers' protocol.

### **Flow cytometry**

After Tat treatment, cells were washed and resuspended in 1X PBS containing 100 μM monochlorobimane (MCIB) (Sigma-Aldrich), to measure the intracellular GSH level [65–67]. After incubation for 20 min in the dark, cells were washed, resuspended in 1X PBS, and MCIB fluorescence was immediately measured using a flow cytometer (CyAn, Beckman Coulter) and analyzed by using Summit V4.3 software.

### **Western blot**

Nuclear and cytosolic protein fractions were prepared from 10<sup>8</sup> B-cells using the NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents kit (Thermo Scientific) following the manufacturer's instructions. The proteins were quantified using the Pierce BCA protein assay kit (Thermo Scientific) with absorbance measured at 562 nm with a Nano-Drop 2000c (Thermo Scientific). The protein fractions thus obtained were mixed with the NuPAGE LDS Sample Buffer 4x (Thermo Scientific), denatured (85°C, 10 min), loaded onto a 4-12% Bis-Tris gel (Thermo Scientific) and run at 190 V for 1 hour at RT. Proteins were transferred from the gels onto PVDF membranes (Merck Millipore) using a semi-dry transfer cell (25 V overnight at 4°C). Blots were

revealed with AmidoBlack and after washing with sterile H<sub>2</sub>O blocked in 5% (w/v) BSA in TBS and 0.1% Tween (1 h, RT). After three washes in TBS and 0.1% Tween (5 min, RT), the membrane was incubated with antibodies against human Phospho-Rel A/NF- $\kappa$ B p65 (R&D Systems, 1:1000), mouse antibodies against  $\alpha$ -tubulin (Sigma, 1:1000) or human Topoisomerase II (1:10000, Merck Millipore) for 2h at RT with gentle rocking. After three washes in 0.1% TBS with 0.1% Tween, the membrane was incubated (1h, RT) with an anti-rabbit secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch). Blots were revealed using Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore) and an ImageQuant Las 4000 mini (GE Healthcare). The obtained bands were then analyzed by density measurement using the ImageJ software. For quantification, protein levels in controls were set to 1.

### **Preparation of chromosome spreads**

Lymphoblastoid cell line RPMI8866 was kindly provided by Joelle Wiels (UMR 8126-CNRS, Villejuif, France). Cells were cultivated in the RPMI medium supplemented with 10% heat inactivated FCS, 1% of L-Glutamine, 1% Sodium Pyruvate, 2% Glucose, Plasmocin 2.5 mg/ml, 1% penicillin/streptomycin (complete medium). They were treated with Tat or Tat together with Tempol at the indicated concentrations or left untreated for 5 days. Chromosome spreads were prepared as previously described [68] and analyzed at the Hôpital Saint Antoine-Paris, France.

### **Statistical analyses**

Comparisons between more than two averages were performed using the Bonferroni's post-test based on the results generated using the one-way Anova test. The Student t-test (two-tail distribution) was used to compare means between only two samples. All tests were performed using the Graphpad Prism 5 software (Graphpad software).

## RESULTS

### Tat induces ROS and oxidative DNA damage in B-cells

The HIV-1 Tat protein is present in blood of infected individuals in concentrations ranging from 1 to 500 ng/ml and can penetrate into uninfected cells (Xiao et al., 2000; Rayne et al., 2010; Zhong et al., 2010). We have tested whether Tat could induce ROS production in B-cells. B lymphocytes purified from blood of healthy donors were treated with 250 ng/ml of purified Tat protein for various times and then analyzed for the presence of ROS. To this aim, untreated and Tat-treated B-cells were stained with the ROS sensor Dihydroethidium (DHE) which, in the presence of ROS, is converted to the red fluorescent compound oxyethidium [72,73]. The integrated density of red fluorescence was quantified automatically using an ImageJ algorithm and normalized to cells numbers, as described in Material and Methods. In Tat-treated cells, ROS level increased with time, reaching a peak at 6 h, compared to the controls ( $1.8\pm 0.1$ -fold higher;  $p<0.001$ ) (**Figure 1A**). Representative images of DHE staining of Tat-treated and the control cells are shown in **Figure 1B**. A basal level of ROS staining is observed in untreated B-cells, because the production of ROS is common to all aerobic cells [74]. The observed effect of Tat was dose-dependent (**Figure 1C**). We next confirmed that Tat induced a significant level of ROS using a complementary approach, Amplex Red assay to detect  $H_2O_2$  production [63,64]. The concentration of  $H_2O_2$  released by the Tat-treated B-cells after 6 h of treatment, was significantly higher than that released by the untreated controls ( $p<0.05$ ; **Figure 1D**).

A significant share of DNA damage occurring in living cells is caused by ROS [75,76]. ROS-induced DD can lead to development of pathological conditions, including cancer [30,77]. We next used  $\gamma$ H2AX staining to test whether Tat could induce DSBs in B-cells. Indeed, the number of Tat-treated B-cells showing  $\gamma$ H2AX staining was  $1.63\pm 0.02$ -fold higher than in the untreated controls at 6h ( $p<0.001$ ; **Figure 1E**); this coincided with the maximal ROS production in Tat-treated B-cells. Representative images of the  $\gamma$ H2AX staining are shown in **Figure SA**. This result was confirmed using the single cell alkaline gel electrophoresis (Comet assay). In this experiment, the level of DNA damage was  $2.1\pm 0.2$  times higher in Tat-treated B-cells compared to the controls ( $p<0.001$ ; **Figure 1F**, **Figure SB**).

In order to test whether there is a link between Tat-induced ROS and DNA damage, we have next simultaneously treated B-cells with Tat and 10  $\mu$ M of the ROS scavenger Tempol or 1 mM of the antioxidant L-N-acetylcysteine (NAC). Tat can induce neither ROS production (**Figure 1G**) nor DD (**Figure 1H**) in the presence of Tempol or NAC. These results indicate a direct link between Tat-induced ROS production and oxidative DNA damage. We also observed that Tat induced a higher number of chromosomal abnormalities in a

lymphoblastoid B-cell line RPMI8866 compared to the untreated control ( $1.25 \pm 0.05$  fold;  $p < 0.05$ ). This effect was reduced by Tempol treatment (**Figure 1D**).

#### **OS and DD are present in B-cells from HIV-infected individuals**

We next analyzed the OS status and the presence of DD in B-cells isolated from blood of eight different HIV-infected patients. We found that B-cells of HIV-positive subjects had a significantly higher level of OS as compared to the healthy controls ( $2.2 \pm 0.2$ -fold;  $p < 0.001$ ; **Figure 2A**). We next evaluated the level of DD in HIV-infected individuals vs. healthy donors by  $\gamma$ H2AX staining and found out that in HIV patients, the level of DD was increased  $7.4 \pm 0.8$ -fold on average ( $p < 0.001$ ; **Figure 2B**). We have also found that Tat was present in blood of these HIV patients in concentration ranging from 1 to 10 ng/ml (**data not shown**).

#### **Tat induces mitochondrial OS in B-cells**

Mitochondria are one of the most important sources of ROS in the cells and it was shown that Tat could perturb the normal mitochondrial function that in turn could regulate the redox state of the cells [78–80]. To test whether Tat induced mitochondrial ROS production in B-cells, we used rotenone (10  $\mu$ M), an inhibitor of the mitochondrial complex I, SkQ1 (20 ng/ml), a specific mitochondria-targeting antioxidant [81,82] and 2,4-dinitrophenol (DNP) (10  $\mu$ M), an uncoupler of oxidative phosphorylation [83]. We treated B-cells with these different molecules simultaneously with 250 ng/ml Tat for 6h and observed that Tat-induced ROS production was inhibited in their presence to the control levels, indicating that mitochondria were a source of ROS in Tat-treated cells (**Figure 3A**).

We further ascertained the mitochondrial nature of Tat-induced ROS using MitoSOXRed, a specific mitochondrial superoxide indicator for living cells. B-cells were treated with 250 ng/ml Tat for 6h, stained *in vivo* with the MitoSOXRed, visualized by confocal microscopy and analyzed as described in Materials and Methods. Stronger MitoSOXRed staining was observed in Tat-treated cells compared to the untreated control (**Figure 3B, Figure 3C**). In Tat-treated cells, MitoSOXRed fluorescence representing the level of mitochondrial superoxide anion was  $3.7 \pm 0.2$  times higher than in the control B-cells ( $p < 0.001$ ). Addition of 20 ng/ml of SkQ1 prior to Tat treatment reduced the level of the mitochondrial superoxide to the basal level ( $1 \pm 0.1$  relative to the untreated controls; **Figure 3C**). These results confirmed the mitochondrial origin of Tat-induced ROS production. We next confirmed that Tat-induced mitochondrial ROS production was implicated in the oxidative DD. We evaluated the number of  $\gamma$ H2AX positive B-cells treated with 250 ng/ml of Tat and B-cells treated with Tat and 20 ng/ml of SkQ1. Inhibition of mitochondria-derived ROS by SkQ1 also reduced DD to basal levels thus confirming our hypothesis (**Figure 3D**).

### **Tat induces glutathione deficiency in B-cells**

ROS production is usually kept under control through a finely regulated balance between pro-oxidant and anti-oxidant factors, including GSH [84–86]. We next quantified the intracellular levels of reduced GSH, the most abundant non-protein thiol, using monochlorobimane (MCIB), a cell-permeant probe for the detection of thiol groups. Tat-treated and untreated B-cells were stained by MCIB as described in Materials and Methods and analyzed by FACS. We observed depletion of GSH in Tat-treated cells as early as 1h after the beginning of Tat treatment ( $p < 0.01$ ) (**Figure 4A**). We next analyzed the concentration of total GSH (GSH+GSSG) and the GSH/GSSG ratio in B-cells treated with Tat. Both values decreased after Tat treatment (**Figure 4B, C**, respectively).

As Tat is a transcriptional activator known to regulate hundreds of host cell genes [41,42], we next tested whether Tat could affect expression of genes involved in GSH synthesis. Indeed, 1h after addition of Tat to B-cells, the level of expression of the light and heavy subunits of the gamma-glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS) decreased  $3.57 \pm 0.06$  and  $2.7 \pm 0.03$  fold, respectively (**Figure 4D**).

HIV-1 Tat has a pronounced transcriptional activity, but it can also affect host cells by interacting with a multitude of proteins (Van Duyne et al., 2009; Gautier et al., 2009, reviewed in Musinova et al., 2016). To prove that transactivation activity of Tat is essential for ROS induction, we treated isolated B-cells with a mutated form of the Tat protein (TatC22) where a cysteine is substituted by a glycine in the position 22. This mutation abolishes the transcriptional activity of Tat [60,89]. Addition of TatC22 to isolated B-cells from healthy donors induced neither ROS production (**Figure 4E**), nor DD (**Figure 4F**). TatC22 also failed to downregulate GSH levels and to affect the expression of oxidative stress related genes (**data not shown**), suggesting that the transcriptional activity of Tat is essential for induction of OS and DD.

### **Pro-oxidant effect of Tat-activated NF- $\kappa$ B in B-cells**

NF- $\kappa$ B is a versatile transcription factor that is often upregulated and activated in HIV-infected cells [38]. NF- $\kappa$ B controls and regulates several cellular processes including ROS balance [58]; it can also be regulated by OS [90]. When activated, NF- $\kappa$ B p65 subunit relocalizes into the nucleus and may induce pro- or antioxidant pathways, depending on the cellular context [91,92]. We have first analyzed the presence of nuclear NF- $\kappa$ B p65 in Tat treated or untreated B-cells. We used anti-NF- $\kappa$ B p65 monoclonal antibody to detect by immunofluorescence the nuclear NF- $\kappa$ B, and we found that the number of nuclei with NF- $\kappa$ B-p65 staining was  $1.61 \pm 0.33$  times higher in Tat-treated B-cells as compared to the negative control ( $p < 0.001$ ; **Figure 5A**).

Phosphorylation of RelA/p65 subunit at serine residues 276, 529, and 536 facilitates its nuclear translocation [93,94] and is involved in the response to OS [95]. We next tested whether the phosphorylated form of RelA/p65 was translocated into the nuclei in Tat-treated B-cells. We prepared cytosolic and nuclear protein extracts and used Western blot analysis to analyze the relative nuclear vs. cytosolic localization of RelA/p65 subunit. After 6 hours of Tat treatment, the nuclear abundance of the phosphorylated RelA/p65 (S536) was  $6.4 \pm 0.08$  fold higher in Tat-treated cells than in the control B-cells ( $p < 0.001$ ; **Figure 5B**). Interestingly, the use of Tempol diminished Tat-induced NF- $\kappa$ B activation, suggesting that Tat-induced ROS were essential for this effect (**Figure 5C**). Moreover, NF- $\kappa$ B activation by Tat was also dependent on its transactivation activity as TatC22 did not induce nuclear relocalization of NF- $\kappa$ B (**Figure 5C**).

To understand whether NF- $\kappa$ B played a pro- or antioxidant role in Tat-treated B-cells, we used Bay 11-7082, an inhibitor of I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and therefore of NF- $\kappa$ B activation [96]. Neither ROS induction nor DD were observed in B-cells treated simultaneously with 250 ng/ml Tat and 1 mM Bay 11-7082 (**Figure 5D, E**, respectively); thus abnormal activation of NF- $\kappa$ B played a pro-oxidant role in Tat-treated B-cells.

## DISCUSSION

This study addresses a puzzling question of HIV-associated B-cell oncogenesis by linking HIV-1 Tat to oxidative DNA damage (DD) and genomic instability that are important features of cancer cells. HIV-1 does not infect B-cells, but most HIV-related lymphomas are of B-cell origin [1]. Several mechanisms were proposed to explain this phenomenon, the most important being the depletion of T-lymphocytes. Indeed, lower CD4 counts were associated with B-cell lymphomas [97]. While introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) has been associated with a decrease in AIDS-associated malignancies [98], HIV-infected persons still have an increased risk to develop specific lymphoma subtypes including DLBCL, BL and HL [1,4,99]. Several HIV proteins have been proposed to promote DD and genomic instability in infected cells (reviewed in Musinova et al., 2016; Ryan et al., 2016). However, their overall oncogenic effect on B-cells is likely to be limited, given that HIV-1 does not infect B-cells. One exception from this is the HIV-1 Tat protein that is secreted into blood by infected cells. Tat is able to transduce B-cells (Romani et al., 2010). We have recently shown that Tat could affect expression of several host genes and induce spatial proximity between potential translocation partners in BL, the *MYC* and *IGH* gene loci [12]. We have hypothesized that HIV-1 Tat might play a role in oncogenesis of other HIV-related B-cells lymphomas via an alternative mechanism(s), e.g. by inducing DD and genetic instability in B-cells. Indeed, we have shown that B-cells of HIV-infected individuals had a significantly higher level of DD as compared to healthy controls. We have further demonstrated that incubation of HIV-1 Tat alone was sufficient to initiate a cascade of events that eventually resulted in the generation of DSBs. The capacity of Tat to induce an oncogenic phenotype is substantiated by the increased frequency of B-cell lymphomas in mice expressing Tat [39,46].

Like many viruses, HIV-1 initiates OS in infected cells. However, HIV-1-infected cells may induce OS in uninfected cell types through the release of low molecular weight mediators or secreted proteins, including Tat [101]. The increased levels of ROS, together with the reversal of DD by treatment with antioxidants, including mitochondria-targeting ones, demonstrate that Tat promotes genomic instability via induction of mitochondrial ROS. Previously, high levels of OS were reported in cells infected with HIV-1 [35,36]. Tat was shown to induce ROS production by activating NADPH and spermine oxidases and mitochondrial membrane permeabilization and inactivation of cytochrome *c* oxidase in T-cells [43–45]. Tat can also induce OS by down-regulation of the antioxidant mechanisms. Here we have shown that Tat induced mitochondrial ROS generation and a simultaneous decrease in cellular GSH/GSSG ratio in B-cells. Our data are in agreement with the previous study where Tat was found to reduce the GSH/GSSG ratio in brain endothelial cells [102]. B-cells have a limited uptake capacity for extracellular cystine [103], a rate-limiting substrate for GSH synthesis, as well a low level of gamma-glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ GT) expression [104,105]. This could explain the low level of

reduced GSH detected in this study and high sensitivity of B-cells to OS. Moreover we have observed downregulation of expression of the two subunits (light and heavy) of the gamma-glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS) after addition of Tat to B-cells explaining reduction of total glutathione content. In this study, we demonstrated for the first time, the pro-oxidant effect of Tat via depletion of reduced GSH, total GSH and the GSH/GSSG ratio in B-cells.

This in turn triggered NF- $\kappa$ B activation that further enhanced OS and DD. In addition to induction of oxidative DD, ROS may also oxidize other cellular molecules including proteins and lipids thus altering signaling cascades that regulate cell growth, differentiation and apoptosis. Through the induction of ROS, Tat may promote transformation by initiating signaling cascades that are further activated by other factors, for example by NF- $\kappa$ B. Tat can act on several key elements in the signaling pathway of NF- $\kappa$ B. A direct physical interaction between Tat and the I $\kappa$ B $\alpha$  inhibitor has been demonstrated; Tat competes with the I $\kappa$ B, trapping it, leading to the release of NF- $\kappa$ B into nucleus [106]. Moreover, Tat can also interact directly with the p65 subunit of NF- $\kappa$ B; this promotes the p65 DNA-binding affinity and the transcriptional activity [107,108]. In addition Tat can bind to the enhancer element of the promoter of certain NF- $\kappa$ B-regulated genes promoting the recruitment and the activation of NF- $\kappa$ B [40,109]. In our case, transcriptional activity of Tat rather than protein-protein interactions was required to activate NF- $\kappa$ B.

Our findings suggest that the induction of DD and genomic instability by ROS in B-cells may be unwanted consequences of the strategy used by HIV to infect T-cells, as ROS as second messengers initiate a cascade for NF- $\kappa$ B activation; NF- $\kappa$ B controls transcription of genes involved HIV replication and this increases the replication of HIV [110]. Conversely, DD produced by ROS favors HIV integration of into the host genome [111].

Immunization with Tat is proposed as one of the HIV vaccination strategies [112]. Our study shows that this approach may have potentially dangerous consequences. The use of antioxidants was proposed as a potential therapy of the HIV infection for many years (reviewed in Aquaro et al., 2008), although conflicting evidence for their beneficial effect was obtained so far. Here we have shown that Tat induced mitochondrial ROS. New generation of antioxidants specifically targeting mitochondria is currently being developed [114–116]. Their use may allow for further advances in understanding the processes involved in HIV-induced oncogenesis. The use of recently developed Tat inhibitors [117] may also potentially reduce the occurrence of HIV-related lymphomas. Further studies of the mechanisms linking the HIV-1 Tat, ROS and DD in B-cells are required if potential targets for therapy/prevention are going to be developed.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This research was supported by grants from ANRS, INSERM (ENVIBURKITT), La Ligue Contre le Cancer (M27231) to YSV, the Russian Foundation for Basic Research (16-54-16001) to EVS and the Russian Scientific Foundation (14-24-00107) to BC. TT was a recipient of the ANRS fellowship. 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.

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1. HIV-1 Tat protein induces oxidative DNA damage via ROS production.

(A) ROS production in Tat-treated and untreated B-cells. ROS production was detected in human B-cells isolated from peripheral blood of healthy donors and treated with 250 ng/ml Tat for 1, 6 and 12 h by DHE staining as described in Materials and Methods. The Y axis shows the ROS level in treated B-cells compared to the untreated control, for which the obtained basal value was set as 1. At least 1000 cells were analyzed for each condition, and quantified using the ImageJ algorithm normalized to cells number. The experiments were carried out in duplicate.

(B) Representative images of DHE-stained B-cells in the presence or absence of Tat for 6 h. The intensity of red fluorescence reflects the level of ROS in B-cells. DAPI is shown in blue and oxyethidium in red. Scale Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

(C) Tat induces ROS production in a dose-dependent manner. ROS production was detected by DHE staining in cells treated with 15 and 250 ng/ml Tat for 6h. The Y axis shows the ROS level in treated B-cells compared to the untreated control, for which the obtained basal value was set as 1. The fluorescence intensity was calculated from a minimum of 1000 cells examined for each condition. The experiments were carried out in duplicate.

(D) Detection of ROS in Tat-treated cells with the Amplex red assay. The concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  released in  $\text{nmol}\cdot\text{hour}^{-1}\cdot 10^7$  cells by B-cells treated with 250 ng/ml Tat and untreated B cells after 6h is represented on Y axis. The experiments were carried out in duplicate.

(E) Tat induces DNA damage in B-cells. The Y axis shows the proportion of B-cells treated with 250 ng/ml Tat for 6h and exhibiting  $\gamma\text{H2AX}$  staining compared to the negative control, for which the obtained basal value was set as 1. A minimum of 300 cells were examined per time point. The data are means  $\pm$  SEM from at least three fields with B-cells from a single donor at every time point except at 6h, when experiments were repeated on B-cells from three different healthy donors.

(F) Kinetic analysis of Tat-induced DNA Damage by Comet Assay. B-cells were treated with 250 ng/ml Tat for 1, 6 and 12 h. The Y axis shows the tail moment representing the level of DNA damage in Tat-treated B-cells compared to the controls, for which the obtained basal value was set as 1. The experiment was performed on B-cells from three different healthy donors. At least 100 nuclei were analyzed in each experiment.

(G) ROS scavenger Tempol and the antioxidant NAC inhibit Tat-induced ROS production. The Y axis shows ROS production in B-cells treated with 250 ng/ml Tat alone or with 10  $\mu\text{M}$  Tempol or 1 mM NAC for 6h compared to the untreated control, for which the obtained basal value was set as 1. The experiment was performed on B-cells from two different healthy donors.

**(H)** ROS scavenger Tempol and the antioxidant NAC inhibit Tat-induced DNA Damage. B-cells were treated either with 250 ng/ml Tat or simultaneously with 250 ng/ml Tat and 10  $\mu$ M Tempol or 1 mM NAC, fixed at 6h post-treatment and immunostained for  $\gamma$ H2AX. The Y axis shows the proportion of cells exhibiting  $\gamma$ H2AX staining compared to the untreated B-cells, for which the obtained basal value was set as 1. The results represent a minimum of 300 cells examined per time point. The experiments were carried out in duplicate. All data are expressed as the mean $\pm$ SEM. The statistical analyses were carried out by the one-way ANOVA test. The statistical significance was calculated vs. untreated controls.

**(I)** Tat induces chromosomal aberrations in LCL 8866. Cells were treated either with 250 ng/ml Tat or simultaneously with 250 ng/ml Tat and 10  $\mu$ M Tempol for 5 days and processed as described in Materials and Methods. The Y axis shows the average number of chromosomal aberrations per cell compared to the untreated LCLs, for which the obtained basal value was set as 1. The experiments were carried out in duplicate. All data are expressed as the mean $\pm$ SEM. The statistical analyses were carried out by the one-way ANOVA test. The statistical significance was calculated vs. untreated controls; \*\*\*: p value<0.001; \*\*: 0.001 <p< 0.01; \* 0.01 <p<0.5;

**Figure 2. HIV-1 induces oxidative DNA damage via ROS production in B-cells from HIV patients.**

**(A)** ROS production in B-cells isolated from the blood of healthy donors and HIV-infected individuals detected by DHE staining. The Y axis shows the ROS level in B-cells from HIV-patients compared to that in healthy donors, for which the obtained basal value was set as 1. A minimum of 1000 cells were examined for each sample.

**(B)** DNA damage in B-cells isolated from the blood of healthy donors and HIV patients immunostained for  $\gamma$ H2AX. The Y axis shows the proportion of cells from HIV-infected individuals exhibiting  $\gamma$ H2AX staining compared to B-cells from healthy donors (negative control), for which the obtained basal value was set as 1. A minimum of 300 cells were examined for each sample. All data are expressed as the mean $\pm$ SEM. The statistical analyses were carried out by the one-way ANOVA test. The statistical significance was calculated vs. untreated controls; \*\*\*: p value<0.001). Eight different HIV patients were examined in this study (see Table 1).

**Figure 3. HIV-1 Tat protein induces mitochondrial OS in B-cells.**

**(A)** Tat-induced ROS production is diminished by the mitochondrial ROS production inhibition. B-cells were treated with 250 ng/ml Tat alone or with 10  $\mu$ M mitochondrial complex I inhibitor rotenone or 20 ng/ml mitochondria-targeting antioxidant SkQ1 or 10  $\mu$ M uncoupler of oxidative phosphorylation DNP for 6 h and stained with DHE. The Y axis shows ROS production calculated from a minimum of 100 cells examined for

each condition and compared to the negative control for which the obtained basal value was set as 1. The experiment was carried out on blood from three different healthy donors.

**(B)** Representative images of MitoSOXRed-stained B-cells. Hoechst is shown in blue (nuclear staining), MitoSOX in red. Scale Bar = 10  $\mu$ m.

**(C)** Tat induces superoxide anion production in mitochondria of B-cells. B lymphocytes treated with 250 ng/ml Tat alone or with 20 ng/ml SkQ1 were stained with MitoSOXRed and visualized by fluorescence microscopy 6 h after treatment. ROS production was quantified as described in Materials and Methods. The Y axis represents the proportion of cells with MitoSOXRed staining in Tat-treated B-cells compared to the untreated control, for which the obtained basal value was set as 1. The values were calculated from a minimum of 100 cells examined for each condition. The experiment was carried out on blood from two different healthy donors.

**(D)** SkQ1 inhibits Tat-induced DD. B-cells were treated with 250 ng/ml Tat alone or together with 20 ng/ml SkQ1 and then fixed at 6 h post-treatment and immunostained for  $\gamma$ H2AX. The Y axis shows the proportion of  $\gamma$ H2AX-positive Tat-treated B-cells compared to the untreated controls, for which the obtained basal value was set as 1. The number of  $\gamma$ H2AX positive cells was calculated from a minimum of 300 cells examined per experimental point. The experiment was carried out on blood from two healthy donors. All data are expressed as the mean $\pm$ SEM. The statistical analyses were carried out by the one-way ANOVA test. The statistical significance was calculated vs. untreated controls; \*\*\*: p value<0.001.

#### **Figure 4. Tat induces glutathione deficiency in B-cells.**

**(A)** Intracellular glutathione (GSH) staining using monochlorobimane (MCIB). B-cells treated with 250 ng/ml of Tat for 1 h and untreated controls were stained with MCIB and the amount of emitted fluorescence was analyzed by FACS. The experiment was carried out on blood from two different healthy donors.

Total glutathione (GSH) **(B)** and GSH/GSSG ratio **(C)** determined using the GSH/GSSG Ratio Detection Assay Kit. B-cells treated with 250 ng/ml of Tat for 1 h and untreated controls were processed following the manufacturer's instructions. The experiment was carried out on blood from two different healthy donors.

**(D)** Analysis of expression of genes encoding for heavy and light subunits of  $\gamma$ -GCS in B-cells treated with Tat. The transcriptional levels were measured by RT-qPCR after 1 h of treatment with 250 ng/ml Tat. Data represent means  $\pm$  SEM from three different donors and are expressed as fold change normalized vs. GAPDH and compared to untreated controls.

**(E)** Transcriptional activity of Tat is essential for ROS production. B-cells were treated with either 250 ng/ml Tat or its transcriptionally inactive form TatC22. ROS production was measured by DHE staining 6 h after treatment. The Y axis shows ROS production calculated from a minimum of 1000 cells examined for each

condition, compared to the untreated B-cells, for which the obtained basal value was set as 1. The experiment was carried out on blood from two different healthy donors.

(F) Transcriptional activity of Tat is essential for DNA damage induction. B-cells were treated with 250 ng/ml of either Tat or TatC22 mutant, and then fixed at 6 h post-treatment and immunostained for  $\gamma$ H2AX. The number  $\gamma$ H2AX-positive cells was calculated from a minimum of 300 cells was examined per time point, compared to B-cells as negative control, for which the obtained basal value was set as 1. The experiment was carried out on blood from three different healthy donors. All data are expressed as the mean $\pm$ SEM. The statistical analyses were carried out by the one-way ANOVA test. The statistical significance was calculated vs. untreated controls; \*\*\*: p value<0.001; \*\*: 0.001 <p< 0.01; \* 0.01 <p<0.5.

**Figure 5. Tat activates NF- $\kappa$ B in B-cells.**

(A) Tat induces nuclear translocation of NF- $\kappa$ B in B-cells. The Y axis shows the number of cells exhibiting NF- $\kappa$ B/p65 nuclear staining in B-cells treated with 250 ng/ml of Tat for 6 h, compared to the untreated control, for which the obtained basal value was set as 1. A minimum of 100 cells were analyzed per condition. The experiment was carried out on blood from one healthy donor.

(B) Tat-induced nuclear translocation of phosphorylated NF- $\kappa$ B RelA/p65 subunit in normal B-cells. Right panel: Western blot analysis of cytosolic and nuclear fractions from normal B-cells incubated or not with 250 ng/ml Tat for 6 h.  $\alpha$ -tubulin was used as cytosolic marker and DNA topoisomerase II as a nuclear marker. Left panel: the bands obtained with blot were quantified by densitometric analysis with ImageJ software. The intensity of phosphorylated RelA/p65 (S536) bands was normalized with the intensity of the controls ( $\alpha$ -tubulin and DNA topoisomerase II). The values found for the untreated control B-cells were set as 1 and the fold change in the presence of Tat was calculated. The experiment was carried out on blood from two different healthy donors.

(C) NF- $\kappa$ B activation is regulated by OS and Tat transcriptional activity. The Y axis shows the proportion of B-cells treated with 250 ng/ml Tat exhibiting the nuclear staining for the phosphorylated RelA/p65 compared to the untreated control, for which the obtained basal value was set as 1. A minimum of 100 cells was analyzed per condition. The experiment was carried out on blood from two different healthy donors.

(D) NF- $\kappa$ B inhibition decreases ROS production in Tat-treated B-cells. B-cells were treated with 250 ng/ml Tat alone or with 1 mM NF- $\kappa$ B inhibitor BAY 11-7082. ROS production was measured by DHE staining 6 h after treatment. The Y axis shows ROS production in Tat-treated B-cells compared to the negative control, for which the obtained basal value was set as 1. A minimum of 1000 cells were examined for each condition. The experiment was carried out on blood from two different healthy donors.

(E) NF- $\kappa$ B inhibition leads to the reduction of Tat-induced DD. The Y axis shows the proportion of  $\gamma$ H2AX-positive B-cells treated with 250 ng/ml Tat alone or together with 1 mM NF- $\kappa$ B inhibitor Bay 11-7082, for 6 h, compared to the untreated controls, for which the obtained basal value was set as 1. The results were calculated from a minimum of 100 cells examined per condition. The experiment was carried out on blood from two different healthy donors. All data are expressed as the mean $\pm$ SEM. The statistical analyses were carried out by the one-way ANOVA test. The statistical significance was calculated vs. untreated controls; \*\*\*: p value<0.001; \*\*: 0.001 <p< 0.01; \* 0.01 <p<0.5.

### **Table Legends**

**Table 1:** Main clinicopathological features of the eight HIV-infected individuals investigated in this study

### **Supplementary figure legends**

(A) Representative images of  $\gamma$ H2AX staining of B-cells treated with 250 ng/ml Tat for 6 h.  $\gamma$ H2AX is shown in green, DAPI nuclear staining in blue. Scale bar=10  $\mu$ m.

(B) Representative images of the Comet assay of B-cells treated with 250 ng/ml Tat for 6 h. Scale bar=50  $\mu$ m.

(C) Representative images of MitoSOXRed-stained B-cells treated with 250 ng/ml Tat for 6 h. Hoechst nuclear staining is shown in blue, MitoSOX in red. Scale Bar = 10  $\mu$ m.

## REFERENCES

- [1] T.M. Gibson, L.M. Morton, M.S. Shiels, C.A. Clarke, E.A. Engels, Risk of non-Hodgkin lymphoma subtypes in HIV-infected people during the HAART era: a population-based study., *AIDS*. 28 (2014) 2313–8. doi:10.1097/QAD.0000000000000428.
- [2] C.J. Achenbach, A.L. Buchanan, S.R. Cole, L. Hou, M.J. Mugavero, H.M. Crane, R.D. Moore, R.H. Haubrich, S. Gopal, J.J. Eron, P.W. Hunt, B. Rodriguez, K. Mayer, M.S. Saag, M.M. Kitahata, HIV viremia and incidence of non-Hodgkin lymphoma in patients successfully treated with antiretroviral therapy, *Clin. Infect. Dis.* 58 (2014) 1599–1606. doi:10.1093/cid/ciu076.
- [3] N. Howlader, M.S. Shiels, A.B. Mariotto, E.A. Engels, Contributions of HIV to Non-Hodgkin Lymphoma Mortality Trends in the United States., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 25 (2016) 1289–96. doi:10.1158/1055-9965.EPI-16-0273.
- [4] C. Chao, L. Xu, D. Abrams, W. Leyden, M. Horberg, W. Towner, D. Klein, B. Tang, M. Silverberg, Survival of non-Hodgkin lymphoma patients with and without HIV infection in the era of combined antiretroviral therapy., *AIDS*. 24 (2010) 1765–70. doi:10.1097/QAD.0b013e32833a0961.
- [5] K. Dunleavy, W.H. Wilson, How I treat HIV-associated lymphoma., *Blood*. 119 (2012) 3245–55. doi:10.1182/blood-2011-08-373738.
- [6] V. Ribrag, V. Camara-Clayette, J. Bosq, Y. Vassezky, Lymphome de Burkitt, EMC - Hématologie. 7 (2012) 1–11. doi:10.1016/S1155-1984(12)55448-8.
- [7] M.H. Kramer, J. Hermans, E. Wijburg, K. Philippo, E. Geelen, J.H. van Krieken, D. de Jong, E. Maartense, E. Schuur, P.M. Kluin, Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma., *Blood*. 92 (1998) 3152–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9787151> (accessed April 24, 2017).
- [8] J. Iqbal, W.G. Sanger, D.E. Horsman, A. Rosenwald, D.L. Pickering, B. Dave, S. Dave, L. Xiao, K. Cao, Q. Zhu, S. Sherman, C.P. Hans, D.D. Weisenburger, T.C. Greiner, R.D. Gascoyne, G. Ott, H.K. Müller-Hermelink, J. Delabie, R.M. Braziel, E.S. Jaffe, E. Campo, J.C. Lynch, J.M. Connors, J.M. Vose, J.O. Armitage, T.M. Grogan, L.M. Staudt, W.C. Chan, BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma., *Am. J. Pathol.* 165 (2004) 159–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15215171> (accessed April 24, 2017).
- [9] J.M. Vose, Current approaches to the management of non-Hodgkin's lymphoma, *Semin.Oncol.* 25 (1998) 483–491.
- [10] E. Cabannes, G. Khan, F. Aillet, R.F. Jarrett, R.T. Hay, Mutations in the IkBa gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for IkappaBalpha., *Oncogene*. 18 (1999) 3063–70. doi:10.1038/sj.onc.1202893.
- [11] L. Pasqualucci, P. Neumeister, T. Goossens, G. Nanjangud, R.S. Chaganti, R. Kuppers, R. Dalla-Favera, Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas, *Nature*. 412 (2001) 341–346. doi:10.1038/35085588.
- [12] D. Germini, T. Tsfasman, M. Klibi, R. El-Amine, A. Pichugin, O. V Iarovaia, C. Billhou-Nabera, F. Subra, Y. Bou Saada, A. Sukhanova, D. Boutboul, M. Raphaël, J. Wiels, S. V Razin, S. Bury-Moné, E. Oksenhendler, M. Lipinski, Y.S. Vassetzky, HIV Tat induces a prolonged MYC relocalization next to IGH in circulating B-cells, *Leukemia*. DOI: (2017) 10.1038/leu.2017.106. doi:10.1038/leu.2017.106.
- [13] A. Guffei, R. Sarkar, L. Klewes, C. Righolt, H. Knecht, S. Mai, Dynamic chromosomal rearrangements in Hodgkin's lymphoma are due to ongoing three-dimensional nuclear remodeling and breakage-bridge-fusion cycles, *Haematologica*. 95 (2010) 2038–2046. doi:10.3324/haematol.2010.030171.
- [14] A. Tubbs, A. Nussenzweig, Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer, *Cell*. 168 (2017) 644–656. doi:10.1016/j.cell.2017.01.002.
- [15] T. Helleday, S. Eshtad, S. Nik-Zainal, Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers, *Nat. Rev. Genet.* 15 (2014) 585–598. doi:10.1038/nrg3729.

- [16] N.R. Jena, DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair, *J. Biosci.* 37 (2012) 503–507. doi:10.1007/s12038-012-9218-2.
- [17] M. Hayyan, M.A. Hashim, I.M. Alnashef, Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications, *Chem. Rev.* 116 (2016) 3029–3085. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00407.
- [18] A. Barzilai, K.I. Yamamoto, DNA damage responses to oxidative stress, *DNA Repair (Amst)*. 3 (2004) 1109–1115. doi:10.1016/j.dnarep.2004.03.002.
- [19] J.E. Klaunig, L.M. Kamendulis, B.A. Hocevar, Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis, *Toxicol. Pathol.* 38 (2010) 96–109. doi:10.1177/0192623309356453.
- [20] M. Nambiar, S.C. Raghavan, How does DNA break during chromosomal translocations?, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 5813–5825. doi:10.1093/nar/gkr223.
- [21] H. Karoui, N. Hogg, C. Fréjaville, P. Tordo, B. Kalyanaraman, Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxyxynitrite: ESR-spin trapping and oxygen uptake studies, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 6000–6009. doi:10.1074/jbc.271.11.6000.
- [22] O. Hakim, W. Resch, A. Yamane, I. Klein, K.-R. Kieffer-Kwon, M. Jankovic, T. Oliveira, A. Bothmer, T.C. Voss, C. Ansarah-Sobrinho, E. Mathe, G. Liang, J. Cobell, H. Nakahashi, D.F. Robbiani, A. Nussenzweig, G.L. Hager, M.C. Nussenzweig, R. Casellas, DNA damage defines sites of recurrent chromosomal translocations in B lymphocytes., *Nature*. 484 (2012) 69–74. doi:10.1038/nature10909.
- [23] O. V Iarovaia, M. Rubtsov, E. Ioudinkova, T. Tsfasman, S. V Razin, Y.S. Vassetzky, Dynamics of double strand breaks and chromosomal translocations., *Mol. Cancer*. 13 (2014) 249. doi:10.1186/1476-4598-13-249.
- [24] P.D. Ray, B.-W. Huang, Y. Tsuji, Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling., *Cell. Signal.* 24 (2012) 981–990. doi:10.1016/j.cellsig.2012.01.008.
- [25] M.P. Murphy, How mitochondria produce reactive oxygen species., *Biochem. J.* 417 (2009) 1–13. doi:10.1042/BJ20081386.
- [26] M. Ott, V. Gogvadze, S. Orrenius, B. Zhivotovsky, Mitochondria, oxidative stress and cell death, *Apoptosis*. 12 (2007) 913–922. doi:10.1007/s10495-007-0756-2.
- [27] D.B. Zorov, M. Juhaszova, S.J. Sollott, Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1757 (2006) 509–517. doi:10.1016/j.bbabi.2006.04.029.
- [28] M. del P.S. Idelchik, U. Begley, T.J. Begley, J.A. Melendez, Mitochondrial ROS control of cancer, *Semin. Cancer Biol.* (2017) 0–1. doi:10.1016/j.semcancer.2017.04.005.
- [29] J.T. Hancock, R. Desikan, S.J. Neill, Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways, *Biochem. Biomed. Asp. Oxidative Modif.* (2001) 345–350. doi:10.1042/0300-5127:0290345.
- [30] P. Poprac, K. Jomova, M. Simunkova, V. Kollar, C.J. Rhodes, M. Valko, Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases., *Trends Pharmacol. Sci.* 38 (2017) 592–607. doi:10.1016/j.tips.2017.04.005.
- [31] B. Demple, L. Harrison, Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology., *Annu. Rev. Biochem.* 63 (1994) 915–948. doi:10.1146/annurev.biochem.63.1.915.
- [32] M. Dizdaroglu, Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin, *Mutat. Res. DNAGing*. 275 (1992) 331–342. doi:10.1016/0921-8734(92)90036-O.
- [33] a L. Lu, X. Li, Y. Gu, P.M. Wright, D.Y. Chang, Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions., *Cell Biochem. Biophys.* 35 (2001) 141–170. doi:10.1385/CBB:35:2:141.
- [34] C. von Sonntag, New aspects in the free-radical chemistry of pyrimidine nucleobases, *Free Radic Res Commun.* 2 (1987) 217–224.
- [35] A. Banerjee, X. Zhang, K.R. Manda, W.A. Banks, N. Ercal, HIV proteins (gp120 and Tat) and methamphetamine in oxidative stress-induced damage in the brain: Potential role of the thiol antioxidant N-acetylcysteine amide, *Free Radic. Biol. Med.* 48 (2010) 1388–1398. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.02.023.
- [36] A. V. Ivanov, V.T. Valuev-Elliston, O.N. Ivanova, S.N. Kochetkov, E.S. Starodubova, B. Bartosch, M.G. Isaguliant, Oxidative Stress during HIV Infection: Mechanisms and Consequences, *Oxid. Med. Cell.*

- Longev. 2016 (2016) 1–18. doi:10.1155/2016/8910396.
- [37] B. Romani, S. Engelbrecht, R.H. Glashoff, Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1., *J. Gen. Virol.* 91 (2010) 1–12. doi:10.1099/vir.0.016303-0.
- [38] Y.R. Musinova, E. V. Sheval, C. Dib, D. Germini, Y.S. Vassetzky, Functional roles of HIV-1 Tat protein in the nucleus, *Cell. Mol. Life Sci.* 73 (2016) 589–601. doi:10.1007/s00018-015-2077-x.
- [39] R.K. Kundu, F. Sangiorgi, L.Y. Wu, P.K. Pattengale, D.R. Hinton, P.S. Gill, R. Maxson, Expression of the human immunodeficiency virus-Tat gene in lymphoid tissues of transgenic mice is associated with B-cell lymphoma., *Blood.* 94 (1999) 275–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10381523> (accessed August 29, 2014).
- [40] D.H. Dandekar, K.N. Ganesh, D. Mitra, HIV-1 Tat directly binds to NFkappaB enhancer sequence: role in viral and cellular gene expression., *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 1270–8. doi:10.1093/nar/gkh289.
- [41] C. Marban, T. Su, R. Ferrari, B. Li, D. Vatakis, M. Pellegrini, J.A. Zack, O. Rohr, S.K. Kurdistani, Genome-wide binding map of the HIV-1 Tat protein to the human genome., *PLoS One.* 6 (2011) e26894. doi:10.1371/journal.pone.0026894.
- [42] J.E. Reeder, Y.-T. Kwak, R.P. McNamara, C. V Forst, I. D’Orso, HIV Tat controls RNA Polymerase II and the epigenetic landscape to transcriptionally reprogram target immune cells., *Elife.* 4 (2015) e08955. doi:10.7554/eLife.08955.
- [43] C. Capone, M. Cervelli, E. Angelucci, M. Colasanti, A. Macone, P. Mariottini, T. Persichini, A role for spermine oxidase as a mediator of reactive oxygen species production in HIV-Tat-induced neuronal toxicity., *Free Radic. Biol. Med.* 63 (2013) 99–107. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.007.
- [44] Y. Gu, R.F. Wu, Y.C. Xu, S.C. Flores, L.S. Terada, HIV Tat Activates c-Jun Amino-terminal Kinase through an Oxidant-Dependent Mechanism, *Virology.* 286 (2001) 62–71. doi:10.1006/viro.2001.0998.
- [45] H. Lecoeur, A. Borgne-Sanchez, O. Chaloin, R. El-Khoury, M. Brabant, A. Langonné, M. Porceddu, J.-J. Brière, N. Buron, D. Rebouillat, C. Péchoux, A. Deniaud, C. Brenner, J.-P. Briand, S. Muller, P. Rustin, E. Jacotot, HIV-1 Tat protein directly induces mitochondrial membrane permeabilization and inactivates cytochrome c oxidase, *Cell Death Dis.* 3 (2012) e282. doi:10.1038/cddis.2012.21.
- [46] S. Curreli, S. Krishnan, M. Reitz, Y. Lunardi-Iskandar, M.K. Lafferty, A. Garzino-Demo, D. Zella, R.C. Gallo, J. Bryant, B cell lymphoma in HIV transgenic mice., *Retrovirology.* 10 (2013) 92. doi:10.1186/1742-4690-10-92.
- [47] R. Masella, R. Di Benedetto, R. Vari, C. Filesi, C. Giovannini, Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, *J. Nutr. Biochem.* 16 (2005) 577–586. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.05.013.
- [48] X.Q. Shan, T.Y. Aw, D.P. Jones, Glutathione-dependent protection against oxidative injury., *Pharmacol Ther.* 47 (1990) 61–71.
- [49] V.I. Lushchak, V.I. Lushchak, Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions, *J. Amino Acids.* 2012 (2012) 1–26. doi:10.1155/2012/736837.
- [50] M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Interact.* 160 (2006) 1–40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009.
- [51] M. Deponte, The Incomplete Glutathione Puzzle: Just Guessing at Numbers and Figures?, *Antioxid. Redox Signal.* 27 (2017) 1130–1161. doi:10.1089/ars.2017.7123.
- [52] M. Deponte, Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830 (2013) 3217–3266. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.018.
- [53] O. Zitka, S. Skalicikova, J. Gumulec, M. Masarik, V. Adam, J. Hubalek, L. Trnkova, J. Kruseova, T. Eckschlager, R. Kizek, Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients, *Oncol. Lett.* 4 (2012) 1247–1253. doi:10.3892/ol.2012.931.
- [54] N. Kaplowitz, The importance and regulation of hepatic glutathione, *Yale J. Biol. Med.* 54 (1981) 497–502. doi:10.1055/s-2008-1040481.
- [55] M. Gamesik, M. Kasibhatla, S. Teeter, O. Colvin, Glutathione levels in human tumors, *Biomarkers.* 17 (2012) 671–691. doi:10.3109/1354750X.2012.715672.Glutathione.

- [56] N. Ballatori, S.M. Krance, S. Notenboom, S. Shi, K. Tieu, C.L. Hammond, Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases, *Biol. Chem.* 390 (2009) 191–214. doi:10.1515/BC.2009.033.
- [57] R. van den Berg, G.R.M.M. Haenen, H. van den Berg, A. Bast, Transcription factor NF- $\kappa$ B as a potential biomarker for oxidative stress, *Br. J. Nutr.* 86 (2001) S121. doi:10.1079/BJN2001340.
- [58] M.J. Morgan, Z. Liu, Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling., *Cell Res.* 21 (2011) 103–15. doi:10.1038/cr.2010.178.
- [59] A.C. Dudley, Likelihood for False Positives Using Bacterially-Expressed Recombinant Proteins in Anti-Angiogenesis Studies Commentary ND ES SC, 5 (2006) 2006.
- [60] J.A. Garcia, D. Harrich, L. Pearson, R. Mitsuyasu, R.B. Gaynor, Functional domains required for tat-induced transcriptional activation of the HIV-1 long terminal repeat., *EMBO J.* 7 (1988) 3143–3147.
- [61] C. Rossi, P.G. Balboni, M. Betti, P.C. Marconi, R. Bozzini, M.P. Grossi, Inhibition of HIV-1 replication by a Tat transdominant negative mutant in human peripheral blood lymphocytes from healthy donors and HIV-1-infected patients, (1997) 1261–1269.
- [62] M. Daugaard, R. Nitsch, B. Razaghi, L. McDonald, A. Jarrar, S. Torino, S. Castillo-Lluva, B. Rotblat, L. Li, A. Malliri, E. Lemichez, A. Mettouchi, J.N. Berman, J.M. Penninger, P.H. Sorensen, Haxe1 controls ROS generation of vertebrate Rac1-dependent NADPH oxidase complexes, *Nat. Commun.* 4 (2013) 1–13. doi:10.1038/ncomms3180.
- [63] P. Dmitriev, Y. Bou Saada, C. Dib, E. Anseau, A. Barat, A. Hamade, P. Dessen, T. Robert, V. Lazar, R.A.N. Louzada, C. Dupuy, V. Zakharova, G. Carnac, M. Lipinski, Y.S. Vassetzky, DUX4-induced constitutive DNA damage and oxidative stress contribute to aberrant differentiation of myoblasts from FSHD patients, *Free Radic. Biol. Med.* 99 (2016) 244–258. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.007.
- [64] A. Carré, R.A.N. Louzada, R.S. Fortunato, R. Ameziane-El-Hassani, S. Morand, V. Ogryzko, D.P. de Carvalho, H. Grasberger, T.L. Leto, C. Dupuy, When an Intramolecular Disulfide Bridge Governs the Interaction of DUOX2 with Its Partner DUOXA2, *Antioxid. Redox Signal.* 23 (2015) 724–733. doi:10.1089/ars.2015.6265.
- [65] M. Narasimhan, M. Rathinam, D. Patel, G. Henderson, L. Mahimainathan, Astrocytes Prevent Ethanol Induced Apoptosis of Nrf2 Depleted Neurons by Maintaining {GSH} Homeostasis, *Open J. Apoptosis.* 1 (2012) 9. doi:10.4236/ojapo.2012.12002.
- [66] R. Vene, L. Delfino, P. Castellani, E. Balza, M. Bertolotti, R. Sitia, A. Rubartelli, Redox remodeling allows and controls B-cell activation and differentiation, *Antioxid Redox Signal.* 13 (2010) 1145–1155. doi:10.1089/ars.2009.3078.
- [67] W.Y. Chen, F.R. Chang, Z.Y. Huang, J.H. Chen, Y.C. Wu, C.C. Wu, Tubocapsenolide A, a novel withanolide, inhibits proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-231 cells by thiol oxidation of heat shock proteins, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 17184–17193. doi:10.1074/jbc.M709447200.
- [68] D. Germini, Y.B. Saada, T. Tsfasman, K. Osina, C. Robin, N. Lomov, M. Rubtsov, N. Sjakste, M. Lipinski, Y. Vassetzky, A one-step PCR-based assay to evaluate efficiency and precision of genomic DNA-editing tools, *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 5 (2017) 43–50. doi:10.1016/j.omtm.2017.03.001.
- [69] H. Xiao, C. Neuveut, H.L. Tiffany, M. Benkirane, E. a Rich, P.M. Murphy, K.T. Jeang, Selective CXCR4 antagonism by Tat: implications for in vivo expansion of coreceptor use by HIV-1., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 11466–11471. doi:10.1073/pnas.97.21.11466.
- [70] Y. Zhong, B. Hennig, M. Toborek, Intact Lipid Rafts Regulate HIV-1 Tat Protein-Induced Activation of the Rho Signaling and Upregulation of P-Glycoprotein in Brain Endothelial Cells, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 30 (2010) 522–533. doi:10.1038/jcbfm.2009.214.
- [71] F. Rayne, S. Debaisieux, A. Bonhoure, B. Beaumelle, HIV-1 Tat is unconventionally secreted through the plasma membrane., *Cell Biol. Int.* 34 (2010) 409–413. doi:10.1042/CBI20090376.
- [72] D. Sorescu, K.K. Griendling, Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure., *Congest. Heart Fail.* 8 (2002) 132–140. doi:10.1111/j.1527-5299.2002.00717.x.

- [73] M. Sasaki, Y. Ozawa, T. Kurihara, K. Noda, Y. Imamura, S. Kobayashi, S. Ishida, K. Tsubota, Neuroprotective effect of an antioxidant, lutein, during retinal inflammation, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50 (2009) 1433–1439. doi:10.1167/iovs.08-2493.
- [74] P. Peroja, A.K. Pasanen, K.-M. Haapasaari, E. Jantunen, Y. Soini, T. Turpeenniemi-Hujanen, R. Bloigu, L. Lilja, O. Kuittinen, P. Karihtala, Oxidative stress and redox state-regulating enzymes have prognostic relevance in diffuse large B-cell lymphoma., *Exp. Hematol. Oncol.* 1 (2012) 2. doi:10.1186/2162-3619-1-2.
- [75] L.J. Marnett, Oxyradicals and DNA damage., *Carcinogenesis.* 21 (2000) 361–370. doi:10.1093/carcin/21.3.361.
- [76] R.S. Maser, K.J. Monsen, B.E. Nelms, J.H. Petrini, hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks., *Mol. Cell. Biol.* 17 (1997) 6087–96.
- [77] M.D. Evans, M. Dizdaroglu, M.S. Cooke, Oxidative DNA damage and disease: Induction, repair and significance, *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 567 (2004) 1–61. doi:10.1016/j.mrrev.2003.11.001.
- [78] S.S. Martinez, A. Campa, Y. Li, C. Fleetwood, T. Stewart, V. Ramamoorthy, M.K. Baum, Low Plasma Zinc Is Associated with Higher Mitochondrial Oxidative Stress and Faster Liver Fibrosis Development in the Miami Adult Studies in HIV Cohort., *J. Nutr.* 147 (2017) 556–562. doi:10.3945/jn.116.243832.
- [79] M. Masiá, S. Padilla, M. Fernández, X. Barber, S. Moreno, J.A. Iribarren, J. Portilla, A. Peña, F. Vidal, F. Gutiérrez, CoRIS, Contribution of Oxidative Stress to Non-AIDS Events in HIV-Infected Patients., *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 75 (2017) e36–e44. doi:10.1097/QAI.0000000000001287.
- [80] S. Rodríguez-Mora, E. Mateos, M. Moran, M.Á. Martín, J.A. López, E. Calvo, M.C. Terrón, D. Luque, D. Muriaux, J. Alcamí, M. Coiras, M.R. López-Huertas, Intracellular expression of Tat alters mitochondrial functions in T cells: a potential mechanism to understand mitochondrial damage during HIV-1 replication, *Retrovirology.* 12 (2015) 78. doi:10.1186/s12977-015-0203-3.
- [81] Y.N. Antonenko, A. V. Avetisyan, L.E. Bakeeva, B. V Chernyak, V.A. Chertkov, L. V Domnina, O.Y. Ivanova, D.S. Izyumov, L.S. Khailova, S.S. Klshin, G.A. Korshunova, K.G. Lyamzaev, M.S. Muntyan, O.K. Nepryakhina, A.A. Pashkovskaya, O.Y. Pletjushkina, A. V Pustovidko, V.A. Roginsky, T.I. Rokitskaya, E.K. Ruuge, V.B. Saprunova, I.I. Severina, R.A. Simonyan, I. V Skulachev, M. V Skulachev, N. V Sumbatyan, I. V Sviryayeva, V.N. Tashlitsky, J.M. Vassiliev, M.Y. Vysokikh, L.S. Yaguzhinsky, A.A. Zamyatnin, V.P. Skulachev, Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and in vitro studies., *Biochemistry. (Mosc).* 73 (2008) 1273–87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120014> (accessed August 4, 2017).
- [82] V. V. Zakharova, O.Y. Pletjushkina, R.A. Zinovkin, E.N. Popova, B. V. Chernyak, Mitochondria-Targeted Antioxidants and Uncouplers of Oxidative Phosphorylation in Treatment of the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS), *J. Cell. Physiol.* 232 (2017) 904–912. doi:10.1002/jcp.25626.
- [83] F.M. Cunha, C.C. Caldeira da Silva, F.M. Cerqueira, A.J. Kowaltowski, Mild mitochondrial uncoupling as a therapeutic strategy., *Curr. Drug Targets.* 12 (2011) 783–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21275885> (accessed February 4, 2016).
- [84] B.-C. Liao, C.-W. Hsieh, Y.-C. Lin, B.-S. Wung, The Glutaredoxin/Glutathione System Modulates NF- $\kappa$ B Activity by Glutathionylation of p65 in Cinnamaldehyde-Treated Endothelial Cells, *Toxicol. Sci.* 116 (2010) 151–163. doi:10.1093/toxsci/kfq098.
- [85] S.C. Lu, Regulation of glutathione synthesis, *Mol. Aspects Med.* 30 (2009) 42–59. doi:10.1016/j.mam.2008.05.005.
- [86] F.J. Staal, Glutathione and HIV infection: reduced reduced, or increased oxidized?, *Eur. J. Clin. Invest.* 28 (1998) 194–6. doi:10.1046/j.1365-2362.1998.00268.x.
- [87] R. Van Duyne, K. Kehn-Hall, L. Carpio, F. Kashanchi, Cell-type-specific proteome and interactome: using HIV-1 Tat as a test case., *Expert Rev. Proteomics.* 6 (2009) 515–26. doi:10.1586/epr.09.73.
- [88] V.W. Gautier, L. Gu, N. O'Donoghue, S. Pennington, N. Sheehy, W.W. Hall, In vitro nuclear interactome of the HIV-1 Tat protein., *Retrovirology.* 6 (2009) 47. doi:10.1186/1742-4690-6-47.

- [89] S. Ruben, A. Perkins, R. Purcell, K. Joung, R. Sia, R. Burghoff, W.A. Haseltine, C.A. Rosen, Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein., *J. Virol.* 63 (1989) 1–8. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=247650&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (accessed March 20, 2015).
- [90] N. Li, M. Karin, Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress?, *FASEB J.* 13 (1999) 1137–43. doi:10.3103/S0027131408050131.
- [91] J. Anrather, G. Racchumi, C. Iadecola, NF-κB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 5657–5667. doi:10.1074/jbc.M506172200.
- [92] B. Hoesel, J.A. Schmid, The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer, *Mol. Cancer.* 12 (2013) 86. doi:10.1186/1476-4598-12-86.
- [93] Y. Takada, S. Singh, B.B. Aggarwal, Identification of a p65 Peptide That Selectively Inhibits NF-κ B Activation Induced by Various Inflammatory Stimuli and Its Role in Down-regulation of NF-κB-mediated Gene Expression and Up-regulation of Apoptosis, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 15096–15104. doi:10.1074/jbc.M311192200.
- [94] I. Mattioli, A. Sebald, C. Bucher, R.-P. Charles, H. Nakano, T. Doi, M. Kracht, M.L. Schmitz, Transient and selective NF-kappa B p65 serine 536 phosphorylation induced by T cell costimulation is mediated by I kappa B kinase beta and controls the kinetics of p65 nuclear import., *J. Immunol.* 172 (2004) 6336–6344. doi:10.4049/jimmunol.172.10.6336.
- [95] C. Song, S.K. Mitter, X. Qi, E. Beli, H. V Rao, J. Ding, C.S. Ip, H. Gu, D. Akin, W.A. Dunn, C. Bowes Rickman, A.S. Lewin, M.B. Grant, M.E. Boulton, M.E. Boulton, Oxidative stress-mediated NFκB phosphorylation upregulates p62/SQSTM1 and promotes retinal pigmented epithelial cell survival through increased autophagy., *PLoS One.* 12 (2017) e0171940. doi:10.1371/journal.pone.0171940.
- [96] S. Strickson, D.G. Campbell, C.H. Emmerich, A. Knebel, L. Plater, M.S. Ritorto, N. Shpiro, P. Cohen, The anti-inflammatory drug BAY 11-7082 suppresses the MyD88-dependent signalling network by targeting the ubiquitin system., *Biochem. J.* 451 (2013) 427–37. doi:10.1042/BJ20121651.
- [97] M. Bower, M. Fisher, T. Hill, I. Reeves, J. Walsh, C. Orkin, A.N. Phillips, L. Bansi, R. Gilson, P. Easterbrook, M. Johnson, B. Gazzard, C. Leen, D. Pillay, A. Schwenk, J. Anderson, K. Porter, M. Gompels, C.A. Sabin, for the U.C.S. UK CHIC Steering Committee, CD4 counts and the risk of systemic non-Hodgkin’s lymphoma in individuals with HIV in the UK., *Haematologica.* 94 (2009) 875–80. doi:10.3324/haematol.2008.002691.
- [98] J. Stebbing, B. Gazzard, S. Mandalia, A. Teague, A. Waterston, V. Marvin, M. Nelson, M. Bower, Antiretroviral Treatment Regimens and Immune Parameters in the Prevention of Systemic AIDS-Related Non-Hodgkin’s Lymphoma, *J. Clin. Oncol.* 22 (2004) 2177–2183. doi:10.1200/JCO.2004.11.097.
- [99] Z.-Y. Jin, X. Liu, Y.-Y. Ding, Z.-F. Zhang, N. He, Cancer risk factors among people living with HIV/AIDS in China: a systematic review and meta-analysis, *Sci. Rep.* 7 (2017) 4890. doi:10.1038/s41598-017-05138-x.
- [100] E. Ryan, R. Hollingworth, R. Grand, Activation of the DNA Damage Response by RNA Viruses, *Biomolecules.* 6 (2016) 2. doi:10.3390/biom6010002.
- [101] V. Mollace, H.S. Nottet, P. Clayette, M.C. Turco, C. Muscoli, D. Salvemini, C.F. Perno, Oxidative stress and neuroAIDS: triggers, modulators and novel antioxidants., *Trends Neurosci.* 24 (2001) 411–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11410272> (accessed July 31, 2017).
- [102] T.O. Price, N. Ercal, R. Nakaoka, W.A. Banks, HIV-1 viral proteins gp120 and Tat induce oxidative stress in brain endothelial cells, *Brain Res.* 1045 (2005) 57–63. doi:10.1016/j.brainres.2005.03.031.
- [103] A. Banjac, T. Perisic, H. Sato, A. Seiler, S. Bannai, N. Weiss, P. Kölle, K. Tschoep, R.D. Issels, P.T. Daniel, M. Conrad, G.W. Bornkamm, The cystine/cysteine cycle: a redox cycle regulating susceptibility versus resistance to cell death, *Oncogene.* 27 (2008) 1618–1628. doi:10.1038/sj.onc.1210796.
- [104] D.R. Karp, K. Shimooku, P.E. Lipsky, Expression of γ-Glutamyl Transpeptidase Protects Ramos B Cells from Oxidation-induced Cell Death, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 3798–3804. doi:10.1074/jbc.M008484200.

- [105] M. Täger, A. Ittenson, A. Franke, A. Frey, H.G. Gassen, S. Ansorge, gamma-Glutamyl transpeptidase-cellular expression in populations of normal human mononuclear cells and patients suffering from leukemias., *Ann. Hematol.* 70 (1995) 237–42.
- [106] A. Puca, G. Fiume, C. Palmieri, F. Trimboli, F. Olimpico, G. Scala, I. Quinto, I $\kappa$ B- $\alpha$  represses the transcriptional activity of the HIV-1 Tat transactivator by promoting its nuclear export, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 37146–37157. doi:10.1074/jbc.M705815200.
- [107] F. Demarchi, F. d’Adda di Fagagna, A. Falaschi, M. Giacca, Activation of transcription factor NF-kappaB by the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1., *J. Virol.* 70 (1996) 4427–37.
- [108] J. Liu, N.D. Perkins, R.M. Schmid, G.J. Nabel, Specific NF-kappa B subunits act in concert with Tat to stimulate human immunodeficiency virus type 1 transcription., *J. Virol.* 66 (1992) 3883–7.
- [109] G. Fiume, E. Vecchio, A. De Laurentiis, F. Trimboli, C. Palmieri, A. Pisano, C. Falcone, M. Pontoriero, A. Rossi, A. Scialdone, F. Fasanella Masci, G. Scala, I. Quinto, Human immunodeficiency virus-1 Tat activates NF- $\kappa$ B via physical interaction with I $\kappa$ B- $\alpha$  and p65, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 3548–3562. doi:10.1093/nar/gkr1224.
- [110] H. Nakamura, H. Masutani, J. Yodoi, Redox Imbalance and Its Control in HIV Infection, *Antioxid. Redox Signal.* 4 (2002) 455–464. doi:10.1089/15230860260196245.
- [111] T. Koyama, B. Sun, K. Tokunaga, M. Tatsumi, Y. Ishizaka, DNA damage enhances integration of HIV-1 into macrophages by overcoming integrase inhibition, *Retrovirology.* 10 (2013) 21. doi:10.1186/1742-4690-10-21.
- [112] F. Ensoli, A. Cafaro, A. Casabianca, A. Tripiciano, S. Bellino, O. Longo, V. Francavilla, O. Picconi, C. Sgadari, S. Moretti, M.R.P. Cossut, A. Arancio, C. Orlandi, L. Sernicola, M.T. Maggiorella, G. Paniccia, C. Mussini, A. Lazzarin, L. Sighinolfi, G. Palamara, A. Gori, G. Angarano, M. Di Pietro, M. Galli, V.S. Mercurio, F. Castelli, G. Di Perri, P. Monini, M. Magnani, E. Garaci, B. Ensoli, HIV-1 Tat immunization restores immune homeostasis and attacks the HAART-resistant blood HIV DNA: results of a randomized phase II exploratory clinical trial., *Retrovirology.* 12 (2015) 33. doi:10.1186/s12977-015-0151-y.
- [113] S. Aquaro, F. Scopelliti, M. Pollicita, C.F. Perno, Oxidative stress and HIV infection: target pathways for novel therapies?, *Futur. HIV Ther.* 2 (2008) 327–338. doi:10.2217/17469600.2.4.327.
- [114] T.M. Brenza, S. Ghaisas, J.E.V. Ramirez, D. Harischandra, V. Anantharam, B. Kalyanaraman, A.G. Kanthasamy, B. Narasimhan, Neuronal protection against oxidative insult by polyanhydride nanoparticle-based mitochondria-targeted antioxidant therapy, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 13 (2017) 809–820. doi:10.1016/j.nano.2016.10.004.
- [115] D.L. Kirkpatrick, G. Powis, Clinically Evaluated Cancer Drugs Inhibiting Redox Signaling., *Antioxid. Redox Signal.* 26 (2017) 262–273. doi:10.1089/ars.2016.6633.
- [116] B.A. Feniouk, V.P. Skulachev, Cellular and Molecular Mechanisms of Action of Mitochondria-Targeted Antioxidants., *Curr. Aging Sci.* 10 (2017) 41–48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27659264> (accessed August 4, 2017).
- [117] G. Mousseau, C.F. Kessing, R. Fromentin, L. Trautmann, N. Chomont, S.T. Valente, The Tat Inhibitor Didehydro-Cortistatin A Prevents HIV-1 Reactivation from Latency., *MBio.* 6 (2015) e00465. doi:10.1128/mBio.00465-15.

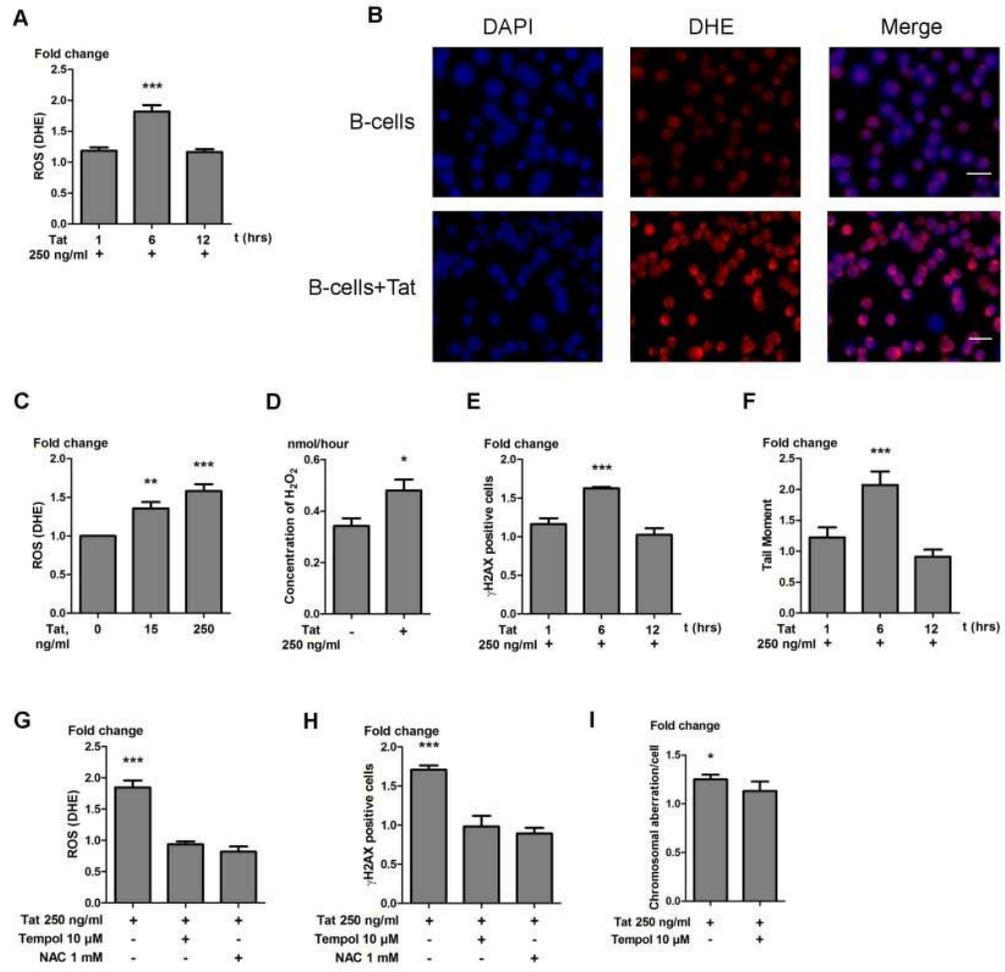
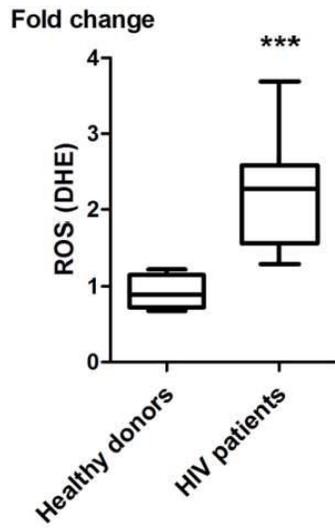


Figure 1

**A**



**B**

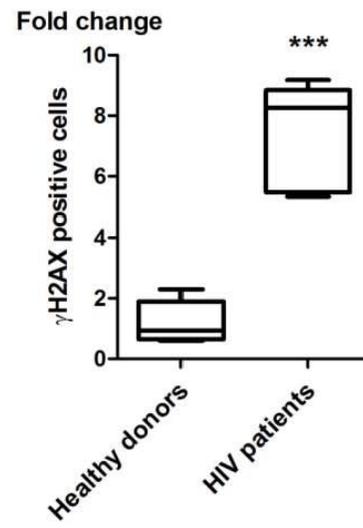


Figure 2

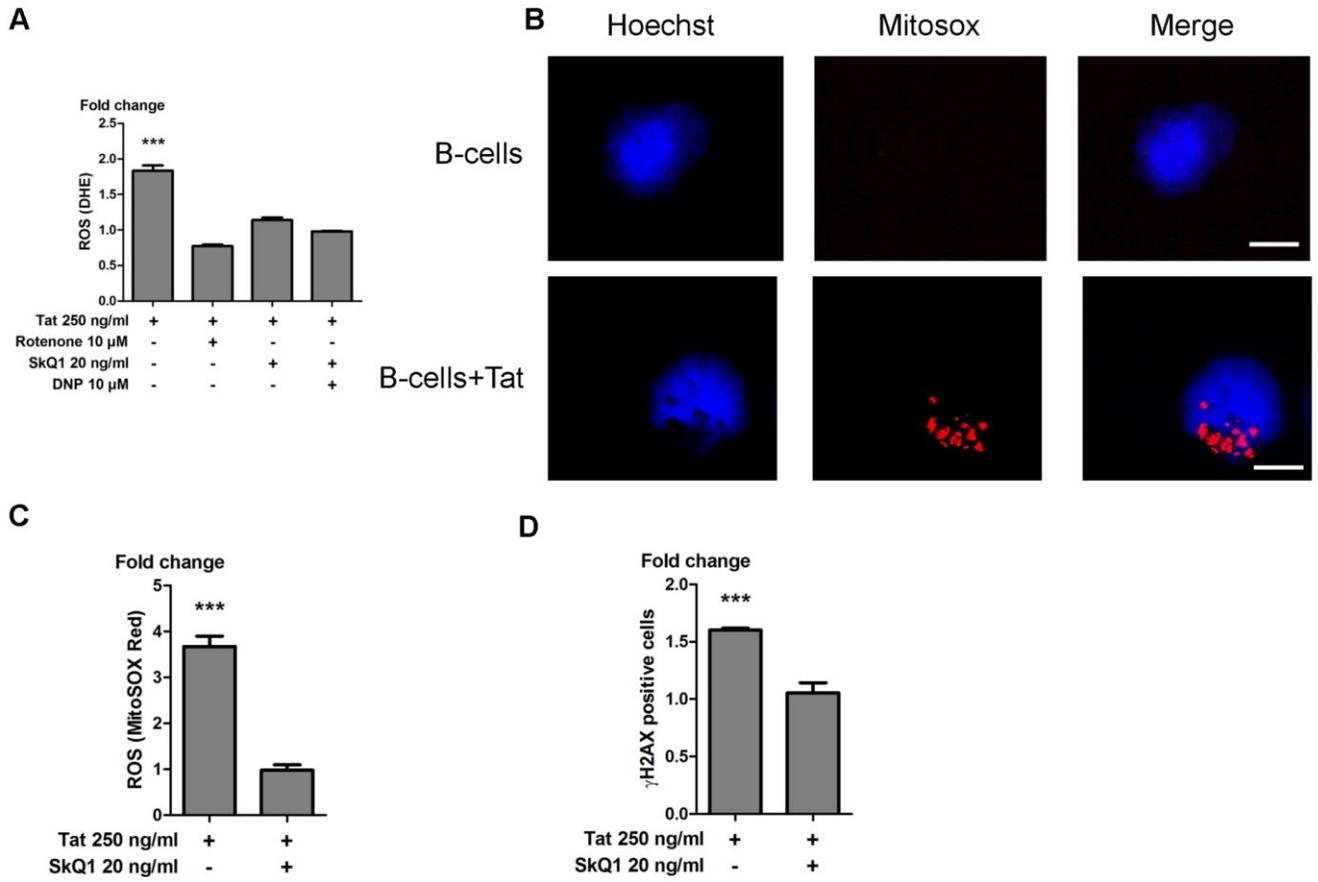


Figure 3  
Figure 3

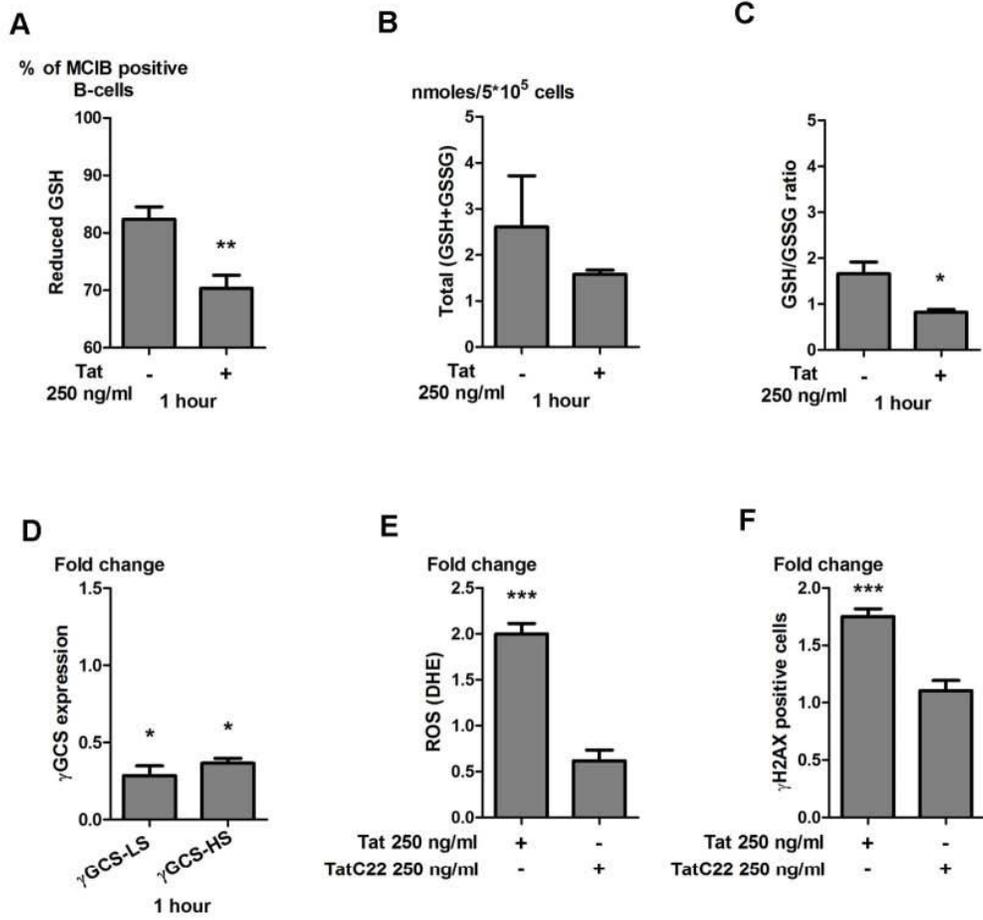


Figure 4

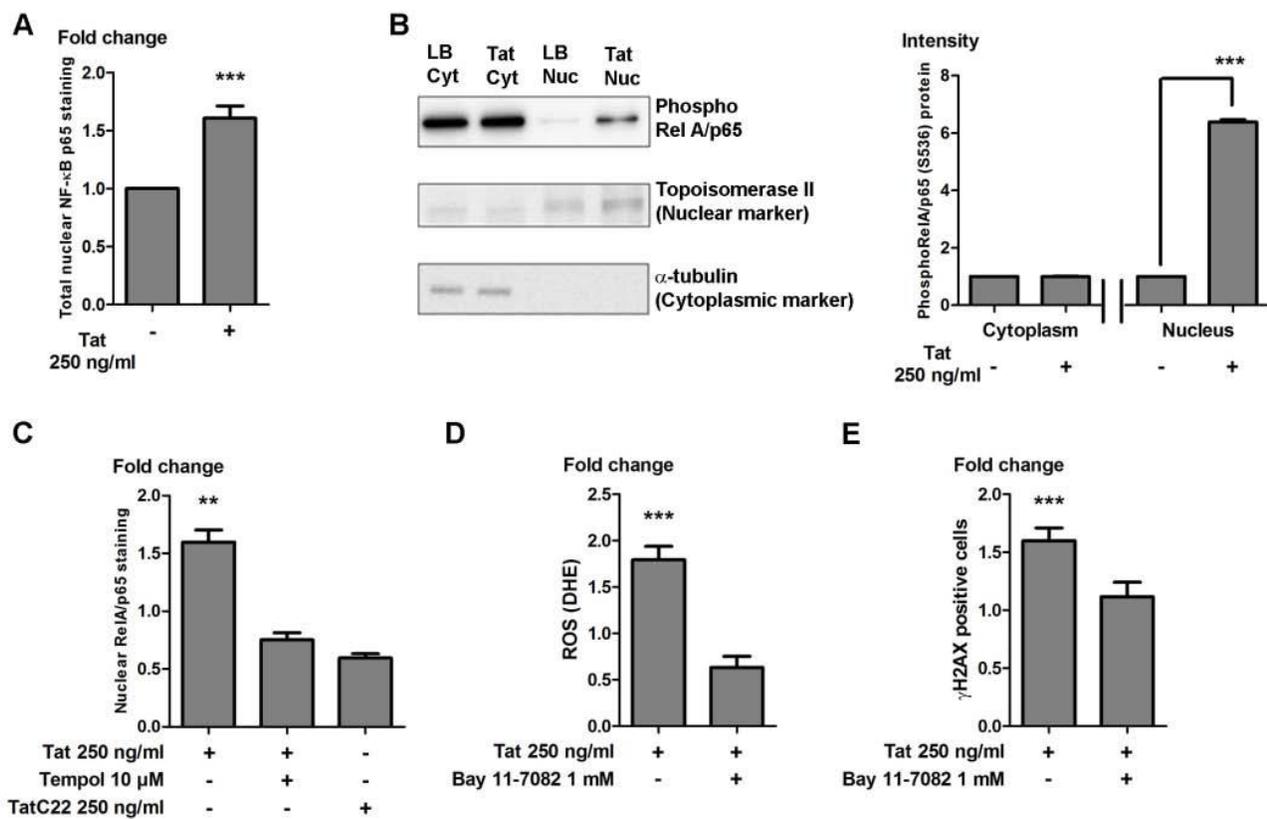
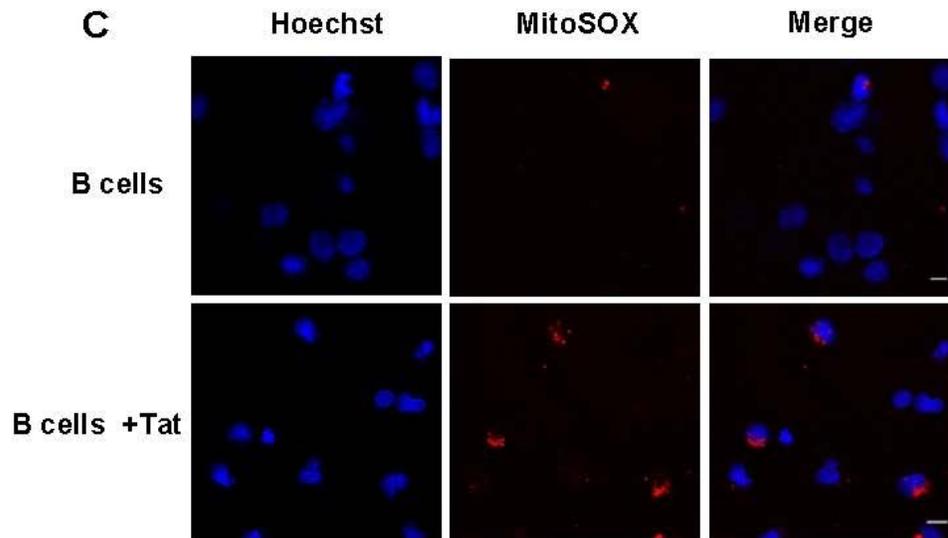
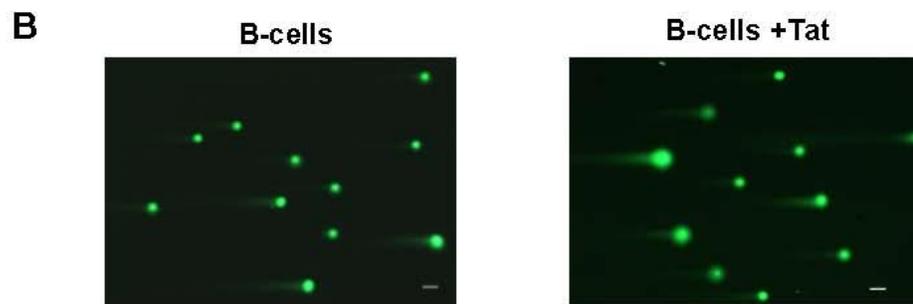
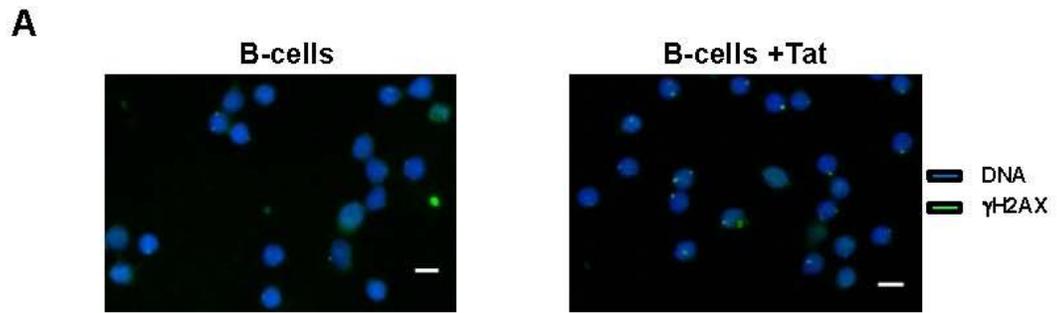


Figure 5

Table 1. Main physiopathological features in the eight individuals infected with HIV and investigated in this study.

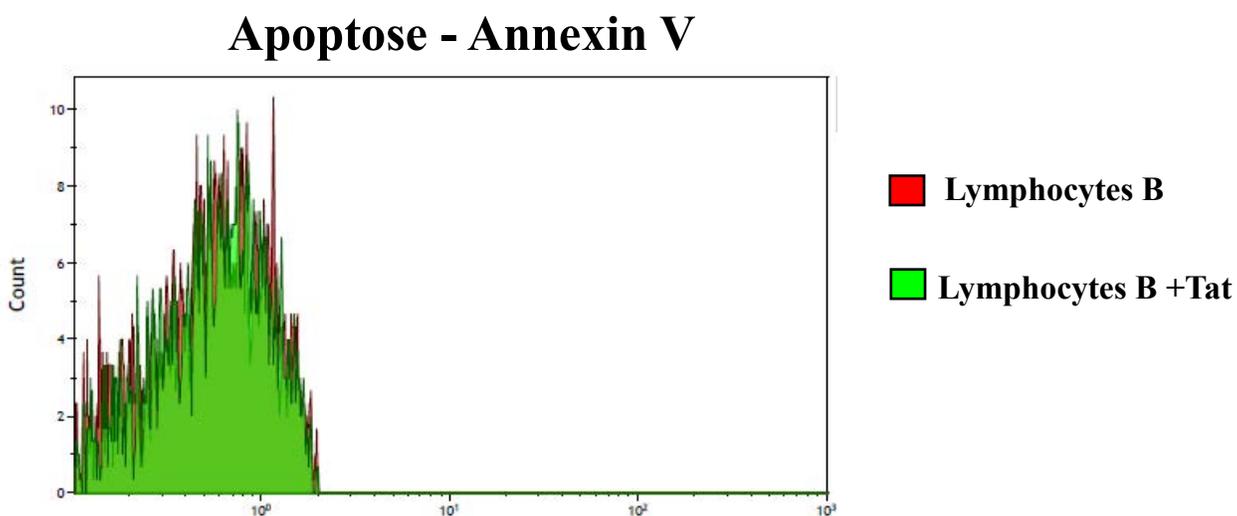
<b>Patients</b>	<b>Test</b>	<b>Effective ART duration</b>	<b>Plasma HIV RNA</b>	<b>CD4+ T cells</b>	<b>Seric Tat concentration</b>
#, Sex (Age, years)	#	(months)	(log <sub>10</sub> copies/ml)	(x 10 <sup>6</sup> /L)	(ng/ml)
1, F (48)	1	54	<1.3	428	0.40
2, F (56)	1	100	<1.3	502	2.83
3, M (59)	1	66	<1.3	747	1.14
4, M (47)	1	25	<1.3	417	2.91
5, F (51)	1	102	<1.3	556	0.21
6, M (52)	1	228	<1.3	494	0.27
7, M (33)	1	11	<1.3	619	4.06
8, F (62)	1	73	<1.3	536	9.02



Supplementary Figure

## 1.1. Détection de l'apoptose dans les cellules B

Le stress oxydant est parmi les processus impliqués dans l'induction des voies apoptotiques (Finkel and Holbrook, 2000). Pour affirmer que Tat n'induit pas les voies apoptotiques dans les cellules B suite à son effet pro-oxydant, nous avons testé si Tat a un effet apoptotique dans les cellules B isolées du sang des donneurs sains. L'analyse quantitative de la présence de l'annexin V et du marquage par l'iodure de propidium (IP) a montré que Tat n'induit pas l'apoptose dans les cellules B en comparant avec le contrôle négatif, les cellules B non traitées (**Figure 20**).



**Figure 20. Détection d'apoptose dans les cellules B traitées par Tat.** Les cellules B ont été traitées avec 250 ng/ml Tat pendant 48 heures pour étudier l'effet apoptotique de Tat, en utilisant le kit de détection d'apoptose V-FITC d'Annexin. Le spectre montre le même marquage entre les cellules B traitées par Tat et les cellules B non traitées utilisées comme contrôle négatif.



## *Conclusion I*



Ce travail montre le rôle pro-oxydant et oncogène de la protéine transactivatrice Tat du VIH-1 démontré pour la première fois dans les lymphocytes B humains non-infectés par le VIH-1.

L'incubation des cellules B humaines isolées des donneurs sains avec la protéine Tat purifiée, a abouti à l'induction du stress oxydant, suite à la production excessive des espèces réactives de l'oxygène (ROS) majoritairement d'origine mitochondriale, ainsi qu'à la diminution précoce de taux de l'antioxydant intracellulaire le glutathion sous sa forme réduite et totale, suite à la suppression de l'expression des gènes codants les deux sous-unités lourd et léger de l'enzyme de synthèse de GSH, le  $\gamma$ GCS. La conséquence de cette perturbation de l'état est l'induction des dommages oxydants causés à l'ADN dans les cellules B et des aberrations chromosomiques. Les effets pro-oxydant et oncogène de Tat ont été liés à son activité transcriptionnelle dont elle a induit la voie de l'activation du NF- $\kappa$ B.

En conclusion, le stress oxydant, les dommages à l'ADN et les aberrations chromosomiques induits par la Tat, sont des nouveaux facteurs oncogènes favorisant le développement des lymphomes B chez les individus infectés par le VIH-1.

Dans cette partie nous avons établi le rôle pro-oxydant de Tat dans les cellules B humaines. Cet effet néfaste peut être partiellement inhibé par des antioxydants.

Dans le cadre de ma thèse en cotutelle, nous avons extrait et utilisé des antioxydants naturels à partir des plantes récoltées du Liban. Deux plantes endémiques ont été récoltées du Liban en Juillet 2015 *Vicia canescens* (VC) et *Euphorbia macroclada* (EM). L'extraction par macération des molécules actives par différents solvants suivie de fractionnement en utilisant plusieurs solvants organiques de différentes polarités, ont été réalisés.

Le pouvoir antioxydant des différents extraits bruts a été testé par le test de piégeage du radical stable DPPH', ainsi que leur activité antioxydante vis-à-vis le stress oxydant et les dommages à l'ADN induits par Tat dans les cellules B, ont été testés, par le test du DHE et l'immunofluorescence  $\gamma$ H2AX.



## *Résultats II*



## **2. Etude de l'effet antioxydant des extraits de plantes et leur effet sur le stress oxydant et les dommages oxydants causés à l'ADN, induits par la protéine Tat du VIH-1 dans les cellules B humaines**

Les deux tiers des espèces végétales de monde sont connus par leur potentiel antioxydant. Les plantes sont riches en antioxydants localisés dans leurs tiges, leurs racines, leurs écorces, leurs feuilles, leurs fruits et ainsi leurs graines (pour revue (Krishnaiah et al., 2011)).

Dans le but d'identifier des nouvelles molécules antioxydantes, nous avons choisi deux plantes endémiques du Liban : *Vicia canescens* (VC) et *Euphorbia macroclada* (EM). Les extraits bruts et les fractions obtenues à partir des feuilles et des fleurs de ces deux plantes respectivement ont été étudiés pour leur potentiel antioxydant par le test de piégeage du radical stable DPPH<sup>•</sup> et sur leur effet inhibiteur de l'activité pro-oxydante de la protéine Tat sur l'induction du stress oxydant et des dommages à l'ADN dans les cellules B humaines.

### **2.1. Préparation des extraits des plantes**

Afin d'obtenir les différents extraits bruts à partir des plantes fraîches, du *Vicia canescens* et de l'*Euphorbia macroclada*, l'extraction par macération a été effectuée.

Les feuilles et les fleurs fraîches du VC et de l'EM respectivement, ont été extraites avec 70 % de l'éthanol (1 : 3 (p/v)) pour une semaine, ensuite, les extraits bruts obtenus ont été filtrés sous vide. Les filtrats des extraits bruts ont été soumis à l'évaporation rotative sous pression, pour évaporer et pour concentrer les produits, comme décrits dans la partie Matériels et Méthodes.

Un fractionnement par décantation a été réalisé, en utilisant trois différents solvants organiques à polarité croissante : l'hexane, le dichlorométhane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) et l'acétate d'éthyle (AcOEt).

Finalement, les différentes fractions ont été dissoutes soit dans le DMSO afin d'effectuer les différentes expériences sur les cellules B (DHE et l'immunofluorescence), soit dans de l'éthanol absolu pour effectuer le test de piégeage du DPPH<sup>•</sup>.

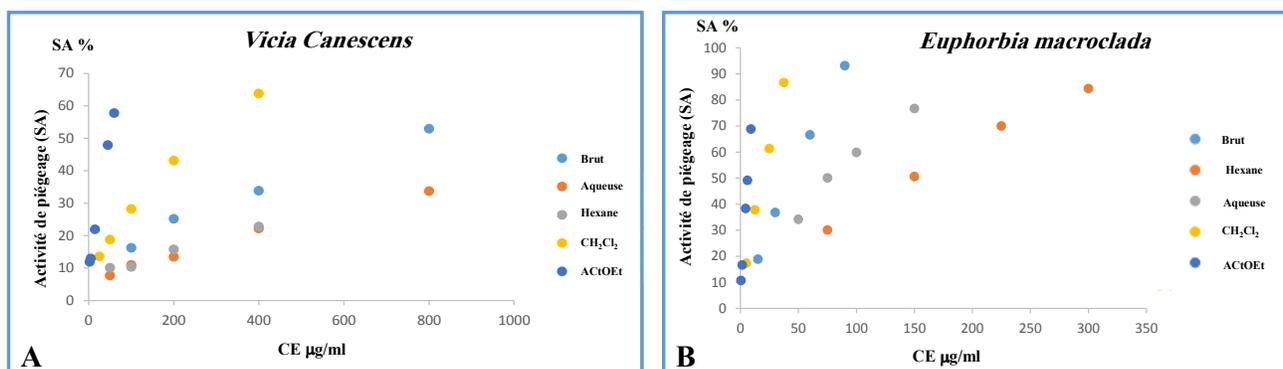
### **2.2. Etude du pouvoir antioxydant des extraits bruts et de leur fractions**

Pour tester le pouvoir antioxydant des extraits bruts et de leurs fractions (d'hexane, de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, de l'AcOEt et de la phase aqueuse), le test du piégeage du radical libre stable le DPPH<sup>•</sup> a été appliqué.

Le DPPH<sup>•</sup> violet est réduit en DPPH de coloration jaune, en présence des antioxydants. L'efficacité d'un antioxydant se fait par spectrophotométrie (Molyneux, 2004).

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, la détermination de la quantité d'extrait nécessaire pour réduire 50 % du DPPH<sup>•</sup> (concentration effectrice ou CE 50) a été calculée. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que sa CE50 est petite. L'activité est définie par l'indice de la réduction de l'activité anti-radicalaire en pourcentage SA % (voire les Matériels et Méthodes).

Après l'analyse spectrophotométrique, les courbes d'étalonnage ont été tracées et le calcul de l'activité de piégeage (SA %), nous a permis de calculer la CE 50 des différents extraits et de leurs fractions en µg/ml. La **Figure 21** représente les différentes courbes d'étalonnage.



**Figure 21.** Graphes représentant le pourcentage de l'activité de piégeage en fonction de la concentration effectrice des différentes fractions et des extraits des plantes étudiées. **A.** Fractions de l'Hexane, de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, de l'ActOEt, de la phase aqueuse et de l'extrait brut du VC. **B.** Fractions d'Hexane, de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, de l'ActOEt, de la phase aqueuse et de l'extrait brut de l'EM.

**Tableau 5. Tableau résumant les équations ainsi que les coefficients de régression, et les différentes CE  $\mu\text{g/ml}$  pour chaque extrait brut et les différentes fractions des plantes suivantes.**

Plantes	Fractions	Equation et coefficient de régression	Concentration effectrice CE 50 ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Vicia canescens</i>	Brut	$y = 0,0503x + 13,148$ ( $R^2 = 0,9888$ )	732,6441352
	Aqueuse	$y = 0,0343x + 6,9674$ ( $R^2 = 0,9907$ )	1254,594752
	Hexane	$y = 0,0383x + 7,5469$ ( $R^2 = 0,9832$ )	1108,436031
	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	$y = 0,1321x + 13,01$ ( $R^2 = 0,9816$ )	280,01514
	AcOEt	$y = 0,821x + 9,5419$ ( $R^2 = 0,9979$ )	49,27904994
<i>Euphorbia macroclada</i>	Brut	$y = 0,9842x + 5,8997$ ( $R^2 = 0,997$ )	44,80827068
	Aqueuse	$y = 0,4124x + 16,57$ ( $R^2 = 0,9762$ )	81,06207565
	Hexane	$y = 0,2429x + 13,271$ ( $R^2 = 0,9937$ )	151,2103746
	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	$y = 2,0906x + 9,03$ ( $R^2 = 0,9955$ )	19,59724481
	AcOEt	$y = 6,9267x + 6,9949$ ( $R^2 = 0,9995$ )	6,208598611

A partir des équations de la régression de chaque courbe, nous avons pu calculer la CE 50 pour chaque fraction et extrait du VC et de l'EM. Les résultats montrent que les extraits bruts ainsi que les différentes fractions organiques des plantes appropriées possèdent des activités antioxydantes. La fraction d'acétate d'éthyle pour chacun du VC et l'EM qui contient les produits polaires comme les acides phénoliques, possède la CE 50 la plus petite alors le pouvoir antioxydant le plus puissant. En comparant les résultats obtenus concernant la concentration effectrice CE 50 ( $\mu\text{g/ml}$ ), avec celles des antioxydants naturels puissants : la catéchine et l'acide ascorbique, on trouve que la fraction AcOEt de l'EM montre une CE 50 proche à celle des deux antioxydants naturels : 6,21  $\mu\text{g/ml}$  ( $\emptyset$  AcOEt) vis-à-vis de 2,5  $\mu\text{g/ml}$  (celle de l'acide ascorbique et la catéchine, utilisés comme contrôle positif).

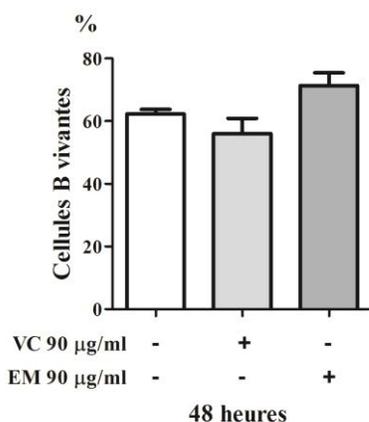
### 2.3. Cytotoxicité des extraits bruts sur les cellules B

Pour suivre la viabilité des cellules B en présence des extraits bruts du VC et de l'EM, autrement dit pour tester la toxicité des extraits sur les cellules B, le test de bleu de trypan a été réalisé. Le but

principal c'est d'affirmer que les effets des extraits ne sont pas les conséquences de leur cytotoxicité sur les cellules B.

Après isolation des cellules B du sang des donneurs sains comme décrit dans les Matériels et Méthodes, elles ont été traitées par 90 µg/ml des extraits bruts du VC et de l'EM pour 48 heures à 37 °C et à 5 % CO<sub>2</sub>.

Les résultats sont présentés dans la **Figure 22** sous forme de pourcentage des cellules B vivantes après incubation en présence des extraits bruts du VC et de l'EM. La viabilité des cellules B reste supérieure à 50 % en présence des différents extraits bruts des plantes correspondantes en comparant aux lymphocytes B normaux de viabilité de ≈ 62,33 %.



**Figure 22.** L'effet des extraits bruts du VC et EM sur la viabilité des cellules B en utilisant le test de bleu de trypan. Chaque barre représente la moyenne ± SD de 3 expériences séparées.

Les résultats montrent que les extraits des plantes du VC et de l'EM n'ont pas d'effet cytotoxique sur les lymphocytes B, dont nous a permis de réaliser la suite des expériences pour étudier leur effet antioxydant contre le rôle pro-oxydant de Tat dans les lymphocytes B.

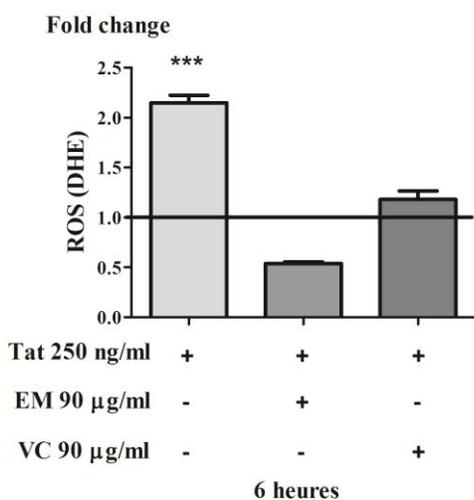
#### **2.4. Effet antioxydant des extraits bruts sur les cellules B traitées par Tat**

Dans la première partie nous avons établi le rôle pro-oxydant de Tat dans les cellules B humaines. Pour évaluer l'effet antioxydant des extraits des plantes, les lymphocytes B ont été traités par Tat 250 ng/ml seule ou en présence de chacun des différents extraits bruts des plantes à 90 µg/ pendant 6 heures.

Ensuite les cellules B traitées et non traitées ont été marquées par le Dihydroéthidium (DHE), qui en présence des ROS (anion superoxyde), il est converti en oxyéthidium qui a la capacité d'intercaler à

l'ADN donnant une fluorescence rouge détectable en microscopie à fluorescence. Les images ont été prises par microscope à fluorescence (Microvision) et la densité de la fluorescence a été quantifiée en utilisant le logiciel algorithme ImageJ, et elle a été normalisée par le nombre des cellules comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes.

Dans les cellules B traitées par Tat 250 ng/ml pour 6 heures, le niveau des ROS a été de  $2.15 \pm 0.071$  ( $p < 0.001$ ) plus élevé que dans les cellules B non traitées (considérées comme contrôle négatif). Tandis que dans les cellules B traitées par les extraits bruts des plantes du VC ou de l'EM en présence de Tat, les niveaux des ROS induits par Tat ont été diminués approximativement vers le niveau basal dans les cellules B qui a été fixé à 1, d'où la confirmation des effets antioxydants des extraits bruts des plantes appropriées sur le rôle pro-oxydant de Tat dans les cellules B humaines (**Figure 23**).



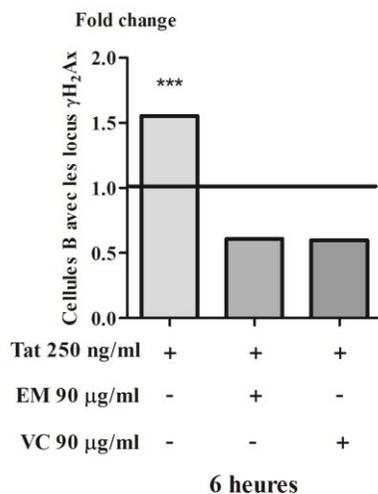
**Figure 23.** La production des ROS dans les cellules B traitées par Tat seule ou en présence de 90 µg/ml de chacun des extraits bruts des plantes (VC et EM), en comparaison avec le niveau basal dans les cellules B non traitées considérées comme contrôle négatif. La production des ROS dans les cellules B traitées par Tat 250 ng/ml et l'étude des effets antioxydants des extraits bruts ont été détectés par le marquage par le DHE, comme décrits dans la partie Matériels et Méthodes. L'axe des Y montre le niveau des ROS dans les cellules B traitées comparant aux cellules B non traitées, dont la valeur basale a été fixée à un niveau égal à 1. Au moins 1000 cellules B ont été analysées pour chaque condition, et quantifiées en utilisant le logiciel algorithme ImageJ normalisé par le nombre des cellules. L'expérience a été effectuée en duplicata.

## **2.5. Etude de l'effet antioxydant des extraits bruts des plantes sur les dommages oxydants causés à l'ADN induits par Tat dans les cellules B.**

Nous avons montré dans la première partie que la conséquence du stress oxydant provoqué par Tat dans les cellules B c'est l'induction des dommages oxydants causés à l'ADN. Pour tester le rôle antioxydant des extraits du VC et de l'EM dans l'inhibition des dommages oxydants causés à l'ADN induits par la protéine Tat dans les cellules B, nous avons recours à l'immunofluorescence de l'histone  $\gamma$ H2AX, qui est un marqueur des cassures double brin.

Les cellules B ont été traitées par 250 ng/ml Tat seule ou en présence de 90  $\mu$ g/ml des différents extraits bruts des plantes VC et EM pour 6 heures, les cellules B non traitées ont été considérées comme le contrôle négatif. Après marquage du  $\gamma$ H2AX par immunofluorescence, les images ont été acquises par microscopie confocale et les résultats ont été analysés par le logiciel ImageJ. Les graphes sont représentées sous forme de rapport du nombre des cellules B traitées avec Tat en absence ou en présence des extraits bruts du VC et de l'EM avec le marquage  $\gamma$ H2AX, en comparant avec le contrôle négatif non traité dont le niveau des cellules avec le marquage  $\gamma$ H2AX a été fixé à 1.

Effectivement, le niveau des cellules B possédant le marquage  $\gamma$ H2AX, traitées avec 250 ng/ml Tat seule pour 6 heures a été de 1,554 fois plus élevé que celui dans les cellules B non traitées (contrôle négatif). En outre, les cellules B traitées par Tat 250 ng/ml en présence de 90  $\mu$ g/ml de chacun des différents extraits bruts des plantes (VC et EM) avaient, approximativement, un niveau basal des dommages oxydants causés à l'ADN comparable à celui présent dans les cellules B non traitées. D'où on pourrait conclure que grâce à l'effet antioxydant des extraits du VC et de l'EM, les dommages oxydants causés à l'ADN et le stress oxydant induit par Tat dans les cellules B pourraient être inhibés (**Figure 24**).



**Figure 24.** Les extraits bruts des différentes plantes ont des effets antioxydants inhibant les dommages oxydants causés à l'ADN induits par Tat dans les cellules B. L'axe des Y représente le niveau des cellules B traitées (par Tat 250 ng/ml seule ou avec 90 µg/ml des différents extraits bruts des plantes appropriées) avec le marquage  $\gamma$ H2AX en comparant avec les cellules B non traitées, considérées comme contrôle négatif, dont le niveau des dommages de l'ADN a été fixé à 1. Au minimum 300 cellules ont été examinées après 6 heures du traitement par les différents extraits en présence de Tat. Les expériences ont été réalisées en duplicata.

Toutes les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par le test one-way ANOVA. La signification statistique a été calculée par rapport aux témoins non traités.



## *Conclusion II*



Nous avons montré que les extraits bruts et les différentes fractions organiques des plantes appropriées possèdent des activités antioxydantes mis en évidence par le test de piégeage de radical libre stable le DPPH'. En comparant les résultats obtenus présentés par la concentration effectrice CE 50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) des différents extraits et fractions des plantes, avec ceux des antioxydants naturels puissants, nous avons trouvé que les fractions de l'AcOEt possèdent l'activité antioxydante *in-vitro* le plus puissant et en particulier celle de l'*Euphorbia macroclada*.

Dans le but de l'investigation des nouveaux antioxydants exogènes naturels et puissants capable de nous guider pour éclaircir le(s) mécanisme(s) d'action de Tat associées avec la lymphomagenèse B chez les patients infectés par le VIH, nous avons testé le pouvoir antioxydant des extraits bruts sur le stress oxydant et les dommages oxydants causés à l'ADN induits par Tat dans les cellules B humaines. Après le test de cytotoxicité, dans le but de vérifier la viabilité des cellules B en présence de ces extraits, nous avons étudié la capacité des extraits de plantes à diminuer le stress oxydant provoqué par la protéine. L'analyse des résultats montrent le pouvoir potentiel antioxydant de ces extraits sur l'inhibition du stress oxydant et des dommages oxydants causés à l'ADN induits par Tat dans les cellules B. L'extrait brut de l'*Euphorbia macroclada* a la capacité antioxydant maximale parmi les extraits testés surtout la fraction d'acétate d'éthyle riche en molécules polaires.

En effet, il sera intéressant comme perspectives à long terme, de comprendre le mécanisme d'action avec lequel les extraits bruts de plantes endémique ont pu inhiber l'effet pro-oxydant de Tat. Ainsi, de comprendre si c'est une séquestration ou à une interférence avec l'internalisation de Tat ou est-il dû à la réduction du stress oxydant.



## *Discussion*



Cette étude est axée sur la compréhension de la lymphomagenèse associée au VIH. La plupart des lymphomes qui se développent chez les patients infectés par le VIH sont de lymphomes B, bien que le VIH-1 n'infecte pas les lymphocytes B (Gibson et al., 2014).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le phénomène de lymphomagenèse. L'hypothèse la plus connue est que les patients infectés par le VIH possèdent un système immunitaire affaibli à cause de la forte déplétion des lymphocytes T CD4+, dont ils sont soumis à plusieurs infections opportunistes. Ce nombre faible de CD4 était associé aux différents types de malignité surtout des lymphomes B chez les sujets séropositifs (Bower et al., 2009b). L'introduction de la cART a été associée à une amélioration de la survie et de l'immunité des patients infectés, en reconstituant le taux des cellules T, ainsi qu'une diminution des malignités associées au SIDA a été observée (Stebbing et al., 2004b), mais les personnes infectées par le VIH présentent toujours un risque accru de développer des sous-types de lymphomes spécifiques surtout B, notamment DLBCL, LB et LH (Chao et al., 2010; Gibson et al., 2014; Jin et al., 2017).

Les cellules infectées par le VIH, libèrent dans le sang des protéines virales capable de pénétrer dans les cellules non infectées. Parmi eux, la protéine transactivatrice Tat du VIH-1 qui est sécrétée dans le sang par les cellules infectées et est capable de pénétrer dans les cellules non infectées y compris dans les lymphocytes B. Tat est détectée présente toujours dans le sérum des patients infectés soumis sous la cART (Romani et al., 2010b).

En effet, Tat est une protéine hydrophobe de petite taille (99-103 acides aminés), elle est sécrétée par les cellules infectées par plusieurs manières, comme l'interaction directe et la pénétration à travers la membrane plasmique ou par la biogenèse d'exosomes. Les cellules infectées secrètent Tat dans le milieu extracellulaire dont elle a la capacité de pénétrer dans les cellules non infectée de plusieurs façons. Premièrement, Tat peut reconnaître des sites de liaison sur la membrane plasmique comme le CXCR-4 et le LRP (protéine associée au récepteur de lipoprotéines). Majoritairement, Tat peut pénétrer dans les cellules par endocytose, en dépendant du type des récepteurs présents à la surface des cellules. Deux types des récepteurs pourraient être présents : les récepteurs cavéolaires et les récepteurs dépendant de la clathrine/dynamine2/AP2. Ainsi Tat peut pénétrer dans les cellules de système nerveux central par transport passif (pour revue (Clark et al., 2017)).

En plus, Tat possède un domaine de transduction de protéine PTD responsable de sa pénétration à travers la membrane plasmique. Ce domaine basique est riche en acide aminé cationique (arginine)

caractérisée par une tête hydrophobique (la guanidine) ce qui facilite la pénétration de Tat dans les cellules. Ainsi il possède une affinité élevée au Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) composant phospholipidique de la membrane plasmique.

Tat, grâce à son peptide pénétrant dans les cellules (CPP), est connue par son rôle dans le transfert des macromolécules, des protéines, de l'acide nucléique, des petites molécules comme les probes fluorescente et les chélateurs, ainsi des nanoparticules à travers la membrane. Plusieurs études utilisant Tat ont démontré son rôle dans la livraison très efficace de cargaison (cargo) qui peut atteindre plusieurs centaines de nanomètres, dans les cellules à la fois *in-vitro* et *in-vivo* (pour revue (Zhao and Weissleder, 2004)).

Certaines études ont montré que la présence de glycosaminoglycanes chargées négativement, à la surface des cellules, facilite le rôle de Tat dans le transport des cargaisons, majoritairement par endocytose (Console et al., 2003).

La délivrance intracellulaire de nombreux agents thérapeutiques et diagnostiques peut être difficile à cause des bicouches lipidiques lipophiles de la membrane plasmique qui constituent une vraie barrière pour les biomolécules. La découverte de peptides perméables aux cellules (CPP) a permis de transporter une large gamme d'agents physiologiquement et thérapeutiquement actifs dans des cellules vivantes. Plusieurs études montrent son utilisation en plan thérapeutique dans la livraison des agents diagnostiques ainsi pour la thérapie protéique dans le traitement de plusieurs maladies.

En revanche, Tat possède des propriétés oncogéniques. Des études sur des souris transgéniques exprimant Tat ont montré que ces souris ont la capacité de développer des lymphomes B (Curreli et al., 2013; Kundu et al., 1999) et de cancer colorectal (Huynh et al., 2007). D'autres études sur des fibroblastes transformés *in-vitro* ainsi que chez les souris nues et immunocompétentes, ont montré que Tat est impliquée dans la pathogenèse du sarcome de Kaposi associé au SIDA (Chen et al., 2009).

Parmi les causes multiples et principales de l'oncogénèse, se cite les dommages à l'ADN et l'instabilité génomique. La définition de cancer a été comme un trouble génétique impliquant des instabilités génomiques et que les cellules anormales cancéreuses se développent majoritairement suite à l'induction des dommages de l'ADN (DA) (Brookes and Lawley, 1960). Plusieurs protéines du VIH possèdent une capacité d'induction de l'instabilité génomique dans les cellules infectées (pour revues (Musinova et al., 2016; Ryan et al., 2016)). Cependant, l'étude sur leur effet oncogène global sur les

cellules B non infectées est susceptible d'être limité, étant donné que le VIH-1 n'infecte pas les cellules B.

Une partie importante des DA est causée par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) définissant les dommages oxydants causés à l'ADN (Lu et al., 2001). L'ADN est continuellement attaqué par les ROS qui peuvent affecter et perturber gravement leur structure, risquant une instabilité génomique, si elle n'est pas réparée, des conséquences pathologiques peuvent avoir lieu.

Comme de nombreux virus, le VIH-1 est responsable à l'initiation du stress oxydant dans les cellules infectées. Cependant, les cellules infectées par le VIH-1 peuvent induire la perturbation de l'homéostasie redox dans les cellules non infectées par l'intermédiaire des médiateurs de poids moléculaire bas ou des protéines virales libérées, y compris Tat qui est connue par son rôle pro-oxydant (Mollace et al., 2001b). La diminution de la production des ROS, ainsi que l'atténuation des niveaux des dommages de l'ADN suite à l'incubation avec des antioxydants, surtout ceux qui ciblent les mitochondries (source majeure de la production des ROS), démontrent que Tat favorise l'instabilité génomique par l'induction de la production mitochondriale des ROS. En effet, des taux élevés des ROS et un état potentiel du stress oxydant étaient rapportés dans les cellules infectées par le VIH-1 (Ivanov et al., 2016b; Manda et al., 2011). Il a été démontré que Tat induit la production excessive des ROS par plusieurs mécanismes, soit en activant les NADPH et les spermine oxydases, soit par la perméabilisation de la membrane mitochondriale, la perturbation de sa fonction et l'inactivation de la cytochrome c oxydase dans les cellules T (Capone et al., 2013). Tat peut également induire le stress oxydant en perturbant la capacité du système de défense antioxydante.

Nous avons alors émis l'hypothèse que Tat-VIH-1 pourrait jouer un rôle dans la lymphomagenèse B associées au VIH, supposant que parmi ses mécanismes d'action c'est l'induction des dommages de l'ADN et l'instabilité.

Nous avons montré que les cellules B des personnes infectées par le VIH avaient un niveau significativement plus élevé des dommages à l'ADN ainsi qu'un état du stress oxydant puissant par rapport aux cellules B isolées du sang des donneurs sains, et que l'incubation par Tat seule était suffisante pour déclencher une cascade d'événements aboutissant à la génération des cassures double brin et à la perturbation de l'état redox dans les cellules B humaines.

Alors, nous avons montré pour la première fois le rôle pro-oxydant de Tat dans les cellules B humaines, en induisant la production excessive des ROS mitochondriales et la diminution simultanée

des niveaux de l'antioxydant puissant le glutathion cellulaire GSH sous sa forme réduite dans les cellules B non infectées.

Le glutathion ou GSH (forme réduite), est un tri-peptide, formé de trois résidus ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine), il est reconnu par son groupement sulfhydryle ou thiol (-SH) qui lui confère ses principales propriétés biochimiques. C'est un antioxydant endogène important et le plus abondant (Bachhawat et al., 2013), sa concentration dépend fortement de l'organisme, de type cellulaire et des compartiments extracellulaire ou intracellulaire (Deponce, 2013, 2017). Il est synthétisé par deux réactions enzymatiques séquentielles. La première étape de la synthèse est catalysée par l'enzyme gamma-glutamyl-cystéine synthétase ( $\gamma$ -GCS), et la deuxième étape est médiée par le GSH synthétase (GS) (Meister and Anderson, 1983). Il a été démontré que la régulation de l'expression du gène codant le GS n'a pas un effet sur l'augmentation de niveau du GSH tandis que la régulation de celle du  $\gamma$ -GCS a un effet significatif sur le niveau du GSH, (Ferguson and Bridge, 2016; Grant et al., 1997; Liu et al., 2012; Shi et al., 1994) (pour revue (Richter and Kietzmann, 2016)). Une étude sur des souris transgéniques exprimant Tat du VIH-1, a montré le rôle de Tat dans la répression de l'expression de gènes codant le  $\gamma$ -GCS (Choi et al., 2000a). Nous avons montré dans les cellules B humaines, l'effet de la protéine Tat dans la répression de l'expression des gènes codant les deux sous-unités de l'enzyme  $\gamma$ -GCS, ce qui explique la diminution de taux du GSH dans les cellules B humaines isolées du sang des donneurs sains traitées par la protéine recombinante Tat.

La concentration du GSH cellulaire dépend aussi de son cycle de recyclage par certains enzymes antioxydants, qui l'utilisent comme un cofacteur pour leurs réactions enzymatiques, comme le glutathion réductase (GR) et le glutathion peroxydase (GPx). Etant donné que Tat est un facteur de transcription qui est capable de réguler l'expression des gènes viraux ainsi que cellulaires (Marban et al., 2011; Reeder et al., 2015), nous avons essayé l'effet de Tat sur la régulation de l'expression d'une gamme très large des gènes impliqués dans la régulation de l'état redox cellulaire, dont il a été montré le rôle de Tat dans la régulation de leurs expressions dans les cellules infectées par le VIH (Choi et al., 2000a; Flores et al., 1993; Richard et al., 2001). Parmi les gènes testés c'était le GPx 1 et 3 ainsi que le GR, dont Tat n'avait pas un effet significatif sur leur expression dans les cellules B, mais ça n'explique pas que Tat ne pourrait pas avoir un effet sur leurs activités.

Le GSH se trouve normalement en équilibre avec la forme oxydée ou GSSG, un hexa-peptide lié par un pont disulfure (Kaplowitz et al., 1985). Le GSH réduit est la forme prédominante et il représente

98 % du GSH total (Forman et al., 2009). Le rapport GSH/GSSG est parmi les marqueurs principaux utilisés dans l'étude de l'état redox cellulaire (Zitka et al., 2012). Plusieurs études ont établi un lien entre la diminution du rapport GSH/GSSG et le développement tumoral. Une étude *in-vivo* dans le sang des souris porteurs de tumeurs ascitique d'Ehrlich, et une autre étude sur le sérum sanguin des patients atteints de cancer pédiatrique, montrent une diminution du rapport GSH/GSSG, d'une manière significative durant la croissance tumorale (Navarro et al., 1999; Zitka et al., 2012). Des études sur le plasma, les PBMC, les érythrocytes et les macrophages des personnes infectées par le VIH ont montré que le rapport GSH/GSSG est très bas (Buhl et al., 1989; Morris et al., 2012, 2014; Sbrana et al., 2004; Suresh et al., 2009). Ainsi que la protéine virale Tat seule a la capacité de réduire le rapport GSH/GSSG dans les cellules endothéliales de cerveau des sujets séropositifs (Price et al., 2005).

Les cellules B ont une capacité d'absorption limitée pour la cystine extracellulaire (Banjac et al., 2008), un substrat limitant la vitesse de synthèse du GSH, ainsi qu'un faible niveau d'expression de la gamma-glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ GT). Cette enzyme clive le glutathion (GSH) pour faciliter la recapture de la cystéine par la cellule pour la synthèse du GSH intracellulaire (Karp et al., 2001; Täger et al., 1995). Cela pourrait expliquer le faible niveau de GSH réduit détecté dans cette étude et la haute sensibilité des cellules B au stress oxydant. Nous avons trouvé que Tat est capable de diminuer le rapport GSH/GSSG ainsi que le GSH total. La perturbation de l'état redox pourrait déclencher l'activation de plusieurs facteurs, y compris le facteur nucléaire NF- $\kappa$ B impliqué dans la maintenance de l'homéostasie redox et cellulaire et dans la régulation positive ou négative du stress oxydant et des DA oxydants fortement dépendant de type cellulaire.

En plus de l'induction des DA oxydants, les ROS peuvent également oxyder d'autres molécules cellulaires comme les protéines et les lipides, en modifiant ainsi les cascades de signalisation dont ces molécules y sont impliquées comme la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Suite à l'induction de la production des ROS, Tat peut activer différentes voies de signalisation y inclut la voie d'activation du NF- $\kappa$ B. Différentes études ont montré l'effet de la protéine Tat dans l'activation de NF- $\kappa$ B, soit directement ou indirectement. Dans des conditions normales, NF- $\kappa$ B est séquestré dans le cytoplasme par son inhibiteur I $\kappa$ B. Différents stimuli peuvent aboutir à l'activation de ce facteur de transcription, comme le facteur de nécrose tumorale TNF- $\alpha$  et les ROS. Cette activation passe par la phosphorylation de l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$  par la kinase I $\kappa$ B activée (IKK), aboutissant à son ubiquitination

et à sa dégradation protéolytique ce qui libère le complexe NF- $\kappa$ B sous sa forme active dans le noyau (Morgan and Liu, 2011b).

Tat peut agir sur plusieurs éléments clés dans la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B. Une interaction physique directe entre Tat et l'inhibiteur de l'I $\kappa$ B $\alpha$  a été démontrée; Tat rentre en compétition avec l'I $\kappa$ B, ce qui libère le NF- $\kappa$ B vers le noyau (Puca et al., 2007). De plus, Tat peut également interagir directement avec la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B, ce qui favorise l'affinité de liaison de p65 à l'ADN et renforce l'activité transcriptionnelle (Demarchi et al., 1996; Liu et al., 1992). Ainsi que certains gènes régulés par le NF- $\kappa$ B, sont trouvés régulés aussi par Tat suite à sa liaison à l'élément activateur de promoteur de ces gènes cibles, favorisant le recrutement et l'activation du NF- $\kappa$ B vers ses gènes cibles (Dandekar et al., 2004; Fiume et al., 2012b).

Tat peut également affecter l'activation de NF- $\kappa$ B, indirectement de différentes manières. Par exemple, il peut agir sur les enzymes cruciales impliqués en amont de la voie d'activation du NF- $\kappa$ B, telles que l'IKK et d'autres protéines kinases impliquées dans la phosphorylation de l'I $\kappa$ B $\alpha$ , conduisant à sa dégradation protéolytique (Demarchi et al., 1996). Une des manières indirectes de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par Tat, et l'augmentation de l'affinité de ce facteur sur les sites de liaisons à l'ADN c'est via la perturbation de l'état redox intracellulaire dont les ROS excessives sont capables d'induire la phosphorylation de l'I $\kappa$ B $\alpha$  et par la suite sa dégradation (Blazquez et al., 1999; Couret and Chang, 2017).

Nous avons montré aussi que l'incubation des cellules B par des antioxydants, a inhibé le stress oxydant induit et l'activation de NF- $\kappa$ B par Tat. En combinant ces résultats, on peut supposer que Tat pourrait induire l'activation de NF- $\kappa$ B en perturbant l'état redox, en induisant le stress oxydant, via la production excessive des ROS mitochondriales, impliquées dans les voies d'activation du NF- $\kappa$ B.

Nos résultats suggèrent que l'induction des DA et l'instabilité génomique par ROS dans les cellules B peuvent être des conséquences indésirables de la stratégie utilisée par le VIH pour infecter les lymphocytes T surtout que les ROS sont utilisées comme des seconds messagers qui sont impliqués dans les voies d'activation du NF- $\kappa$ B, ce facteur de transcription contrôle la transcription des gènes impliqués dans la réplication du VIH (Nakamura et al., 2002), et l'intégration du virus dans le génome de l'hôte (Koyama et al., 2013).

Plusieurs aberrations chromosomiques ont été trouvées dans la plupart des principaux types tumoraux (Fröhling and Döhner, 2008; Kim et al., 2013). Le rôle de la protéine Tat dans l'induction des aberrations chromosomiques au niveau des cellules ou systèmes humains n'a été jamais étudié. Une seule étude sur le rôle de Tat dans l'induction des aberrations au niveau de nombreux chromosomes, a été étudié sur des embryons de *Drosophila* injectés par la protéine purifiée Tat du VIH-1 (Battaglia et al., 2005). Nous avons pu montrer le rôle de la protéine oncogénique d'une autre façon, en étudiant son effet sur l'induction des aberrations chromosomiques dans les lignées cellulaires lymphoblastoïdes RPMI 8866, dont plusieurs anomalies chromosomiques ont été détectées suite à l'analyse de caryotype.

L'immunisation par Tat a été proposée comme l'une des stratégies de vaccination contre le VIH (Ensoli et al., 2015). Notre étude montre que cette approche pourrait avoir des conséquences potentiellement dangereuses. L'utilisation des antioxydants a été proposée comme une thérapie potentielle de l'infection par le VIH depuis de nombreuses années (pour revue (Aquaro et al., 2008)), bien que des preuves contradictoires aient été obtenues jusqu'à présent pour leur effet bénéfique. Nous avons montré que Tat induit la production excessive des ROS mitochondriales. Dont la nécessité de la recherche d'une nouvelle génération des antioxydants ciblant spécifiquement les mitochondries.

Une partie de ma thèse a été consacrée pour l'investigation des nouvelles molécules antioxydantes exogènes extraites à partir des plantes endémiques du Liban. Les sources naturelles que ce soit à partir des aliments d'origine animale, ou végétale, sont parmi les sources principales des antioxydants exogènes naturels. Les plantes synthétisent ces composés photochimiques pour maximiser leurs défenses contre le stress environnemental, biotiques et abiotiques (Kasote et al., 2015). De nos jours, il a été estimé que plus de 50 % des médicaments disponibles proviennent en quelque sorte des plantes (pour revue (Rafieian-Kopaei and Sewell, 2014)). Les pouvoirs antioxydants de ces molécules augmentent en dépendant de leur structure chimique, comme la présence de groupement hydroxyle qui confère à la molécule, la plupart de ses caractéristiques antioxydants.

Pour la raison d'obtenir des molécules à potentiel antioxydant, nous avons recours à l'extraction par macération des différentes plantes de différentes régions du Liban, par de solvants organiques suivie de fractionnement par des solvants à différentes polarités. Des extraits bruts (contenant tous les constituants extraits par macération) et les différentes fractions d'hexane, de dichlorométhane et d'acétate d'éthyle (contenant les molécules solubles dans chaque solvant selon une polarité croissante) ont été testés par le test de piégeage du radical stable DPPH', ainsi que leur effet *in-vitro* sur les cellules

B humaines isolées du sang des donneurs sains traitées par Tat, pour tester leur capacité d'inhibition du stress oxydant et des dommages oxydants causés à l'ADN induits par Tat. Nos résultats nous permettent de conclure que les différents extraits bruts des plantes choisies avaient des effets antioxydants inhibiteurs du rôle de la protéine Tat pro-oxydant. Par conséquent, leur utilisation permettrait potentiellement d'envisager des nouvelles stratégies de traitement et/ou prévention des lymphomes liés à ce virus. En plus, l'utilisation des inhibiteurs de Tat récemment développés (Mousseau et al., 2015) pourrait également réduire l'incidence des lymphomes associés au VIH.

## *Conclusions et Perspectives*



Nous avons montré pour la première fois le rôle de la protéine transactivatrice de la transcription Tat du VIH-1 dans l'induction du stress oxydant et des dommages oxydants causés à l'ADN dans les cellules B humaines isolées du sang des donneurs sains. Ainsi nous avons montré que même les cellules B non infectées par le VIH sont soumises sous un état de stress oxydant et des dommages oxydants causés à l'ADN dans le sang des patients du VIH. La protéine Tat peut perturber l'homéostasie redox dans les cellules B non infectées. Elle aboutit à la production excessive des ROS surtout mitochondriales et diminue le bagage antioxydant en GSH. Cette perturbation de l'état redox comme conséquence l'activation du facteur de transcription détecteur du stress oxydant le NF- $\kappa$ B, dont sa voie d'activation a été montrée régulée par Tat soit d'une manière directe ou indirecte. Dans notre travail, nous avons supposé que Tat induit l'activation du NF- $\kappa$ B d'une manière indirecte à cause de son activité transcriptionnelle et non pas d'une manière directe, suite à une interaction protéine-protéine. Nous avons aussi montré pour la première fois le rôle de Tat dans l'induction des aberrations chromosomiques dans des modèles cellulaires humaines, les lignées cellulaires lymphoblastoïdes RPMI 8866. Ces résultats sont des nouveaux facteurs promoteurs pour comprendre le mécanisme d'action de la protéine Tat du VIH associé au développement des lymphomes B chez les patients infectés par le VIH.

Pour bien comprendre le rôle pro-oxydant de Tat dans la production des ROS mitochondriales et la perturbation de système de défense antioxydante dans les cellules B, et son rôle proto-oncogène dans l'induction des aberrations chromosomiques, nous avons recours à l'extraction des molécules actives à pouvoir antioxydant, à partir des différentes parties des plantes VC et EM, et nous avons montré leur activité antioxydante ainsi, nous avons testé leur effet sur l'inhibition du stress oxydant et des dommages oxydants causés à l'ADN induits par Tat dans les cellules B humaines isolées du sang des donneurs sains.

Pour cibler les voies induisant le stress oxydant et les DA oxydants par Tat dans les cellules B, une étude détaillée de mécanisme d'action de Tat serait nécessaire, en particulier la voie mitochondriale. Dans ce but nous pourrions utiliser les différents extraits bruts des plantes du VC et de l'EM et de leurs fractions, et une caractérisation de leurs compositions en antioxydants et la détermination de leurs types et leurs structures seraient nécessaires, pour la raison de la recherche des nouveaux antioxydants mitochondriaux, pour une meilleure compréhension de rôle pro-oxydant de Tat dans les cellules B normales et celles isolées de patients infectés par le VIH, et pour comprendre le rôle de cette protéine virale dans le développement des différents lymphomes B chez les patients séropositifs.

En effet, c'est intéressant de faire un screening pour les différents composants de VC et de l'EM, et de tester les différents effets des molécules actives présentes par un criblage moléculaire, dans le but d'identifier celles ayant des caractéristiques particulières (antioxydantes et anti-cancéreuses), et de chercher des cibles thérapeutiques qui sont impliquées dans les différentes voies induites par Tat et qui sont associées au lymphomagenèse.

D'autre part, il serait curieux de plus plonger dans la compréhension de l'effet de Tat oncogène dans l'induction des aberrations chromosomiques, de comprendre et de caractériser le lien entre cette instabilité génomique et la lymphomagenèse B chez les patients infectés par le VIH.

La compréhension de l'effet pro-oxydant et oncogène de Tat serait nécessaire pour cibler les différents trajets conduisant à une incidence élevée de certains lymphomes B chez les maladies séropositives, pour améliorer leur survie et diminuer la possibilité de mortalité et de morbidité, ce qui nous pousse à élargir notre compréhension des effets de cette petite protéine virale, pour une raison préventive et/ou thérapeutique.

# *Annexe*



L'incidence du lymphome de Burkitt chez les patients infectés par le VIH reste élevée malgré la thérapie antirétrovirale combinée. Le(s) mécanisme(s) d'action avec le(s)quel(s) le VIH est associé à ce lymphome B est (sont) inconnu(s).

Dans notre équipe, nous avons montré que la protéine Tat du VIH-1 pourrait favoriser le développement du lymphome de Burkitt chez les patients séropositifs.

Le LB est caractérisé par la translocation chromosomique entre les loci de gènes *MYC* et *IGH*. Pour que les translocations puissent avoir lieu entre les chromosomes, trois conditions doivent être accomplies : premièrement la juxtaposition entre les loci des gènes concernés, deuxièmement, les cassures double brin de l'ADN (CDB) doivent se produire dans les deux loci impliqués et troisièmement, ces CDB seraient suivies par des mécanismes de réparation des dommages de l'ADN.

Il est crucial que dans le noyau des cellules B humaines normales, les loci des gènes *IGH* et *MYC* sont éloignés les uns des autres (*MYC* sur le chromosome 8 péri-nucléaire et *IGH* sur le chromosome 14 central), étant séparés d'environ 40 % du diamètre nucléaire (Sklyar et al., 2016). En conséquence, leur recombinaison accidentelle est hautement improbable et, elle ne se produit que très rarement.

Nous avons montré que Tat seule possède la même capacité que le VIH à induire la colocalisation de locus du gène *MYC* porté sur le chromosome 8 vers le chromosome 14 portant le locus du gène *IGH*. La colocalisation a été examinée en utilisant l'hybridation à fluorescence *in-situ* en 3D (3D-FISH) dans les cellules B humaines isolées du sang des donneurs sains et traitées par la protéine Tat du VIH-1. En effet, Tat grâce à sa fonction transcriptionnelle, a activé d'une manière précoce, la transcription du gène *RAG1* « Recombination activating gene 1 » codant pour la nucléase impliquée dans l'activation de la maturation des cellules B par la recombinaison de l'immunoglobuline V-D-J. Ce qui a créé des dommages de l'ADN, au niveau de locus du gène *MYC* qui s'est ensuite colocalisé vers le centre du noyau à la proximité de locus du gène *IGH* (10 fois plus exprimée que dans les cellules B témoins).

Les CDB induites ont activées les voies de réparation JENH qui sont des voies de réparation infidèles causant des réparations erronées, favorisant la probabilité de la translocation spécifique t (8; 14) caractéristique du lymphome de Burkitt.

J'ai participé dans ce travail surtout les expériences de la détection de la colocalisation par la technique de FISH et les dommages à l'ADN.

En plus, nous avons essayé de chercher l'implication du stress oxydant induit par Tat sur la colocalisation entre *MYC* et *IGH*, dans ce but nous avons étudié la colocalisation induite par Tat en

présence du Tempol et les différents extraits des plantes préparés, mais aucune inhibition de la colocalisation a été détectée suite à l'inhibition du stress oxydant induit par Tat. D'où la conclusion que la protéine Tat du VIH-1 possède une activité oncogénique pourrait être le responsable avec différents mécanismes d'action, dans le développement des différents lymphomes B chez les patients infectés par le VIH (le Lymphome de Burkitt, les lymphomes non-Hodgkiniens et les lymphomes Hodgkiniens).

## ORIGINAL ARTICLE

HIV Tat induces a prolonged *MYC* relocalization next to *IGH* in circulating B-cells

D Germini<sup>1,2,3,10</sup>, T Tsfasman<sup>1,2,4,10</sup>, M Klibi<sup>1,2</sup>, R El-Amine<sup>1,2</sup>, A Pichugin<sup>1,2,3</sup>, OV Iarovaia<sup>1,2,5</sup>, C Bihou-Nabera<sup>1,2</sup>, F Subra<sup>6</sup>, Y Bou Saada<sup>1,2</sup>, A Sukhanova<sup>1,2</sup>, D Boutboul<sup>7,8</sup>, M Raphaël<sup>1,2</sup>, J Wiels<sup>1,2</sup>, SV Razin<sup>2,5,9</sup>, S Bury-Moné<sup>6</sup>, E Oksenhendler<sup>7,8</sup>, M Lipinski<sup>1,2</sup> and YS Vassetzky<sup>1,2,9</sup>

With combined antiretroviral therapy (cART), the risk for HIV-infected individuals to develop a non-Hodgkin lymphoma is diminished. However, the incidence of Burkitt lymphoma (BL) remains strikingly elevated. Most BL present a t(8;14) chromosomal translocation which must take place at a time of spatial proximity between the translocation partners. The two partner genes, *MYC* and *IGH*, were found colocalized only very rarely in the nuclei of normal peripheral blood B-cells examined using 3D-FISH while circulating B-cells from HIV-infected individuals whose exhibited consistently elevated levels of *MYC-IGH* colocalization. *In vitro*, incubating normal B-cells from healthy donors with a transcriptionally active form of the HIV-encoded Tat protein rapidly activated transcription of the nuclease-encoding *RAG1* gene. This created DNA damage, including in the *MYC* gene locus which then moved towards the center of the nucleus where it sustainably colocalized with *IGH* up to 10-fold more frequently than in controls. *In vivo*, this could be sufficient to account for the elevated risk of BL-specific chromosomal translocations which would occur following DNA double strand breaks triggered by AID in secondary lymph nodes at the final stage of immunoglobulin gene maturation. New therapeutic attitudes can be envisioned to prevent BL in this high risk group.

*Leukemia* advance online publication, 25 April 2017; doi:10.1038/leu.2017.106

## INTRODUCTION

The quality of life of individuals infected with the human immunodeficiency virus (HIV) has changed dramatically with the advent of combined antiretroviral therapy (cART). Indeed, their health condition has started to improve due to the suppression of virus replication as indicated by the absence of plasma HIV viremia, and to the immune reconstitution attested by normalization of circulating CD4+ T lymphocyte counts. Although the incidence of most lymphomas has decreased in a significant way in the HIV-infected population on cART, a puzzling exception lies in the incidence of Burkitt lymphoma (BL) which appears to remain 30–50 times higher in HIV-infected individuals than in controls,<sup>1</sup> suggesting that the frequency of this particular non-Hodgkin lymphoma among HIV carriers is not due to immune deficiency. Despite the fact that HIV does not infect B lymphocytes, various B-cell dysfunctions have been noted in HIV-infected patients (reviewed in refs. 2–4). Among the virally encoded proteins, Tat, Nef and gp120 have been suspected as possible culprits but it is mainly Tat which, due to its characteristics, has been investigated for its possible role in lymphomagenesis. Tat, a small (~12 kDa) hydrophobic protein produced by HIV-infected cells, can freely cross membranes and penetrate cells even when they are resistant to HIV infection (reviewed in ref. 5). Tat has been mainly considered for its transactivating function: it is absolutely required for

transcription of the viral genome, but it also modulates the expression of a number of cellular genes.<sup>6,7</sup> Importantly, mice transgenic for Tat have been reported to develop B-cell lymphomas.<sup>8</sup> In patients on cART, seric amounts of the Tat protein can still be measured.<sup>9</sup>

BL is a B-cell lymphoma characterized by its constant association with one among three possible reciprocal chromosomal translocations which all result in the *MYC* oncogene, normally on chromosome 8, being juxtaposed with one of the three immunoglobulin (Ig) gene loci: either the chromosome 14 heavy chain *IGH* gene locus<sup>10</sup> or, more rarely, one of the loci encoding the  $\kappa$  and  $\lambda$  light chains on chromosomes 2 and 22, respectively. For translocations to be generated between different chromosomes, two conditions must be met. First, a double strand break (DSB) must occur in the two gene loci involved and second, in the nuclear space, they must lie in sufficient proximity to each other to be erroneously rejoined during DSB repair.<sup>11–13</sup> Thus, it is crucial that in the nucleus of normal human B-cells, the *IGH* and *MYC* gene loci lie distant from each other, being separated by ~40% of the nuclear diameter.<sup>14</sup> As a consequence, their accidental recombination is highly unlikely and indeed, it occurs only very rarely.

Here, we have found that the HIV-1 Tat protein induces a nuclear repositioning of *MYC* next to *IGH* in B-cells from healthy donors. Seldom observed in healthy subjects, such a *MYC-IGH* colocalization was frequent in circulating B-cells isolated from HIV-1-infected individuals. This could be sufficient to account for

<sup>1</sup>UMR 8126, Université Paris-Sud Paris-Saclay, CNRS, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; <sup>2</sup>LIA 1066, French-Russian Joint Cancer Research Laboratory, Villejuif, France;

<sup>3</sup>Department of Biophysics, Institute of Physics, Nanotechnology, and Telecommunications, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia;

<sup>4</sup>Mechnikov Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia; <sup>5</sup>Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; <sup>6</sup>UMR8113, ENS de Cachan,

Université Paris-Saclay, CNRS Cachan, France; <sup>7</sup>Department of Clinical Immunology, Hôpital Saint-Louis, Paris, France; <sup>8</sup>EA3518, Université Paris Diderot, Paris, France and

<sup>9</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia. Correspondence: Dr M Lipinski or Dr Y Vassetzky, UMR 8126, Université Paris-Sud Paris-Saclay, CNRS - Institut de Cancér,

Institut Gustave Roussy, 39, rue Camille-Desmoulins, Villejuif 94805, France.

E-mail: lipinski@igr.fr or vassetzky@igr.fr

<sup>10</sup>These two authors contributed equally to this work.

Received 23 November 2016; revised 17 March 2017; accepted 21 March 2017; accepted article preview online 31 March 2017

the elevated incidence of BL observed in the HIV-infected population.

**MATERIALS AND METHODS**

**HIV patients and controls**

Whole blood samples were obtained from 13 HIV-positive individuals followed in the Department of Clinical Immunology, Hôpital Saint-Louis, Paris, France. Eleven were under antiretroviral treatment and three were reanalyzed after 4–6 months of treatment. Their clinicopathological characteristics are summarized in Table 1. Whole blood samples from a total of 20 healthy donors of different sex and age were obtained from the ‘Etablissement Français du Sang’, Hôpital Saint-Louis, Paris, France. In agreement with French law, the study was registered as a non-interventional study at the Agence Nationale de Sécurité du Médicament (2016-A01316-45) and informed consent was obtained from all subjects.

**Cells**

B-cells were isolated from blood of healthy or HIV-infected individuals by negative selection from total PBMCs and purity was assessed by fluorescence-activated cell sorting analysis. Macrophages were prepared from Pancoll-isolated PBMCs from blood of healthy donor.

**Virus production**

The HIV-1-virus was produced from 293T cells as previously described.<sup>15</sup>

**Determination of seric Tat concentration**

Tat concentrations in sera from HIV-infected individuals were determined using both a dot blot assay and an enzyme-linked immunosorbent assay.

**Tat immunodepletion**

Tat was immunodepleted from the HIV-containing supernatant using a goat anti-Tat-HIV-1 polyclonal antibody (sc-17439, Santa Cruz Biotech) and Dynabeads Protein G (Life Technologies, Thermo Scientific) according to the manufacturers’ protocol.

**B-cell incubation**

B-cells plated at 10<sup>6</sup> per ml were treated with purified Tat protein alone (obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent program, USA) or in the presence of MRE11 inhibitor mirin (Calbiochem) or the RAG inhibitor raltegravir (Merck Millipore, USA). A HIV-1 virus-containing supernatant to a final Tat concentration of approximately 14 ng/ml, a recombinant Tat protein (Tat C22)<sup>16,17</sup> or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) were also used for B-cells treatment.

**3D-FISH, immunofluorescence and microscope image acquisition and analysis**

Purified B-cells were processed for immunofluorescence or for 3D-FISH as previously described.<sup>18</sup> Images were acquired using a TCS SP8 confocal microscope (Leica Microsystems, Berlin, Germany). The used probes, antibodies and software for image analysis are listed in Supplementary Information.

**DNA damage assay**

The single-cell electrophoresis assay for DNA damage (DD), or ‘Comet assay’, and the analysis of DD were performed as described.<sup>19</sup>

**Quantitative reverse transcription PCR**

RNA isolation, complementary DNA synthesis and quantitative PCR were performed following manufacturers’ protocol.

**RSS detection**

The presence of cryptic recombination signal sequences (RSS) was searched for in the sequence of the probe for the 8q24 MYC gene locus through data mining in the RSS database at <http://www.itb.cnr.it/rss/index.html>.<sup>20</sup>

**Statistical analyses**

Comparisons between more than two averages were performed using the Bonferroni’s post-test based on the results generated using the one-way analysis of variance test. The Student’s t-test (two-tail distribution) was used to compare means between only two samples. The Mann–Whitney test was used for median comparisons. All tests were performed using the Graphpad Prism 5 software (Graphpad software Inc., La Jolla, CA, USA).

See Supplementary Information for a full description of Materials and Methods.

**RESULTS**

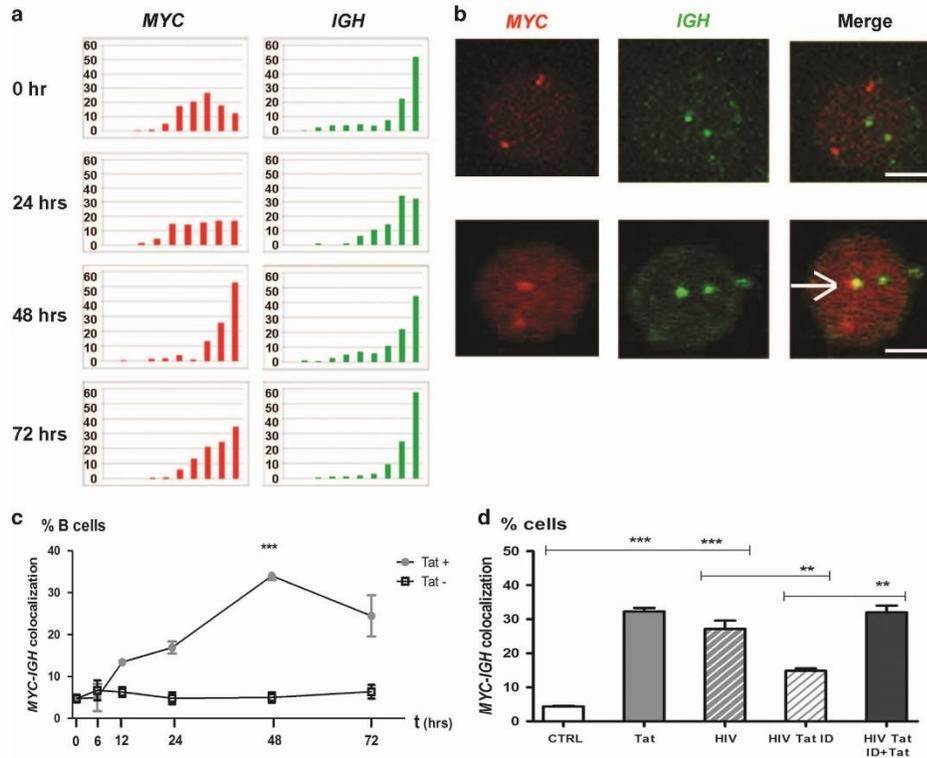
**HIV-1 Tat induces MYC-IGH proximity in B-cells**

Physical proximity in the nuclear space is a prerequisite for translocations between heterologous chromosomes.<sup>13</sup> For fine localization of the genes in the 3-dimensional nuclear space, we used 3D-FISH, attributing each detected fluorescent signal to one among 10 concentric nuclear fractions of equal volume. Before exposure to Tat, MYC genes were found farther away from the center of the nuclei than IGH loci most of which concentrated in the two centermost fractions (Figure 1a). During incubation with a recombinant Tat protein, MYC genes also accumulated in those centermost fractions with a maximal effect at 48 h and slow

**Table 1.** Main physiopathological features of the 13 individuals infected with HIV and investigated in this study

Patients #, Sex (age, years)	Test #	Effective ART duration (Months)	Plasma HIV RNA (Log <sub>10</sub> copies/ml)	CD4+ T cells (×10 <sup>6</sup> /l)	MYC-IGH colocalization (% B-cell nuclei)	Seric Tat concentration (ng/ml)
1, M (69)	1	0	6.37	20	5.0	0.34
2, M (49)	1	19	< 1.3	683	9.0	0.67
3, F (48)	1	54	< 1.3	428	3.9	0.40
	2	59	< 1.3	535	17.0	1.55
4, M (47)	1	25	< 1.3	417	20.0	2.91
5, F (51)	1	102	< 1.3	556	33.8	0.21
	2	106	< 1.3	590	21.4	0.38
6, M (59)	1	66	< 1.3	747	7.4	1.14
	2	72	< 1.3	525	52.6	2.27
7, F (56)	1	100	< 1.3	502	31.7	2.83
8, M (33)	1	11	< 1.3	619	23.1	4.06
9, F (62)	1	73	< 1.3	536	12.8	9.02
10, M (52)	1	228	< 1.3	494	36.8	0.27
11, M (66)	1	98	1.78	527	28.9	1.70
12, M (48)	1	0	4.83	247	35.0	5.72
13, M (64)	1	203	< 1.3	737	22.8	0.78

Abbreviation: ART, antiretroviral therapy. Main physiopathological features in the 13 individuals infected with HIV and investigated in this study.



**Figure 1.** HIV-1 Tat induces *MYC* nuclear relocalization and colocalization with *IGH* in normal B-cells from healthy individuals. **(a)** Radial distribution of *MYC* and *IGH* gene loci in nuclei from normal B-cells at indicated time points during incubation with purified HIV-1 Tat protein. *X* axis, distribution of fluorescent foci in 10 fractions of equal volume from the periphery (left) to the center (right) of the nucleus; *Y* axis, percentage of fluorescent foci in corresponding fraction. Percentages were calculated on 340–360 foci precisely localized in two independent experiments with samples from two different donors. **(b)** Representative 3D-FISH images showing non colocalized (top panels) and colocalized (bottom panels) *MYC* (red) and *IGH* (green) gene loci in nuclei from normal B-cells incubated for 48 h in the presence of purified HIV-1 Tat protein. The arrow in the lower merge panel points to colocalized *MYC-IGH* alleles. Scale bar, 5  $\mu$ m. **(c)** Kinetic analysis of *MYC-IGH* colocalization rates in nuclei from normal B-cells incubated with (grey dots) or without (black dots) purified Tat for indicated durations. Results (mean  $\pm$  s.e.m.) are from the same two experiments as in **a**. **(d)** Percentages of colocalized *MYC-IGH* loci in nuclei from variously treated normal B-cells. Tests were performed after 48 h of incubation with: Tat, purified Tat protein; HIV, HIV-1-containing supernatant; HIV Tat ID, HIV-1-containing supernatant immunodepleted twice for Tat; HIV Tat ID+Tat, HIV Tat ID supplemented with 15 ng/ml purified Tat protein; CTRL, control medium. A minimum of 280 3D-FISH signals were analyzed in two separate experiments performed with samples from two different donors. Data are shown as mean  $\pm$  s.e.m. \*\*\* $P$  < 0.001; \*\* $P$  < 0.01.

centrifugal redistribution afterwards (Figure 1a). This displacement brought *MYC* close to *IGH* in numerous cells. Colocalization as defined when the centers of the *MYC* and *IGH* fluorescent foci were 1  $\mu$ m or less from each other (Figure 1b) peaked at 48 h ( $34.0 \pm 1.0\%$  B-cells vs  $5 \pm 1.3\%$  in controls at the same time point,  $P < 0.001$ ) and remained high ( $24.5 \pm 4.9\%$ ) at 72 h (Figure 1c). Later observations were not possible due to the fragility of B-cells which had to be kept in a mitogen-free medium to preclude cell activation. That no cell activation occurred was controlled by flow cytometry for cell cycle analysis and expression of CD23, CD69 and CD80 activation markers (data not shown). To further analyze the role of Tat, we then measured *MYC-IGH* colocalization rates in normal B-cells incubated for 48 h in HIV-1-containing supernatants submitted to various pre-treatments. A double immunodepletion for Tat decreased the colocalization rate from  $27.2 \pm 2.5\%$  to  $14.8 \pm 0.7\%$  ( $P < 0.01$ , Figure 1d). Reconstituting the immunodepleted supernatant with 15 ng/ml of purified Tat was sufficient to restore a high colocalization rate ( $32.0 \pm 2.0\%$ ,  $P < 0.01$ , Figure 1d). Neither the  $\beta$ -globin gene locus nor the

*CCND1* gene which is rearranged with *IGH* in mantle cell lymphoma were found to colocalize with *IGH* above background levels (Supplementary Figure 1). Similarly, Tat did not produce any increase in *MYC-IGH* colocalization in macrophages, a major HIV reservoir (Supplementary Figure 2). We thus conclude that the Tat-induced *MYC-IGH* colocalization occurred with both gene- and B-cell specificity.

#### The *MYC-IGH* colocalization induced by Tat in normal B-cells depends on *RAG1* activation

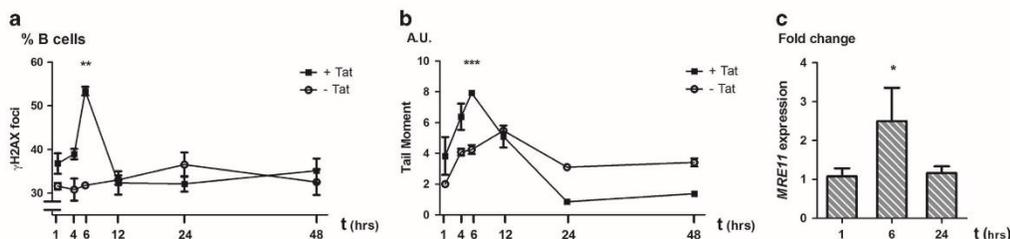
Chromosomal movements have been reported in association with DNA DSBs and repair processes (reviewed in refs 21,22). When incubated with Tat, peripheral blood B-cells accumulated DSBs revealed by the presence of  $\gamma$ H2AX foci (detected in  $53.4 \pm 1.0\%$  of the cells at 6 h vs  $31.8 \pm 0.4\%$  in the absence of Tat,  $P < 0.01$ , Figure 2a and Supplementary Figure 3a, b) and of the repair protein 53BP1 (Supplementary Figure 4). The DD induced by Tat was also investigated in a Comet assay. Again, DD increased in the presence of Tat, and this was particularly significant after 6 h of

incubation ( $P < 0.001$ , Figure 2b). Consistent with the kinetics of DD observed, the *MRE11* gene which encodes one of the three components in the DNA repair MRN complex<sup>23</sup> was transcriptionally activated up to 2.5-fold at 6 h of Tat incubation (Figure 2c). The MRE11 protein is recruited during the early steps of the DD repair process which in the case of resting peripheral blood B-cells relies primarily on non-homologous end joining (NHEJ). Interestingly, in the presence of mirin, a specific inhibitor of the MRE11 3'-to-5' exonuclease activity,<sup>24</sup> the *MYC-IGH* colocalization strongly decreased (Supplementary Figure 5), suggesting that in Tat-treated B-cells, *MYC* moves specifically towards *IGH* only once the initial DD has been or has started to be repaired.

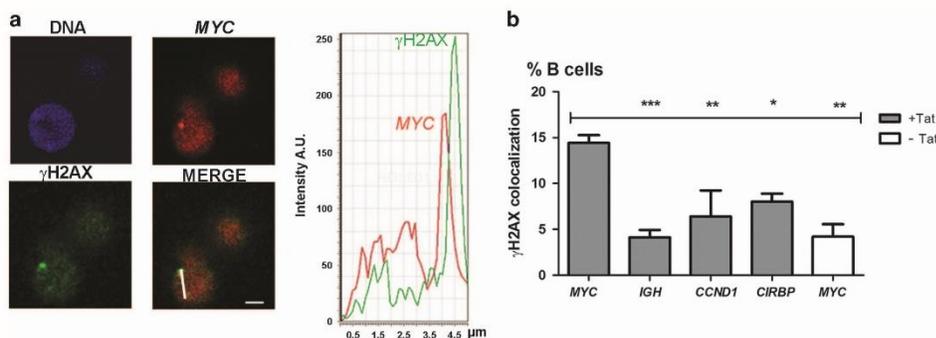
We then looked at the position of the  $\gamma$ H2AX foci in relation with the *MYC* gene loci. As seen on a representative immuno-3D FISH image (Figure 3a),  $\gamma$ H2AX foci were observed proximal to *MYC* in  $14.4 \pm 0.1\%$  of B-cells incubated with Tat vs  $4.1 \pm 0.8\%$  only in the absence of Tat ( $P < 0.01$ , Figure 3b). Such colocalization of  $\gamma$ H2AX foci were much less frequent with *IGH* ( $4.2 \pm 1.8\%$ ) or with *CCND1* and *CIRBP*, two irrelevant genes used as controls ( $6.4 \pm 2.8$  and  $8.5 \pm 1.3\%$ , respectively; Figure 3b). Similarly, the percentage of B-cells with colocalized *MYC* and the repair 53BP1 protein was significantly increased in Tat-incubated B-cells as compared with

non-treated control cells (Supplementary Figure 6). Together, the specific presence of DD markers in immediate proximity with the *MYC* gene locus indicates that in the presence of Tat, *MYC* exhibits a particular sensitivity to DD which is not found in various other genes. Tat is known to regulate gene transcription in human cells.<sup>7</sup> To explore whether the DD triggered by Tat depended on its transactivation property, we used C22Tat, a mutant protein deprived of transactivation capacity because of a 22Cys $\rightarrow$ Gly substitution.<sup>16,17,25</sup> In B-cells incubated in the presence of C22Tat, the DD generated was no greater than in the total absence of wild-type Tat ( $P < 0.001$ , Figure 4a), indicating that the damaging effect of Tat required its transcriptional activation property. Consistent with this observation, the *MYC-IGH* colocalization induced by wild-type Tat was totally abrogated when the B-cells were incubated in the presence of the C22Tat mutant ( $P < 0.001$  at 48 h, Figure 4b). Collectively, these observations demonstrated that the sensitivity of *MYC* to DD results directly or indirectly from the transcriptional activity of Tat.

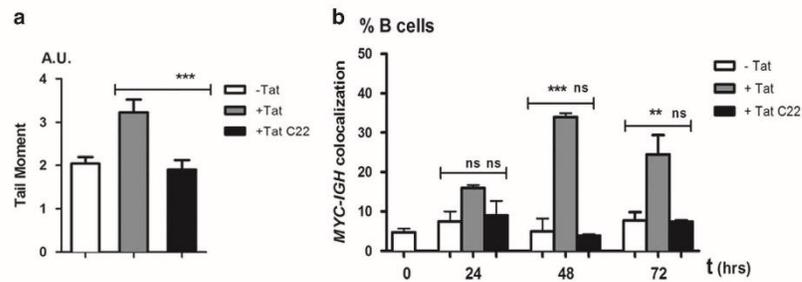
B-cells produce an extensive repertoire of antibodies whose specificity and diversity depend upon the activity of enzymes that physiologically create transient DSBs in immunoglobulin genes.<sup>26</sup> At the early stage of B-cell development which takes place in



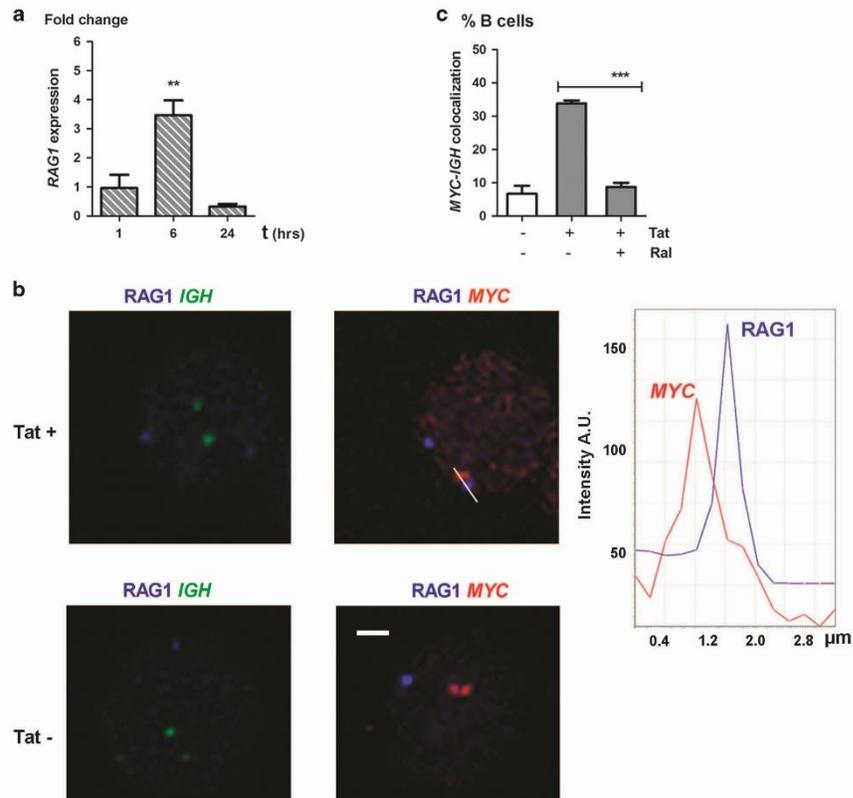
**Figure 2.** HIV Tat induces DD and DNA repair activation in B-cells. **(a)** Kinetic analysis of  $\gamma$ H2AX immunofluorescence foci in nuclei from normal B-cells incubated in the presence or absence of purified Tat protein. The average percentages of cells exhibiting  $\gamma$ H2AX foci were calculated from a minimum of 300 cells examined. Kinetic data are mean  $\pm$  s.e.m. from at least three fields with stained B-cells from a single donor at every time point except at 6 h, when experiments were repeated with reproducible results on B-cells from three different healthy donors. **(b)** Representative kinetic analysis of Tat-induced DD evaluated in a Comet Assay. Nuclei from normal B-cells were incubated for indicated time points in the presence or absence of purified Tat protein. The experiment was performed three times with similar results with B-cells from three different healthy donors. At least 100 comets (each from one nucleus) were considered in each experiment. Y axis, tail moments in arbitrary units (AU) calculated as detailed in the 'Materials and methods' section. **(c)** Kinetic analysis of *MRE11* transcription during incubation in the presence of purified Tat protein. The transcription of the *MRE11* gene was measured by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) on B-cells isolated from three different donors and incubated for the times indicated in the presence of purified Tat. Fold change expressions are in comparison with controls and after normalization vs *GAPDH*. Data are mean  $\pm$  s.e.m. \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ .



**Figure 3.** Tat-induced DD is preferentially localized on the *MYC* locus. **(a)** Representative example of a B-cell stained by immuno-3D FISH for DNA (blue), *MYC* (red) and  $\gamma$ H2AX foci (green) after 6 h of incubation in the presence of purified Tat (left panels). Scale bar = 5  $\mu$ m. The right panel illustrates *MYC* and  $\gamma$ H2AX immediate proximity (X axis) along the white bar drawn in the MERGE picture on the left, with respective peak intensities (Y axis). **(b)** Tat-induced  $\gamma$ H2AX colocalization with *MYC*. Percentages of B-cell nuclei exhibiting  $\gamma$ H2AX foci in immediate proximity with various genes after 6 h of incubation in the presence or absence of purified Tat protein. Data (mean  $\pm$  s.e.m.) for  $\gamma$ H2AX-*MYC* were calculated from a minimum of 140 *MYC* loci examined on samples from two different donors. \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ .



**Figure 4.** Tat transcriptional activity is crucial to induce DD and *MYC-IGH* colocalization. (a) The DD induced in B-cells depend on the integrity of the Tat transcriptional domain. Cells incubated for 6 h in the presence of wild-type Tat or its mutant version deprived of transcriptional activity (Tat C22) were used in a Comet assay. The results were obtained on B-cells from one donor with at least 100 nuclei considered for each condition. Similar results were obtained on B-cells from a second donor (data not shown). (b) Kinetic analysis of *MYC-IGH* colocalization in B-cells either untreated (white) or incubated for indicated times in the presence of wild type (grey) or mutated (black) versions of purified Tat. Each histogram represents a minimum of 300 3D-FISH signals examined. Data are shown as mean  $\pm$  s.e.m. \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.001$ ; NS, not statistically significant ( $P > 0.05$ ).



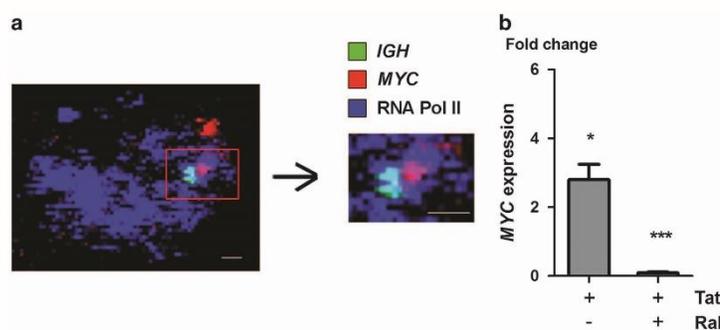
**Figure 5.** MYC relocation next to IGH depends on RAG1 activity. (a) Kinetic analysis of *RAG1* transcription in B-cells incubated in the presence of purified Tat protein. *RAG1* transcriptional levels were measured by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) at indicated times of Tat incubation. Data are mean  $\pm$  s.e.m. from three different donors and expressed as fold change in comparison with untreated controls and normalized vs *GAPDH*. (b) Representative image of a B-cell stained by immuno-3D FISH for *MYC* (red), *IGH* (green) and *RAG1* (blue) after 6 h of incubation in the presence (Tat+) or absence (Tat-) of Tat. Scale bar = 2  $\mu$ m. The *RAG1-IGH* and *RAG1-MYC* images are from different optical sections of the same cells in both conditions. The right panel illustrates *MYC* and *RAG1* immediate proximity (X axis) along the white bar drawn in the Tat+ *RAG1-MYC* left panel with respective peak intensities (Y axis). (c) The Tat-induced *MYC-IGH* colocalization is abrogated in the presence of raltegravir. *MYC-IGH* colocalization was measured in nuclei from normal B-cells isolated from two different donors and incubated for 48 h in the presence of purified Tat with or without raltegravir (Ral). Each histogram represents a minimum of 300 3D-FISH signals examined. Data are mean  $\pm$  s.e.m. \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ .

bone-marrow, the activated RAG1/2 complex targets RSS to initiate the process leading to V(D)J rearrangement within *IGH*.<sup>27</sup> There are numerous cryptic RSS sequences present throughout the genome that can be bound by RAG1,<sup>28</sup> the primary binding and catalytic subunit in the RAG complex, and this includes strong RSS in the *MYC* region (Supplementary Table 1). We thus tested whether Tat would activate transcription of *RAG1* in normal B-cells. Indeed, the transcription of the *RAG1* gene increased with an expression 3.5-fold higher at 6 h as compared to controls ( $P < 0.01$ , Figure 5a).

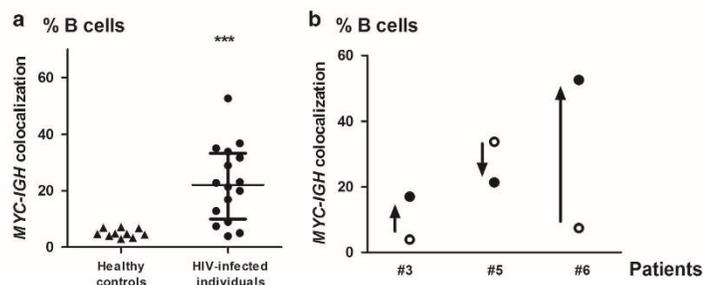
In this Tat-perturbed B-cell landscape where the expression of the *RAG1* gene and the level of DD in the *MYC* gene locus were abnormally high, the RAG1 protein was found to also colocalize with the *MYC* locus as seen on the representative images (Figure 5b), and this occurred at a significantly higher frequency in Tat-treated B-cells than in controls ( $12.5 \pm 2.8\%$  vs  $4.1 \pm 1.9\%$  at 6 h,  $P < 0.05$ , Supplementary Table 2). Interestingly, the RAG1 protein was never found colocalized with the *IGH* gene locus, consistent with the more central localization of the latter.

For therapeutic purposes, inhibitors of the HIV-encoded integrase have been developed to prevent integration of the proviral DNA into the host genome of infected cells.<sup>29</sup> Because the RAG1/2 recombinase shares structural similarities with the viral integrase, such inhibitors can possibly prevent both activities.<sup>30</sup> If the RAG complex is responsible for the DNA DSBs seen in the *MYC*

gene locus and subsequently for its colocalizing with *IGH*, then integrase inhibitors could prevent the initial occurrence of DD in *MYC* and as a consequence the *MYC* relocation next to *IGH*. Indeed, in the presence of raltegravir, the first integrase inhibitor authorized for anti-HIV treatment,<sup>31</sup> the percentage of B-cells with *MYC-IGH* colocalization was reduced to almost background levels at 48 h of incubation in the presence of Tat ( $P < 0.001$ , Figure 5c). As anticipated, in such conditions, there was no increase of DD at the *MYC* gene locus at 6 h of incubation (data not shown). We then asked whether any DD produced in B-cells could similarly result in *MYC-IGH* colocalization. When B-cells were incubated in the presence of  $H_2O_2$  instead of Tat,  $\gamma H2AX$  foci were more numerous than in controls, as expected ( $46.6 \pm 3.9\%$  vs  $30.9 \pm 0.9\%$ , Supplementary Figure 7a), but they did not colocalize preferentially with the *MYC* gene locus (Supplementary Figure 7b) and the level of *MYC-IGH* colocalization was not elevated as compared to background (Supplementary Figure 7c). Finally, because earlier reports had suggested that *MYC* and *IGH* could share the same transcription factories,<sup>13,32</sup> we explored the positioning of the *MYC* and *IGH* gene loci in relation with transcription factories revealed by an antibody directed at activated RNA polymerase II molecules. As visible in the representative image shown in Figure 6a, both *IGH* and *MYC* gene loci were localized within one transcription factory at 48 h of Tat incubation of normal B-cells. This was consistent with the



**Figure 6.** Transcriptional activation of *MYC* relocated to a transcription factory. (a) Representative immuno-3D FISH image of *MYC* and *IGH* genes in a shared transcription factory. B-cells were stained for *MYC* (red) and *IGH* (green) gene loci and activated RNA polymerase II molecules (blue) after 48 h of incubation in the presence of purified Tat protein. Scale bars = 1  $\mu$ m. (b) The *MYC* transcriptional activation induced by Tat does not occur in the presence of raltegravir. *MYC* transcription was measured by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) after 48 h of Tat incubation of B-cells in the presence or absence of raltegravir (Ral). Data expressed as fold change in comparison with controls and normalized vs *GAPDH* are mean  $\pm$  s.e.m. from three different donors. \*\*\* $P < 0.001$ ; \* $P < 0.05$ .



**Figure 7.** *MYC-IGH* colocalization in B-cells from HIV-infected patients. (a) *MYC-IGH* colocalization rates were measured in nuclei from circulating B-cells from 10 healthy subjects (triangles) and 13 HIV-infected individuals (circles). For each test, a minimum of 160 3D-FISH signals were examined. Note that three patients have been tested twice. Bars shown only in the patients group refer to IQ values. Medians were compared using the Mann-Whitney test. \*\*\* $P < 0.001$ . (b) Variation in *MYC-IGH* colocalization rates in the three patients tested twice at a 3–6 months interval. The arrows indicate the chronology between the first (open circle) and second (black circle) evaluations. Patient numbers refer to the list in Table 1.

2.8-fold upregulation of *MYC* transcription measured at this time (Figure 6b) and this occurred unless raltegravir was additionally present in the Tat-containing incubation medium (Figure 6b).

All together, these findings strongly support the notion that in normal B-cells incubated in the presence of HIV Tat, it is the DD initially induced by RAG in the *MYC* gene and the ensuing DNA repair process which are responsible for its specific displacement towards the center of the nucleus and often in immediate vicinity of *IGH*.

The *MYC-IGH* colocalization rate is strikingly elevated in circulating B-cells from HIV-infected individuals

To find out whether our *in vitro* findings could be relevant to clinical conditions, we then turned to circulating B-cells isolated from HIV-1-carrying individuals whose clinicopathological characteristics are summarized in Table 1. In a group of 10 healthy subjects tested as controls, a *MYC-IGH* colocalization was observed in 4.9% of B-cell nuclei on average and with very little variability between individuals (Figure 7a). This strikingly contrasted with the HIV-infected group where 10 out of 13 patients exhibited colocalization percentages ranging from 9.0 to 36.8% (Figure 7a and Table 1). The median (IQ range = 23.4) colocalization rate was 22.1% in patients vs 4.7% in controls ( $P < 0.001$ , Figure 7a). In the patients group, three individuals were tested again 3–6 months after first evaluation (Figure 7b). Two patients (#3 and #6) whose initial *MYC-IGH* colocalization percentage was low then displayed elevated rates of colocalization (17.0% and 52.6% vs 3.9% and 7.4%, respectively, Figure 7b and Table 1). In the third patient (#5), the colocalization rate decreased but remained high (21.4 vs 33.8%, Figure 7b and Table 1). We found no relationship between percentages of *MYC-IGH* colocalization and seric levels of Tat which, consistently with previous reports,<sup>32,33</sup> ranged from 0.27 to 9.0 ng/ml (Table 1). Although low, similar concentrations of Tat proved sufficient for inducing some level of *MYC* relocalization next to *IGH in vitro* (Supplementary Figure 8).

## DISCUSSION

In the last two decades, with cART now as the reference treatment for HIV-infected individuals, the risk for non-Hodgkin lymphoma has largely receded in this population. However, for reasons still to be deciphered, BL occurs with a persistently increased frequency even with undetectable viral RNA copies in patients' blood or in the absence of any overt immune deficiency (reviewed in Bibas and Antinori,<sup>34</sup>). Acquired *ex vivo* on normal B-cells from healthy subjects, the present results suggest a cascade of events which we postulate can also occur in HIV-infected patients. In summary (see Supplementary Table 3), on spontaneous penetration of normal B-cells, Tat upregulates *RAG1* transcription, resulting in DSBs created in *MYC* among various other genes, as shown previously for other oncogenes with cryptic RSS sites.<sup>26</sup> Following or during the ensuing DNA repair process, *MYC* is displaced specifically towards the center of the nucleus where it is upregulated within transcription factories shared with *IGH*, reflecting its novel accessibility to factors implicated in DNA transactions. This chain of events starting with the *RAG1*-dependent DD introduced in the *MYC* gene locus at the periphery of the nucleus and culminating with a newly acquired *MYC-IGH* proximity in the center of the nucleus leads to a situation where the two chromosomes 8 and 14 are more susceptible to concomitant breakage within *MYC* and *IGH*, respectively, and consequently, at risk of erroneous rejoining due to their non-physiological proximity.<sup>26,35</sup> Of note, in our experimental system, these events occur in the absence of any cell division.

We have found that 10 patients infected with HIV could all exhibit high levels of *MYC-IGH* colocalization in a strikingly elevated percentage of circulating B-cells, even when their biological features were normalized under cART. According to

the proposed scenario, these circulating B-cells have been exposed to Tat at some earlier time, either during blood transit or within a secondary lymph node where Tat is present at high levels in HIV-positive individuals.<sup>36</sup> Moreover, the Tat levels we observed in the sera of the analyzed patients are consistent with other previous studies<sup>9</sup> and are sufficient to induce a significant increase in *MYC/IGH* colocalization as demonstrated in this study (Supplementary Figure 8).

In the proposed model, the *RAG1* transcriptional activation triggered by Tat has created DD in *MYC* followed by its displacement towards *IGH* in the center of the nucleus. With *MYC* and *IGH* now in close proximity, the corresponding B-cells are at increased risk of t(8;14) chromosomal translocation to occur at the time of final *IGH* maturation in a germinal center where the BL-specific chromosomal translocations are known to take place as a result of the AID activity which is responsible for class switch recombination and somatic hypermutation.<sup>27</sup> As a consequence, compounds preventing Tat cellular penetration or interfering with its various properties would be of considerable experimental and clinical interest to possibly reduce the occurrence of BL in HIV-infected patients. Along the same lines, it will be interesting to follow the incidence of BL in HIV-infected individuals treated with raltegravir or other integrase inhibitors which could reduce the DD caused by the Tat-activated *RAG* activity.

The relocalization of the *MYC* gene is in no way restricted to Tat-incubated B-cells. In a previous study, we have reported that in mantle cell lymphoma, another B-cell malignancy associated with another specific translocation, a t(11;14), the *CCND1* allele is translocated from its normal position on the long arm of chromosome 11 to the *IGH*-carrying chromosomal region on 14q. As a result, *CCND1* becomes transcriptionally active due to its relocalization from its initially silent peripheral position to a more central one rich in transcription factors and active RNA polymerase II molecules.<sup>18</sup> Further studies are clearly needed to address whether nuclear reorganization and gene repositioning are similarly triggered in other cellular and clinical contexts with correspondingly increased risks of malignant transformation.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program for supplying critical reagents. This work was supported by grants from the ANRS to YV and TT; INSERM (ENVIBURKITT) to YV; the Russian Science Foundation #14-24-00022 to SR and OI and #14-15-00199 to YV.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

ML, YV conceived and designed the study. DG, TT, MK, AP and REA designed and performed 3D-FISH experiments. DG and TT acquired and analyzed microscopic images, and interpreted the data. FS and SBM conceived HIV-1 experiments and analyzed the data. REA and YBS performed DNA damage experiments. AS analyzed the gene and protein expression data. DB and EO provided patients clinical data and samples. CBN performed cytogenetic analyses. MR, OI and SR critically interpreted the data. ML, DG, TT, EO, JW and YV wrote the manuscript.

## REFERENCES

- 1 Gibson TM, Morton LM, Shiels MS, Clarke CA, Engels EA. Risk of non-Hodgkin lymphoma subtypes in HIV-infected people during the HAART era: a population-based study. *AIDS* 2014; **28**: 2313–2318.
- 2 Dolcetti R, Gloghini A, Caruso A, Carbone A. A lymphomagenic role for HIV beyond immune suppression? *Blood* 2016; **127**: 1403–1409.
- 3 Shen X, Tomaras GD. Alterations of the B-cell response by HIV-1 replication. *Curr HIV/AIDS Rep* 2011; **8**: 23–30.

- 4 Tsfasman TM, Klibi M, Pichugin AM, Lipinski M, Vassetzky YS. HIV: implication in Burkitt lymphoma. *Biopolym Cell* 2012; **28**: 285–287.
- 5 Musinova YR, Sheval EV, Dib C, Gemini D, Vassetzky YS. Functional roles of HIV-1 Tat protein in the nucleus. *Cell Mol Life Sci* 2015; **73**: 589–601.
- 6 Marban C, Su T, Ferrari R, Li B, Vatakis D, Pellegrini M *et al*. Genome-wide binding map of the HIV-1 Tat protein to the human genome. *PLoS One* 2011; **6**: e26894.
- 7 Reeder JE, Kwak Y-T, McNamara RP, Forst CV, D'Orso I. HIV Tat controls RNA Polymerase II and the epigenetic landscape to transcriptionally reprogram target immune cells. *Elife* 2015; **4**: e08955.
- 8 Kundu RK, Sangiorgi F, Wu LY, Pattengale PK, Hinton DR, Gill PS *et al*. Expression of the human immunodeficiency virus-Tat gene in lymphoid tissues of transgenic mice is associated with B-cell lymphoma. *Blood* 1999; **94**: 275–282.
- 9 Poggi A, Carosio R, Fenoglio D, Brenci S, Murdaca G, Setti M *et al*. Migration of V delta 1 and V delta 2T cells in response to CXCR3 and CXCR4 ligands in healthy donors and HIV-1-infected patients: competition by HIV-1 Tat. *Blood* 2004; **103**: 2205–2213.
- 10 Taub R, Kirsch I, Morton C, Lenoir G, Swan D, Tronick S *et al*. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 7837–7841.
- 11 Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the non-homologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* 2010; **79**: 181–211.
- 12 Nikiforova MN, Stringer JR, Blough R, Medvedovic M, Fagin JA, Nikiforov YE. Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. *Science* 2000; **290**: 138–141.
- 13 Roix JJ, McQueen PG, Munson PJ, Parada LA, Misteli T. Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nat Genet* 2003; **34**: 287–291.
- 14 Sklyar I, Iarovaia OV, Gavrilov AA, Pichugin A, Gemini D, Tsfasman T *et al*. Distinct patterns of colocalization of the CCND1 and CMYC genes with their potential translocation partner IGH at successive stages of B-cell differentiation. *J Cell Biochem* 2016; **117**: 1506–1510.
- 15 Manic G, Maurin-Marlin A, Galluzzi L, Subra F, Mouscadet J-F, Bury-Moné S. 3' self-inactivating long terminal repeat inserts for the modulation of transgene expression from lentiviral vectors. *Hum Gene Ther Methods* 2012; **23**: 84–97.
- 16 Garcia JA, Harrich D, Pearson L, Mitsuyasu R, Gaynor RB. Functional domains required for tat-induced transcriptional activation of the HIV-1 long terminal repeat. *EMBO J* 1988; **7**: 3143–3147.
- 17 Rossi C, Balboni PG, Betti M, Marconi PC, Bozzini R, Grossi MP. Inhibition of HIV-1 replication by a Tat transdominant negative mutant in human peripheral blood lymphocytes from healthy donors and HIV-1-infected patients. *Gene Ther* 1997; **4**: 1261–1269.
- 18 Allinne J, Pichugin A, Iarovaia O, Klibi M, Barat A, Zlotek-Zlotkiewicz E *et al*. Perinucleolar relocalization and nudeolin as crucial events in the transcriptional activation of key genes in mantle cell lymphoma. *Blood* 2014; **123**: 2044–2053.
- 19 Bou Saada Y, Dib C, Dmitriev P, Hamade A, Camac G, Laoudj-Chenivesse D *et al*. Facioscapulohumeral dystrophy myoblasts efficiently repair moderate levels of oxidative DNA damage. *Histochem Cell Biol* 2016; **145**: 475–483.
- 20 Merelli I, Guffanti A, Fabbri M, Cocito A, Furia L, Grazini U *et al*. RSSsite: a reference database and prediction tool for the identification of cryptic Recombination Signal Sequences in human and murine genomes. *Nucleic Acids Res* 2010; **38**: 262–267.
- 21 Dion V, Gasser SM. Chromatin movement in the maintenance of genome stability. *Cell* 2013; **152**: 1355–1364.
- 22 Iarovaia OV, Rubtsov M, Ioudinkova E, Tsfasman T, Razin SV. Dynamics of double strand breaks and chromosomal translocations. *Mol Cancer* 2014; **13**: 249–258.
- 23 Xie A, Kwok A, Scully R. Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. *Nat Struct Mol Biol* 2009; **16**: 814–818.
- 24 Dupré A, Boyer-Chatenet L, Sattler RM, Modi AP, Lee J-H, Nicolette ML *et al*. A forward chemical genetic screen reveals an inhibitor of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat Chem Biol* 2008; **4**: 119–125.
- 25 Bertrand SJ, Aksenova MV, Mactutus CF, Booze RM. HIV-1 Tat protein variants: critical role for the cysteine region in synaptodendritic injury. *Exp Neurol* 2013; **248**: 228–235.
- 26 Alt FW, Zhang Y, Meng FL, Guo C, Schwer B. Mechanisms of programmed DNA lesions and genomic instability in the immune system. *Cell* 2013; **152**: 417–429.
- 27 Maizels N. Immunoglobulin gene diversification. *Annu Rev Genet* 2005; **39**: 23–46.
- 28 Zhang M, Swanson PC. V(D)J recombinase binding and cleavage of cryptic recombination signal sequences identified from lymphoid malignancies. *J Biol Chem* 2008; **283**: 6717–6727.
- 29 Pommier Y, Johnson AA, Marchand C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nat Rev Drug Discov* 2005; **4**: 236–248.
- 30 Melek M, Jones JM, O'Dea MH, Pais G, Burke TR, Pommier Y *et al*. Effect of HIV integrase inhibitors on the RAG1/2 recombinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 134–137.
- 31 Hids C, Gulick RM. Raltegravir: the first HIV type 1 integrase inhibitor. *Clin Infect Dis* 2009; **48**: 931–939.
- 32 Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dhein J, Walczak H *et al*. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 1995; **375**: 497–500.
- 33 Gao H, Neuveut C, Tiffany HL, Benkirane M, Rich Ea, Murphy PM *et al*. Selective CXCR4 antagonism by Tat: implications for in vivo expansion of coreceptor use by HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 11466–11471.
- 34 Bibas M, Antinori A. EBV and HIV-related lymphoma. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2009; **1**: e2009032.
- 35 Lieber MR. Mechanisms of human lymphoid chromosomal translocations. *Nat Rev Cancer* 2016; **16**: 387–398.
- 36 Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH *et al*. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993; **362**: 355–358.

Supplementary Information accompanies this paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

## Publications et communications

### Communications (orales et posters)

**El Amine Rawan**, Germini Diego, Hamade Aline, Najjar Fadia, Vassetzky Yegor. « La Protéine Tat Du VIH-1 Induit Des Dommages De l'ADN Dans Les Lymphocytes B Du Sang Périphérique Humain Par La Production Des ROS Mitochondriales ». Le 27, 28 Septembre 2017, Forum de l'Ecole Doctorale des Sciences et Des Technologies-Université Libanaise-Hadath-Liban (**Poster**).

**El Amine Rawan**, Hamade Aline, Najjar Fadia, Vassetzky Yegor. « HIV-1 Tat protein induces mitochondrial ROS production, DNA damage and genomic instability in human B-cells ». Le 26, 27 Jun 2017, Conférence Internationale, 19th ISANH International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis & Antioxidants. Université Pierre et Marie Curie-Paris-France (**Présentation orale**).

Germini Diego, **El Amine Rawan**, Hamade Aline, Najjar Fadia, Vassetzky Yegor. « HIV protein Tat induces genomic instability in human peripheral blood B-lymphocytes via ROS production ». Le 21-25 Juillet 2016, 12ème Congrès international de la Biologie cellulaire-Prague-France « ICCB 2016 » (**Poster**).

**El Amine Rawan**, Hamade Aline, Najjar Fadia, Vassetzky Yegor. « HIV Tat induces DNA damage in human peripheral blood B-lymphocytes via ROS production ». Le 2-4 Mai 2016, 12ème journées scientifiques de l'école doctorale CBMS 582-Roscoff-France (**Poster**).

**El Amine Rawan**, Hamade Aline, Najjar Fadia, Lipinski Marc, Vassetzky Yegor. « Rôle des dommages à l'ADN générés par la protéine Tat-VIH dans l'oncogenèse du lymphome de Burkitt ». Le 18-20 Mai 2015, 11ème journées scientifiques de l'école doctorale-Roscoff-France (**Poster**).

**El Amine Rawan**, Hamade Aline, Najjar Fadia, Lipinski Marc, Vassetzky Yegor. « Rôle des dommages à l'ADN générés par la protéine Tat-VIH dans l'oncogenèse du lymphome de Burkitt ». Le 15-17 Avril 2015, 21ème conférence annuelle « International Science Conference » organisée conjointement par le LAAS (The Lebanese Association for the Advancement of Sciences), le CNRS (the National Council for Scientific Research) et USJ (Université Saint Joseph) à l'université Saint Joseph, Beyrouth-Liban (**Poster**).

**El Amine Rawan**, Eva Hamade, Fadia Najjar. « Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Callisia fragrance* extracts ». Le 27-29 Mars 2014, 20th conference LAAS (The Lebanese Association for the

Advancement of Sciences), CNRS (The National Council for Scientific Research), EDST (Doctoral School of Science and Technology)-Lebanese University-Campus, Hadath-Lebanon (**Poster**).

### **Publications**

1- Germini Diego, **El Amine Rawan**, Vassetzky Yegor. « HIV Tat induces a prolonged *MYC* relocalization next to IGH in circulating B-cells » (**Article** publié dans *Leukemia* 2017).

2- **El Amine Rawan**, Hamade Aline, Najjar Fadia, Vassetzky Yegor. « HIV Tat induces DNA damage in human peripheral blood B-lymphocytes via ROS production » (**Article acceptée** dans *Redox Biology*).

3- **El Amine Rawan**, Hamade Aline, Najjar Fadia, Vassetzky Yegor. « HIV, DNA damage and oxidative stress » (**Revue** en soumission).

## *Références*



- A. Meddour, M. Yahia1, N. Benkiki1, A.A. (2013). Etude de l'Activité Antioxydante et Antibactérienne des Extraits d'un Ensemble des Parties de la Fleur du Capparis spinosa L. Leban. *Sci. J.* 14, 49–60.
- AbdulSalam, S.F., Thowfeik, F.S., and Merino, E.J. (2016). Excessive reactive oxygen species and exotic DNA lesions as an exploitable liability. *Biochemistry* 55, 5341–5352.
- Abruzzo, J. (2005). The Natural History of Medicinal Plants. *Eukaryon* 1, 2005.
- Achenbach, C.J., Buchanan, A.L., Cole, S.R., Hou, L., Mugavero, M.J., Crane, H.M., Moore, R.D., Haubrich, R.H., Gopal, S., Eron, J.J., et al. (2014). HIV viremia and incidence of non-Hodgkin lymphoma in patients successfully treated with antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis.* 58, 1599–1606.
- Agarwal, A. (2011). Oxidants and Antioxidants in the Pathogenesis of HIV/AIDS. *Open Reprod. Sci. J.* 3, 154–161.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., and Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Sci.* 196, 67–76.
- Al-Dalaen, S.M. (2014). Review Article: Oxidative Stress Versus Antioxidants. *Am. J. Biosci. Bioeng.* 2, 60.
- Alexandrov, L.B., and Stratton, M.R. (2014). Mutational signatures: The patterns of somatic mutations hidden in cancer genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 24, 52–60.
- Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Aparicio, S.A.J.R., Behjati, S., Biankin, A. V., Bignell, G.R., Bolli, N., Borg, A., Børresen-Dale, A.-L., et al. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500, 415–421.
- Alizadeh, A., Elsen, M., Davis, R., Ma, C., Lossos, I., Rosenwald, A., Boldrick, J., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., et al. (2009). Distinct types of primary cutaneous large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Gene Expr.* 105, 3671–3678.
- Altavilla, G., Caputo, A., Lanfredi, M., Piola, C., Barbanti-Brodano, G., and Corallini, A. (2000). Enhancement of chemical hepatocarcinogenesis by the HIV-1 tat gene. *Am. J. Pathol.* 157, 1081–1089.
- Ambrosino, C., Ruocco, M.R., Chen, X., Mallardo, M., Baudi, F., Trematerra, S., Quinto, I., Venuta, S., and Scala, G. (1997). HIV-1 Tat induces the expression of the interleukin-6 (IL6) gene by binding to the IL6 leader RNA and by interacting with CAAT enhancer-binding protein  $\beta$  (NF-IL6) transcription factors. *J. Biol. Chem.* 272, 14883–14892.
- Ameziane-El-Hassani, R., Talbot, M., de Souza Dos Santos, M.C., Al Ghuzlan, A., Hartl, D., Bidart, J.-M., De Deken, X., Miot, F., Diallo, I., de Vathaire, F., et al. (2015). NADPH oxidase DUOX1 promotes long-term persistence of oxidative stress after an exposure to irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 5051–5056.
- Ameziane-El-Hassani, R., Schlumberger, M., and Dupuy, C. (2016). NADPH oxidases: new actors in thyroid cancer? *Nat. Rev. Endocrinol.* 12, 485–494.
- Andreyev, a Y., Kushnareva, Y.E., and Starkov, a a (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry. (Mosc).* 70, 200–214.
- Anrather, J., Racchumi, G., and Iadecola, C. (2006). NF- $\kappa$ B regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. *J. Biol. Chem.* 281, 5657–5667.
- Ansell, S.M. (2015). Non-Hodgkin Lymphoma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin. Proc.* 90, 1152–1163.
- Aquaro, S., Scopelliti, F., Pollicita, M., and Perno, C.F. (2008). Oxidative stress and HIV infection: target pathways for novel therapies? *Futur. HIV Ther.* 2, 327–338.
- Arias-Salvatierra, D., Silbergeld, E.K., Acosta-Saavedra, L.C., and Calderon-Aranda, E.S. (2011). Role of nitric oxide produced by iNOS through NF- $\kappa$ B pathway in migration of cerebellar granule neurons induced by Lipopolysaccharide. *Cell. Signal.* 23, 425–435.
- Augustyniak, A., Bartosz, G., Czapka, A., Duburs, G., Horáková, L., Łuczaj, W., Majekova, M., Odysseos, A.D., Rackova, L., Skrzydlewska, E., et al. (2010). Natural and synthetic antioxidants: An updated overview. *Free Radic. Res.* 44, 1216–1262.
- Aukrust, P., Svardal, A.M., Muller, F., Lunden, B., Berge, R.K., Ueland, P.M., and Froland, S.S. (1995). Increased levels of oxidized glutathione in CD4+ lymphocytes associated with disturbed intracellular redox balance in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Blood* 86, 258–267.
- Bachhawat, A.K., Thakur, A., Kaur, J., and Zulkifli, M. (2013). Glutathione transporters. *Biochim. Biophys. Acta*

- Gen. Subj. 1830, 3154–3164.

- Badou A, Bennasser Y, Moreau M, Leclerc C, Benkirane M, B.E. (2000). Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: implication of protein kinase C-dependent pathway. *J. Virol.* 10551–10562.
- Bakker, J., Lin, X., and Nelson, W.G. (2002). Methyl-CpG binding domain protein 2 represses transcription from hypermethylated pi-class glutathione S-transferase gene promoters in hepatocellular carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 277, 22573–22580.
- Banerjee, A., Zhang, X., Manda, K.R., Banks, W.A., and Ercal, N. (2010). HIV proteins (gp120 and Tat) and methamphetamine in oxidative stress-induced damage in the brain: Potential role of the thiol antioxidant N-acetylcysteine amide. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 1388–1398.
- Banjac, A., Perisic, T., Sato, H., Seiler, A., Bannai, S., Weiss, N., Kölle, P., Tschöep, K., Issels, R.D., Daniel, P.T., et al. (2008). The cystine/cysteine cycle: a redox cycle regulating susceptibility versus resistance to cell death. *Oncogene* 27, 1618–1628.
- Banki, K., Hutter, E., Gonchoroff, N.J., and Perl, A. (1999). Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in Fas signaling. *J. Immunol.* 162, 1466–1479.
- Baratta, M.T., Damien, H.J., Deans, S.G., Biondi, D.M., and Ruberto, G. (1998). Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *J. Essent. Oil Res.* 10, 618–627.
- Barillari, G., and Ensoli, B. (2002). Angiogenic Effects of Extracellular Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat Protein and Its Role in the Pathogenesis of AIDS-Associated Kaposi's Sarcoma. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 310–326.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868–871.
- Barré-Sinoussi, F., Ross, A.L., and Delfraissy, J.-F. (2013). Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 877–883.
- Barzilai, A., and Yamamoto, K.I. (2004). DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst).* 3, 1109–1115.
- Basak, S., and Hoffmann, A. (2008). Crosstalk via the NF-kappaB signaling system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19, 187–197.
- Battaglia, P.A., Ponti, D., Naim, V., Venanzi, S., Psaila, R., and Gigliani, F. (2005). The HIV-Tat protein induces chromosome number aberrations by affecting mitosis. *Cell Motil. Cytoskeleton* 61, 129–136.
- Bedard, K., and Krause, K.-H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313.
- Behrend, L., Henderson, G., and Zwacka, R.M. (2003). Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1441–1444.
- Beral, V., Peterman, T., Berkelman, R., and Jaffe, H. (1991). AIDS-associated non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 337, 805–809.
- van den Berg, R., Haenen, G.R., van den Berg, H., and Bast, A. (2001). Transcription factor NF-kappaB as a potential biomarker for oxidative stress. *Br. J. Nutr.* 86 Suppl 1, S121–S127.
- Bhaskar, A., Munshi, M.H., Khan, S.Z., Fatima, S., Arya, R., Jameel, S., and Singh, A. (2015). Measuring glutathione redox potential of HIV-1-infected macrophages. *J. Biol. Chem.* 290, 1020–1038.
- Blaser, H., Dostert, C., Mak, T.W., and Brenner, D. (2016). TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. *Trends Cell Biol.* 26, 249–261.
- Blazquez, M. V., Macho, A., Ortiz, C., Lucena, C., Lopez-Cabrera, M., Sanchez-Madrid, F., and Munoz, E. (1999). Extracellular HIV type 1 Tat protein induces CD69 expression through NF-kappaB activation: possible correlation with cell surface Tat-binding proteins. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15, 1209–1218.
- Blum, K.A., Lozanski, G., and Byrd, J.C. (2004). Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* 104, 3009–3020.

- Bonini, M.G., and Malik, A.B. (2014). Regulating the regulator of ROS production. *Cell Res.* 24, 908–909.
- De Bont, R., and van Larebeke, N. (2004). Endogenous DNA damage in humans: A review of quantitative data. *Mutagenesis* 19, 169–185.
- Bosch, F.X., Manos, M.M., Muñoz, N., Sherman, M., Jansen, A.M., Peto, J., Schiffman, M.H., Moreno, V., Kurman, R., Shah, K. V, et al. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J. Natl. Cancer Inst.* 87, 796–802.
- Bouayed, J., and Bohn, T. (2010). Exogenous Antioxidants—Double-Edged Swords in Cellular Redox State: Health Beneficial Effects at Physiologic Doses versus Deleterious Effects at High Doses. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 3, 228–237.
- Boveri, T. (2008). Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *J. Cell Sci.* 121 *Suppl.*, 1–84.
- Bower, M., Fisher, M., Hill, T., Reeves, I., Walsh, J., Orkin, C., Phillips, A.N., Bansi, L., Gilson, R., Easterbrook, P., et al. (2009a). CD4 counts and the risk of systemic non-Hodgkin’s lymphoma in individuals with HIV in the UK. *Haematologica* 94, 875–880.
- Bower, M., Fisher, M., Hill, T., Reeves, I., Walsh, J., Orkin, C., Phillips, A.N., Bansi, L., Gilson, R., Easterbrook, P., et al. (2009b). CD4 counts and the risk of systemic non-Hodgkin’s lymphoma in individuals with HIV in the UK. *Haematologica* 94, 875–880.
- Brady, G., Macarthur, G.J., and Farrell, P.J. (2008). Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *Postgrad. Med. J.* 84, 372–377.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 28, 25–30.
- Brian, C., Clarke, B., Blackadar, B., Blackadar, C.B., and Researcher, V. (2016). Historical review of the causes of cancer. *World J Clin Oncol* World J Clin Oncol Febr. 7, 54–86.
- Brookes, P., and Lawley, P.D. (1960). The reaction of mustard gas with nucleic acids in vitro and in vivo. *Biochem. J.* 77, 478–484.
- Buccigrossi, V., Laudiero, G., Nicastro, E., Miele, E., Esposito, F., and Guarino, A. (2011). The HIV-1 Transactivator Factor (Tat) Induces Enterocyte Apoptosis through a Redox-Mediated Mechanism. *PLoS One* 6, e29436.
- Buhl, R., Holroyd, K., Mastrangeli, A., Cantin, A., Jaffe, H.A., Wells, F., Saltini, C., and Crystal, R. (1989). SYSTEMIC GLUTATHIONE DEFICIENCY IN SYMPTOM-FREE HIV-SEROPOSITIVE INDIVIDUALS. *Lancet* 334, 1294–1298.
- Burkitt, D. (1958). A sarcoma involving the jaws in african children. *Br. J. Surg.* 46, 218–223.
- Byun, M.-S., Jeon, K.-I., Choi, J.-W., Shim, J.-Y., and Jue, D.-M. (2002). Dual effect of oxidative stress on NF- $\kappa$ B activation in HeLa cells. *Exp. Mol. Med.* 34, 332–339.
- Cadenas, E., and Davies, K.J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 222–230.
- Cadet, J., and Davies, K.J.A. (2017). Oxidative DNA damage & repair: An introduction. *Free Radic. Biol. Med.* 106, 100–110.
- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., Gromova, M., Pouget, J.P., Ravanat, J.L., Romieu, A., and Sauvaigo, S. (1999). Radiation-induced damage to DNA: mechanistic aspects and measurement of base lesions. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* 151, 1–7.
- Campbell, G.R., Loret, E.P., and Spector, S.A. (2010). HIV-1 clade B tat, but not clade C tat, increases X4 HIV-1 entry into resting but not activated CD4+ T cells. *J. Biol. Chem.* 285, 1681–1691.
- Capone, C., Cervelli, M., Angelucci, E., Colasanti, M., MacOne, A., Mariottini, P., and Persichini, T. (2013). A role for spermine oxidase as a mediator of reactive oxygen species production in HIV-Tat-induced neuronal toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 63, 99–107.
- Carré, A., Louzada, R.A.N., Fortunato, R.S., Ameziane-El-Hassani, R., Morand, S., Ogryzko, V., de Carvalho, D.P., Grasberger, H., Leto, T.L., and Dupuy, C. (2015). When an Intramolecular Disulfide Bridge Governs the

- Interaction of DUOX2 with Its Partner DUOXA2. *Antioxid. Redox Signal.* 23, 724–733.
- Chae, Y.K., Anker, J.F., Carneiro, B.A., Chandra, S., Kaplan, J., Kalyan, A., Santa-Maria, C.A., Plataniias, L.C., Giles, F.J., Chae, Y.K., et al. (2016). Genomic landscape of DNA repair genes in cancer. *Oncotarget* 7, 23312–23321.
- Chance, B., Sies, H., and Boveris, a (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59, 527–605.
- Chang, Y., Moore, P.S., and Weiss, R.A. (2017). Human oncogenic viruses: nature and discovery. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 372, 20160264.
- Chao, C., Xu, L., Abrams, D., Leyden, W., Horberg, M., Towner, W., Klein, D., Tang, B., and Silverberg, M. (2010). Survival of non-Hodgkin lymphoma patients with and without HIV infection in the era of combined antiretroviral therapy. *AIDS* 24, 1765–1770.
- Chen, W.Y., Chang, F.R., Huang, Z.Y., Chen, J.H., Wu, Y.C., and Wu, C.C. (2008). Tubocapsenolide A, a novel withanolide, inhibits proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-231 cells by thiol oxidation of heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 283, 17184–17193.
- Chen, X., Cheng, L., Jia, X., Zeng, Y., Yao, S., Lv, Z., Qin, D., Fang, X., Lei, Y., and Lu, C. (2009). Human immunodeficiency virus type 1 Tat accelerates Kaposi sarcoma-associated herpesvirus Kaposin A-mediated tumorigenesis of transformed fibroblasts in vitro as well as in nude and immunocompetent mice. *Neoplasia* 11, 1272–1284.
- Chen, Z., Teo, A.E., and McCarty, N. (2016). ROS-induced CXCR4 signaling regulates mantle cell lymphoma (MCL) cell survival and drug resistance in the bone marrow microenvironment via autophagy. *Clin. Cancer Res.* 22, 187–199.
- Cheng, C.-W., Kuo, C.-Y., Fan, C.-C., Fang, W.-C., Jiang, S.S., Lo, Y.-K., Wang, T.-Y., Kao, M.-C., and Lee, A.Y.-L. (2013). Overexpression of Lon contributes to survival and aggressive phenotype of cancer cells through mitochondrial complex I-mediated generation of reactive oxygen species. *Cell Death Dis.* 4, e681.
- Chiu, H.-J., Fischman, D. a, and Hammerling, U. (2008). Vitamin A depletion causes oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and PARP-1-dependent energy deprivation. *FASEB J.* 22, 3878–3887.
- Choi, J., Liu, R.M., Kundu, R.K., Sangiorgi, F., Wu, W.C., Maxson, R., and Forman, H.J. (2000a). Molecular mechanism of decreased glutathione content in human immunodeficiency virus type 1 Tat-transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 275, 3693–3698.
- Choi, J., Liu, R.M., Kundu, R.K., Sangiorgi, F., Wu, W., Maxson, R., and Forman, H.J. (2000b). Molecular mechanism of decreased glutathione content in human immunodeficiency virus type 1 Tat-transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 275, 3693–3698.
- Circu, M.L., and Aw, T.Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 749–762.
- Clark, E., Nava, B., and Caputi, M. (2017). Tat is a multifunctional viral protein that modulates cellular gene expression and functions. *Oncotarget* 8, 27569–27581.
- Cohen, M.S., Shaw, G.M., McMichael, A.J., and Haynes, B.F. (2011). Acute HIV-1 Infection. *N. Engl. J. Med.* 364, 1943–1954.
- Console, S., Marty, C., García-Echeverría, C., Schwendener, R., and Ballmer-Hofer, K. (2003). Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) “protein transduction domains” promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 278, 35109–35114.
- Couret, J., and Chang, T.L. (2017). Reactive Oxygen Species in HIV Infection. 3, 597–604.
- Craig, W.J. (1999). Health-promoting properties of common herbs. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 491S – 499S.
- Cummins, N.W., and Badley, A.D. (2010). Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis: 2010. *Cell Death Dis.* 1, e99.
- Curreli, S., Krishnan, S., Reitz, M., Lunardi-Iskandar, Y., Lafferty, M.K., Garzino-Demo, A., Zella, D., Gallo, R.C., and Bryant, J. (2013). B cell lymphoma in HIV transgenic mice. *Retrovirology* 10, 92.
- Daiber, A., Di Lisa, F., Oelze, M., Krölller-Schön, S., Steven, S., Schulz, E., and Münzel, T. (2017). Crosstalk of mitochondria with NADPH oxidase via reactive oxygen and nitrogen species signalling and its role for vascular

- function. *Br. J. Pharmacol.* *174*, 1670–1689.
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., and Milzani, A. (2003). Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol. Med.* *9*, 169–176.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Colombo, R., and Milzani, A. (2007). S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.* *43*, 883–898.
- Dandekar, D.H., Ganesh, K.N., and Mitra, D. (2004). HIV-1 Tat directly binds to NFkappaB enhancer sequence: role in viral and cellular gene expression. *Nucleic Acids Res.* *32*, 1270–1278.
- Daugaard, M., Nitsch, R., Razaghi, B., McDonald, L., Jarrar, A., Torrino, S., Castillo-Lluva, S., Rotblat, B., Li, L., Malliri, A., et al. (2013). Hsc70 controls ROS generation of vertebrate Rac1-dependent NADPH oxidase complexes. *Nat. Commun.* *4*, 1–13.
- Davis, L.I. (1995). The nuclear pore complex. *Annu. Rev. Biochem.* *64*, 865–896.
- Davis, R.E., Brown, K.D., Siebenlist, U., and Staudt, L.M. (2001). Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J. Exp. Med.* *194*, 1861–1874.
- Demain, A.L., and Fang, A. (2000). The Natural Functions of Secondary Metabolites. *69*, 1–39.
- Demarchi, F., d'Adda di Fagagna, F., Falaschi, A., and Giacca, M. (1996). Activation of transcription factor NF-kappaB by the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* *70*, 4427–4437.
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* *1830*, 3217–3266.
- Deponte, M. (2017). The Incomplete Glutathione Puzzle: Just Guessing at Numbers and Figures? *Antioxid. Redox Signal.* *27*, 1130–1161.
- Deshmane, S.L., Mukerjee, R., Fan, S., Del Valle, L., Michiels, C., Sweet, T., Rom, I., Khalili, K., Rappaport, J., Amini, S., et al. (2009). Activation of the oxidative stress pathway by HIV-1 Vpr leads to induction of hypoxia-inducible factor 1?? expression. *J. Biol. Chem.* *284*, 11364–11373.
- Dillon, L.W., Burrow, A.A., and Wang, Y.-H. (2010). DNA instability at chromosomal fragile sites in cancer. *Curr. Genomics* *11*, 326–337.
- Dmitriev, P., Bou Saada, Y., Dib, C., Anseau, E., Barat, A., Hamade, A., Dessen, P., Robert, T., Lazar, V., Louzada, R.A.N., et al. (2016). DUX4-induced constitutive DNA damage and oxidative stress contribute to aberrant differentiation of myoblasts from FSHD patients. *Free Radic. Biol. Med.* *99*, 244–258.
- Dolcetti, R., Giagulli, C., He, W., Selleri, M., Caccuri, F., Eyzaguirre, L.M., Mazzuca, P., Corbellini, S., Campilongo, F., Marsico, S., et al. (2015). Role of HIV-1 matrix protein p17 variants in lymphoma pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 14331–14336.
- Dolcetti, R., Gloghini, A., Caruso, A., and Carbone, A. (2016). A lymphomagenic role for HIV beyond immune suppression? *Blood* *127*, 1403–1409.
- Droge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* *82*, 47–95.
- Dröge W, Eck HP, Näher H, Pekar U, D. V. (1988). Abnormal Amino-Acid concentrations in the blood of patients with Acquired Immunodeficiency syndrome (AIDS) May contribute to the Immunological Defect. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* *369*, 143–148.
- Dudley, A.C. (2006). Likelihood for false positives using bacterially-expressed recombinant proteins in anti-angiogenesis studies. *Cancer Biol. Ther.* *5*, 406.
- Dunleavy, K., and Wilson, W.H. (2012). How I treat HIV-associated lymphoma. *Blood* *119*, 3245–3255.
- Dupré-Crochet, S., Erard, M., and Nüße, O. (2013). ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J. Leukoc. Biol.* *94*, 657–670.
- Elchuri, S., Oberley, T.D., Qi, W., Eisenstein, R.S., Jackson Roberts, L., Van Remmen, H., Epstein, C.J., and Huang, T.-T. (2005). CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* *24*, 367–380.
- Elias, A., Nelson, B., Oputiri, D., and Geoffrey, O.B.P. (2013). Antiretroviral toxicity and oxidative stress. *Am. J. Pharmacol. Toxicol.* *8*, 187–196.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* *35*, 495–516.
- Ensoli, F., Cafaro, A., Casabianca, A., Tripiciano, A., Bellino, S., Longo, O., Francavilla, V., Picconi, O., Sgadari,

- C., Moretti, S., et al. (2015). HIV-1 Tat immunization restores immune homeostasis and attacks the HAART-resistant blood HIV DNA: results of a randomized phase II exploratory clinical trial. *Retrovirology* 12, 33.
- Epstein, M.A. (1965). Morphological and Biological Studies on a Virus in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *J. Exp. Med.* 121, 761–770.
- Falck, J., Coates, J., and Jackson, S.P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434, 605–611.
- Farhan, H., Rammal, H., Hijazi, A., Hamad, H., and Badran, B. (2012). Phytochemical screening and extraction of polyphenol from stems and leaves of a Lebanese *Euphorbia macrolada schyzoceras* Boiss. *Ann. Biol. Res.* 3, 149–156.
- Feig, D.I., Reid, T.M., and Loeb, L.A. (1994). Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res* 54, 1890s – 1894s.
- Ferguson, G., and Bridge, W. (2016). Glutamate cysteine ligase and the age-related decline in cellular glutathione: The therapeutic potential of  $\gamma$ -glutamylcysteine. *Arch. Biochem. Biophys.* 593, 12–23.
- Fialkow, L., Chan, C.K., Rotin, D., Grinstein, S., and Downey, G.P. (1994). Activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in neutrophils. Role of oxidants. *J. Biol. Chem.* 269, 31234–31242.
- Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.* 194, 7–15.
- Finkel, T., and Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247.
- Fiume, G., Vecchio, E., De Laurentiis, A., Trimboli, F., Palmieri, C., Pisano, A., Falcone, C., Pontoriero, M., Rossi, A., Scialdone, A., et al. (2012a). Human immunodeficiency virus-1 Tat activates NF- $\kappa$ B via physical interaction with I $\kappa$ B- $\alpha$  and p65. *Nucleic Acids Res.* 40, 3548–3562.
- Fiume, G., Vecchio, E., De Laurentiis, A., Trimboli, F., Palmieri, C., Pisano, A., Falcone, C., Pontoriero, M., Rossi, A., Scialdone, A., et al. (2012b). Human immunodeficiency virus-1 Tat activates NF- $\kappa$ B via physical interaction with I $\kappa$ B- $\alpha$  and p65. *Nucleic Acids Res.* 40, 3548–3562.
- Flores, S.C., Marecki, J.C., Harper, K.P., Bose, S.K., Nelson, S.K., and McCord, J.M. (1993). Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 represses expression of manganese superoxide dismutase in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 7632–7636.
- Floyd, R. a (1990). Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* 4, 2587–2597.
- Forman, H.J., Zhang, H., and Rinna, A. (2009). Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* 30, 1–12.
- Franco, R., Schoneveld, O.J., Pappa, A., and Panayiotidis, M.I. (2007). The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Arch. Physiol. Biochem.* 113, 234–258.
- Frankel, A.D., and Young, J.A.T. (1998). HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 1–25.
- Friedberg, E.C. (2008). A brief history of the DNA repair field. *Cell Res.* 18, 3–7.
- Fröhling, S., and Döhner, H. (2008). Chromosomal Abnormalities in Cancer. *N. Engl. J. Med.* 359, 722–734.
- Fubini, B., and Hubbard, A. (2003). Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 1507–1516.
- Garcia, J. a, Harrich, D., Pearson, L., Mitsuyasu, R., and Gaynor, R.B. (1988). Functional domains required for tat-induced transcriptional activation of the HIV-1 long terminal repeat. *EMBO J.* 7, 3143–3147.
- Gasparini, C., and Feldmann, M. (2012). NF- $\kappa$ B as a Target for Modulating Inflammatory Responses. *Curr. Pharm. Des.* 18, 5735–5745.
- Germini, D., Tsfasman, T., Klibi, M., El-Amine, R., Pichugin, A., Iarovaia, O. V, Bilhou-Nabera, C., Subra, F., Bou Saada, Y., Sukhanova, A., et al. (2017). HIV Tat induces a prolonged MYC relocalization next to IGH in circulating B-cells. *Leukemia DOI:*, 10.1038/leu.2017.106.
- Ghosh, S., and Hayden, M.S. (2012). Celebrating 25 years of NF- $\kappa$ B research. *Immunol. Rev.* 246, 5–13.
- Ghosh, S., and Karin, M. (2002). Missing Pieces in the NF- $\kappa$ B Puzzle. *Cell* 109, S81–S96.
- Gibson, T.M., Morton, L.M., Shiels, M.S., Clarke, C.A., and Engels, E.A. (2014). Risk of non-Hodgkin lymphoma subtypes in HIV-infected people during the HAART era. *AIDS* 28, 2313–2318.
- Giglia-Mari, G., Zotter, A., and Vermeulen, W. (2011). DNA damage response. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, 1–19.

- Gill, J.G., Piskounova, E., and Morrison, S.J. (2017). Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *LXXXI*, 1–9.
- Gilmore, T.D., Kalaitzidis, D., Liang, M.-C., and Starczynowski, D.T. (2004). The c-Rel transcription factor and B-cell proliferation: a deal with the devil. *Oncogene* *23*, 2275–2286.
- Gloire, G., and Piette, J. (2009). Redox regulation of nuclear post-translational modifications during NF-kappaB activation. *Antioxid. Redox Signal.* *11*, 2209–2222.
- Gloire, G., Legrand-Poels, S., and Piette, J. (2006). NF-κB activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* *72*, 1493–1505.
- Gobbi, P.G., Ferreri, A.J.M., Ponzoni, M., and Levis, A. (2013). Hodgkin lymphoma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *85*, 216–237.
- Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A., and Saxon, A. (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* *305*, 1425–1431.
- Grace, S.C. (2007). Phenolics as Antioxidants. In *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*, pp. 141–168.
- Granich, R., Williams, B., and Montaner, J. (2013). Fifteen million people on antiretroviral treatment by 2015: treatment as prevention. *Curr. Opin. HIV AIDS* *8*, 41–49.
- Grant, C.M., MacIver, F.H., and Dawes, I.W. (1997). Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine. *Mol. Biol. Cell* *8*, 1699–1707.
- Griffith, O.W., and Meister, A. (1985). Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *82*, 4668–4672.
- Grogg, K.L., Miller, R.F., and Dogan, a (2007). HIV infection and lymphoma. *J. Clin. Pathol.* *60*, 1365–1372.
- Gu, Y., Wu, R.F., Xu, Y.C., Flores, S.C., and Terada, L.S. (2001). HIV Tat Activates c-Jun Amino-terminal Kinase through an Oxidant-Dependent Mechanism. *Virology* *286*, 62–71.
- Gülow, K., Kaminski, M., Darvas, K., Süß, D., Li-Weber, M., and Krammer, P.H. (2005). HIV-1 trans-activator of transcription substitutes for oxidative signaling in activation-induced T cell death. *J. Immunol.* *174*, 5249–5260.
- Haber, J.E. (2015). Deciphering the DNA Damage Response. *Cell* *162*, 1183–1185.
- Hadacek, F. (2002). Secondary Metabolites as Plant Traits: Current Assessment and Future Perspectives. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* *21*, 273–322.
- Hadacek, F., Bachmann, G., Engelmeier, D., and Chobot, V. (2011). Hormesis and a chemical raison d'être for secondary plant metabolites. *Dose-Response* *9*, 79–116.
- Hakem, R. (2008). DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *EMBO J.* *27*, 589–605.
- Hakim, O., Resch, W., Yamane, A., Klein, I., Kieffer-Kwon, K.-R., Jankovic, M., Oliveira, T., Bothmer, A., Voss, T.C., Ansarah-Sobrinho, C., et al. (2012). DNA damage defines sites of recurrent chromosomal translocations in B lymphocytes. *Nature* *484*, 69–74.
- Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G., and Bartek, J. (2008). An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* *319*, 1352–1355.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (1991). Free radicals in biology and medicine, second edition. *Free Radic. Biol. Med.* *10*, 449–450.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Hancock, J.T., Desikan, R., and Neill, S.J. (2001). Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem. Soc. Trans.* *29*, 345–350.
- Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* *68*, 2831–2846.
- zur Hausen, H. (1996). Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* *1288*, F55–F78.
- Hayyan, M., Hashim, M.A., and Alnashef, I.M. (2016). Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications.

- Chem. Rev. *116*, 3029–3085.
- Hegner, S.P., Breikreutz, R., Shubinsky, G., Unsoeld, H., Schulze-Osthoff, K., Schmitz, M.L., and Dröge, W. (2000). Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool. *J. Immunol.* *165*, 4319–4328.
- Herscovitch, M., Comb, W., Ennis, T., Coleman, K., Yong, S., Armstead, B., Kalaitzidis, D., Chandani, S., and Gilmore, T.D. (2008). Intermolecular disulfide bond formation in the NEMO dimer requires Cys54 and Cys347. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *367*, 103–108.
- Hingorani, R., Deng, J., Elia, J., McIntyre, C., and Mittar, D. (2011). Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerser<sup>TM</sup> System. *BD Biosci. August*, 1–12.
- Hinz, M., Lemke, P., Anagnostopoulos, I., Hacker, C., Krappmann, D., Mathas, S., Dörken, B., Zenke, M., Stein, H., and Scheidereit, C. (2002). Nuclear Factor KappaB Dependent Gene Expression Profiling of Hodgkin's Disease Tumor Cells, Pathogenetic Significance, and Link to Constitutive Signal Transducer and Activator of Transcription 5a Activity. *J. Exp. Med.* *196*, 605–617.
- Hoesel, B., and Schmid, J. a (2013). The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* *12*, 86.
- Hoffmann, A., Natoli, G., and Ghosh, G. (2006). Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* *25*, 6706–6716.
- Howlader, N., Shiels, M.S., Mariotto, A.B., and Engels, E.A. (2016a). Contributions of HIV to Non-Hodgkin Lymphoma Mortality Trends in the United States. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *25*, 1289–1296.
- Howlader, N., Shiels, M.S., Mariotto, A.B., and Engels, E.A. (2016b). Contributions of HIV to non-hodgkin lymphoma mortality trends in the United States. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *25*, 1289–1296.
- Huang, X., Liang, H., Fan, X., Zhu, L., and Shen, T. (2016). Liver Damage in Patients with HCV/HIV Coinfection Is Linked to HIV-Related Oxidative Stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2016*, 1–11.
- Huber, M.A., Azoitei, N., Baumann, B., Grünert, S., Sommer, A., Pehamberger, H., Kraut, N., Beug, H., and Wirth, T. (2004). NF-κB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J. Clin. Invest.* *114*, 569–581.
- Hughes, G., Murphy, M.P., and Ledgerwood, E.C. (2005). Mitochondrial reactive oxygen species regulate the temporal activation of nuclear factor kappaB to modulate tumour necrosis factor-induced apoptosis: evidence from mitochondria-targeted antioxidants. *Biochem. J.* *389*, 83–89.
- Hummel, M., Bentink, S., Berger, H., Klapper, W., Wessendorf, S., Barth, T.F.E., Bernd, H.-W., Cogliatti, S.B., Dierlamm, J., Feller, A.C., et al. (2006). A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N. Engl. J. Med.* *354*, 2419–2430.
- Huynh, D., Vincan, E., Mantamadiotis, T., Purcell, D., Chan, C.-K., and Ramsay, R. (2007). Oncogenic properties of HIV-Tat in colorectal cancer cells. *Curr. HIV Res.* *5*, 403–409.
- Hymes, K., Greene, J., Marcus, A., William, D., Cheung, T., Prose, N., Ballard, H., and Laubenstein, L. (1981). Kaposi's Sarcoma in Homosexual Men—a Report of Eight Cases. *Lancet* *318*, 598–600.
- Iarovaia, O. V., Rubtsov, M., Ioudinkova, E., Tsfasman, T., Razin, S. V., and Vassetzky, Y.S. (2014). Dynamics of double strand breaks and chromosomal translocations. *Mol. Cancer* *13*, 249.
- Imai, K., Nakata, K., Kawai, K., Hamano, T., Mei, N., Kasai, H., and Okamoto, T. (2005). Induction of OGG1 gene expression by HIV-1 Tat. *J. Biol. Chem.* *280*, 26701–26713.
- Iqbal, J., Sanger, W.G., Horsman, D.E., Rosenwald, A., Pickering, D.L., Dave, B., Dave, S., Xiao, L., Cao, K., Zhu, Q., et al. (2004). BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Am. J. Pathol.* *165*, 159–166.
- Ivanov, A. V., Valuev-Elliston, V.T., Ivanova, O.N., Kochetkov, S.N., Starodubova, E.S., Bartosch, B., and Isaguliant, M.G. (2016a). Oxidative Stress during HIV Infection: Mechanisms and Consequences. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2016*, 1–18.
- Ivanov, A. V., Valuev-Elliston, V.T., Ivanova, O.N., Kochetkov, S.N., Starodubova, E.S., Bartosch, B., and Isaguliant, M.G. (2016b). Oxidative Stress during HIV Infection: Mechanisms and Consequences. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2016*.

- Jackson, S.P., and Bartek, J. (2010). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078.
- Jaffe, E.S., and Pittaluga, S. (2011). Aggressive B-Cell Lymphomas: A Review of New and Old Entities in the WHO Classification. *Hematology* 2011, 506–514.
- Javier, R.T., and Butel, J.S. (2008). The history of tumor virology. *Cancer Res.* 68, 7693–7706.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* 61, 69–90.
- Jena, N.R. (2012). DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J. Biosci.* 37, 503–507.
- Jensen, P.K. (1966). Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles I. pH dependency and hydrogen peroxide formation. *Biochim. Biophys. Acta - Enzymol. Biol. Oxid.* 122, 157–166.
- Jin, Z.-Y., Liu, X., Ding, Y.-Y., Zhang, Z.-F., and He, N. (2017). Cancer risk factors among people living with HIV/AIDS in China: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* 7, 4890.
- Johar, R., Sharma, R., Kaur, A., and K. Mukherjee, T. (2015). Role of Reactive Oxygen Species in Estrogen Dependant Breast Cancer Complication. *Anticancer. Agents Med. Chem.* 16, 190–199.
- Johnson, T.P., Patel, K., Johnson, K.R., Maric, D., Calabresi, P.A., Hasbun, R., and Nath, A. (2013). Induction of IL-17 and nonclassical T-cell activation by HIV-Tat protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 13588–13593.
- Johri, M.K., Mishra, R., Chhatbar, C., Unni, S.K., and Singh, S.K. (2011). Tits and bits of HIV Tat protein. *Expert Opin. Biol. Ther.* 11, 269–283.
- Jones, J.T., Qian, X., van der Velden, J.L.J., Chia, S.B., McMillan, D.H., Flemer, S., Hoffman, S.M., Lahue, K.G., Schneider, R.W., Nolin, J.D., et al. (2016). Glutathione S-transferase pi modulates NF- $\kappa$ B activation and pro-inflammatory responses in lung epithelial cells. *Redox Biol.* 8, 375–382.
- Jung, S.Y., and Kim, Y.J. (2013). C-terminal region of HBx is crucial for mitochondrial DNA damage. *Cancer Lett.* 331, 76–83.
- Kaileh, M., and Sen, R. (2012). NF-kappaB function in B lymphocytes. *Immunol Rev* 246, 254–271.
- Kairisalo, M., Korhonen, L., Blomgren, K., and Lindholm, D. (2007). X-linked inhibitor of apoptosis protein increases mitochondrial antioxidants through NF-kappaB activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364, 138–144.
- Kamata, H., Manabe, T., Oka, S. ichi, Kamata, K., and Hirata, H. (2002). Hydrogen peroxide activates I $\beta$ B kinases through phosphorylation of serine residues in the activation loops. *FEBS Lett.* 519, 231–237.
- Kaplowitz, N., Aw, T.Y., Ookhtens, M. (1985). The Regulation of Hepatic Glutathione. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 25, 715–744.
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R., and Li, Z.-W. (2002). NF- $\kappa$ B IN CANCER: FROM INNOCENT BYSTANDER TO MAJOR CULPRIT. *Nat. Rev. Cancer* 2, 301–310.
- Karp, D.R., Shimooku, K., and Lipsky, P.E. (2001). Expression of  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase Protects Ramos B Cells from Oxidation-induced Cell Death. *J. Biol. Chem.* 276, 3798–3804.
- Kasote, D.M., Katyare, S.S., Hegde, M. V., and Bae, H. (2015). Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *Int. J. Biol. Sci.* 11, 982–991.
- Kgatle, M.M., Spearman, C.W., Kalla, A.A., and Hairwadzi, H.N. (2017). DNA Oncogenic Virus-Induced Oxidative Stress, Genomic Damage, and Aberrant Epigenetic Alterations. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, 3179421.
- Khan, M.A., Chen, H., Wan, X., Tania, M., Xu, A., Chen, F., and Zhang, D. (2013). Regulatory effects of resveratrol on antioxidant enzymes: A mechanism of growth inhibition and apoptosis induction in cancer cells. *Mol. Cells* 35, 219–225.
- Khanna, K.K., and Jackson, S.P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* 27, 247–254.
- Kim, N., Kukkonen, S., Gupta, S., and Aldovini, A. (2010). Association of Tat with Promoters of PTEN and PP2A Subunits Is Key to Transcriptional Activation of Apoptotic Pathways in HIV-Infected CD4+ T Cells. *PLoS Pathog.* 6, e1001103.

- Kim, T.-M., Xi, R., Luquette, L.J., Park, R.W., Johnson, M.D., and Park, P.J. (2013). Functional genomic analysis of chromosomal aberrations in a compendium of 8000 cancer genomes. *Genome Res.* *23*, 217–227.
- Klatt, P., and Lamas, S. (2000). Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur. J. Biochem.* *267*, 4928–4944.
- Klaunig, J.E., Xu, Y., Isenberg, J.S., Bachowski, S., Kolaja, K.L., Jiang, J., Stevenson, D.E., and Walborg, E.F. (1998). The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* *106 Suppl*, 289–295.
- Koyama, T., Sun, B., Tokunaga, K., Tatsumi, M., and Ishizaka, Y. (2013). DNA damage enhances integration of HIV-1 into macrophages by overcoming integrase inhibition. *Retrovirology* *10*, 21.
- Kramer, M.H., Hermans, J., Wijburg, E., Philippo, K., Geelen, E., van Krieken, J.H., de Jong, D., Maartense, E., Schuuring, E., and Kluin, P.M. (1998). Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* *92*, 3152–3162.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., and Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod. Process.* *89*, 217–233.
- Kruman, I.I., Nath, a, and Mattson, M.P. (1998). HIV-1 protein Tat induces apoptosis of hippocampal neurons by a mechanism involving caspase activation, calcium overload, and oxidative stress. *Exp. Neurol.* *154*, 276–288.
- Kundu, R.K., Sangiorgi, F., Wu, L.Y., Pattengale, P.K., Hinton, D.R., Gill, P.S., and Maxson, R. (1999). Expression of the human immunodeficiency virus-Tat gene in lymphoid tissues of transgenic mice is associated with B-cell lymphoma. *Blood* *94*, 275–282.
- Kuo, L.J., and Yang, L.-X. (2008). Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* *22*, 305–309.
- Küppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* *5*, 251–262.
- Küppers, R., and Dalla-Favera, R. (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* *20*, 5580–5594.
- Küppers, R., Dührsen, U., and Hansmann, M.L. (2014). Pathogenesis, diagnosis, and treatment of composite lymphomas. *Lancet Oncol.* *15*.
- Kwiecien, S., Jasnos, K., Magierowski, M., Sliwowski, Z., Pajdo, R., Brzozowski, B., Mach, T., Wojcik, D., and Brzozowski, T. (2014). Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress - induced gastric injury. *J. Physiol. Pharmacol.* *65*, 613–622.
- Kwon, H.S., Brent, M.M., Getachew, R., Jayakumar, P., Chen, L.F., Schnolzer, M., McBurney, M.W., Marmorstein, R., Greene, W.C., and Ott, M. (2008). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat Protein Inhibits the SIRT1 Deacetylase and Induces T Cell Hyperactivation. *Cell Host Microbe* *3*, 158–167.
- Ladha, J.S., Tripathy, M.K., and Mitra, D. (2005). Mitochondrial complex I activity is impaired during HIV-1-induced T-cell apoptosis. *Cell Death Differ.* *12*, 1417–1428.
- Lahtz, C., and Pfeifer, G.P. (2011). Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. *J. Mol. Cell Biol.* *3*, 51–58.
- Lambeth, J.D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 181–189.
- Lane, H.C., Masur, H., Edgar, L.C., Whalen, G., Rook, A.H., and Fauci, A.S. (1983). Abnormalities of B-Cell Activation and Immunoregulation in Patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *N. Engl. J. Med.* *309*, 453–458.
- Lecocour, H., Borgne-Sanchez, A., Chaloin, O., El-Khoury, R., Brabant, M., Langonné, A., Porceddu, M., Brière, J.-J., Buron, N., Rebouillat, D., et al. (2012). HIV-1 Tat protein directly induces mitochondrial membrane permeabilization and inactivates cytochrome c oxidase. *Cell Death Dis.* *3*, e282.
- Lewden, C., Salmon, D., Morlat, P., Bévilacqua, S., Jouglu, E., Bonnet, F., Héripert, L., Costagliola, D., May, T., and Chêne, G. (2005). Causes of death among human immunodeficiency virus (HIV)-infected adults in the era of potent antiretroviral therapy: Emerging role of hepatitis and cancers, persistent role of AIDS. *Int. J. Epidemiol.* *34*, 121–130.
- Li, N., and Karin, M. (1999). Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *FASEB J.* *13*, 1137–1143.
- Li, T.S., and Marbán, E. (2010). Physiological levels of reactive oxygen species are required to maintain genomic

- stability in stem cells. *Stem Cells* 28, 1178–1185.
- Li, T., Zhao, X.P., Wang, L.Y., Gao, S., Zhao, J., Fan, Y.C., and Wang, K. (2013a). Glutathione S-transferase P1 correlated with oxidative stress in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Med. Sci.* 10, 683–690.
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E.T., Wang, H., and Yang, X. (2013b). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J. Hematol. Oncol.* 6, 19.
- Lin, M.T., and Beal, M.F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787–795.
- Lin, X., and Nelson, W.G. (2003). Methyl-CpG-binding domain protein-2 mediates transcriptional repression associated with hypermethylated GSTP1 CpG islands in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.* 63, 498–504.
- Lin, C., Yang, L., Tanasa, B., Hutt, K., Ju, B. gun, Ohgi, K., Zhang, J., Rose, D.W., Fu, X.D., Glass, C.K., et al. (2009). Nuclear Receptor-Induced Chromosomal Proximity and DNA Breaks Underlie Specific Translocations in Cancer. *Cell* 139, 1069–1083.
- Lindahl, T., and Barnes, D.E. (2000). Repair of endogenous DNA damage. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, pp. 127–133.
- Liou, G.-Y., and Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.* 44, 479–496.
- Liu, V.W.T., and Huang, P.L. (2008). Cardiovascular roles of nitric oxide: A review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc. Res.* 77, 19–29.
- Liu, J., Perkins, N.D., Schmid, R.M., and Nabel, G.J. (1992). Specific NF-kappa B subunits act in concert with Tat to stimulate human immunodeficiency virus type 1 transcription. *J. Virol.* 66, 3883–3887.
- Liu, R.M., Vayalil, P.K., Ballinger, C., Dickinson, D.A., Huang, W.T., Wang, S., Kavanagh, T.J., Matthews, Q.L., and Postlethwait, E.M. (2012). Transforming growth factor ?? suppresses glutamate-cysteine ligase gene expression and induces oxidative stress in a lung fibrosis model. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 554–563.
- Lobritz, M.A., Ratcliff, A.N., and Arts, E.J. (2010). HIV-1 entry, inhibitors, and resistance. *Viruses* 2, 1069–1105.
- Loeb, L.A., Springga.Cf, and Battula, N. (1974). Errors in DNA-replication as a basis of malignant changes. *Cancer Res.* 34, 2311–2321.
- Loschen, G., Azzi, A., Richter, C., and Plohi, L. (1974). Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *42*, 68–72.
- Lu, S.C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3143–3153.
- Lu, a L., Li, X., Gu, Y., Wright, P.M., and Chang, D.Y. (2001). Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions. *Cell Biochem. Biophys.* 35, 141–170.
- Lu, L.Y., Ou, N., and Lu, Q.-B. (2013). Antioxidant Induces DNA Damage, Cell Death and Mutagenicity in Human Lung and Skin Normal Cells. *Sci. Rep.* 3, 3169.
- Lu, W., Ogasawara, M.A., and Huang, P. (2008). Models of reactive oxygen species in cancer. *Drug Discov. Today Dis. Model.* 4, 67–73.
- Makinde, O., Rotimi, K., and Ikumawoyi, V. (2017). Effect of vitamin A and vitamin C supplementation on oxidative stress in HIV and HIV-TB co-infection at Lagos University Teaching Hospital ( LUTH ) Nigeria . *17*, 308–314.
- Manchester, K.L. (1995). Theodor Boveri and the origin of malignant tumours. *Trends Cell Biol.* 5, 384–387.
- Manda, K.R., Banerjee, A., Banks, W. a, and Ercal, N. (2011). Highly active antiretroviral therapy drug combination induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in immortalized human blood-brain barrier endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 801–810.
- Manda-Handzlik, A., and Demkow, U. (2015). Neutrophils: The role of oxidative and nitrosative stress in health and disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 857, 51–60.
- Mandas, A., Iorio, E.L., Congiu, M.G., Balestrieri, C., Mereu, A., Cau, D., Dessì, S., and Curreli, N. (2009). Oxidative Imbalance in HIV-1 Infected Patients Treated with Antiretroviral Therapy. *J. Biomed. Biotechnol.* 2009, 1–7.
- Mann, D.A., and Frankel, A.D. (1991). Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein. *EMBO J.* 10, 1733–1739.

- Marban, C., Su, T., Ferrari, R., Li, B., Vatakis, D., Pellegrini, M., Zack, J.A., Rohr, O., and Kurdistani, S.K. (2011). Genome-wide binding map of the HIV-1 Tat protein to the human genome. *PLoS One* *6*, e26894.
- de Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D., and Plummer, M. (2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* *13*, 607–615.
- Martínez, M.C., and Andriantsitohaina, R. (2009). Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* *11*, 669–702.
- Masiá, M., Padilla, S., Fernández, M., Rodríguez, C., Moreno, A., Oteo, J.A., Antela, A., Moreno, S., Del Amo, J., Gutiérrez, F., et al. (2016). Oxidative Stress Predicts All-Cause Mortality in HIV-Infected Patients. *PLoS One* *11*, e0153456.
- Mayne, M., Holden, C.P., Nath, A., and Geiger, J.D. (2000). Release of calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-regulated stores by HIV-1 Tat regulates TNF- $\alpha$  production in human macrophages. *J. Immunol.* *164*, 6538–6542.
- Mccord, J.M. (2016). Redox-Active Therapeutics. 5–11.
- McCord, J.M., and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* *244*, 6049–6055.
- Mediouni, S., Darque, A., Baillat, G., Ravoux, I., Dhiver, C., Tissot-Dupont, H., Mokhtari, M., Moreau, H., Tamalet, C., Brunet, C., et al. (2012). Antiretroviral Therapy Does Not Block the Secretion of the Human Immunodeficiency Virus Tat Protein. *Infect. Disord. – Drug Targets* *12*, 81–86.
- Mehta, S., Spiegelman, D., Aboud, S., Giovannucci, E.L., Msamanga, G.I., Hertzmark, E., Mugusi, F.M., Hunter, D.J., and Fawzi, W.W. (2010). Lipid-soluble vitamins A, D, and E in HIV-infected pregnant women in Tanzania. *Eur. J. Clin. Nutr.* *64*, 808–817.
- Meister, A. (1988). On the discovery of glutathione. *Trends Biochem. Sci.* *13*, 185–188.
- Meister, A., and Anderson, M.E. (1983). Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* *52*, 711–760.
- Mercurio, F., and Manning, a M. (1999). NF- $\kappa$ B as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* *18*, 6163–6171.
- Mesri, E.A., Feitelson, M.A., and Munger, K. (2014). Human viral oncogenesis: A cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe* *15*, 266–282.
- Mitelman, F. (2000). Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* *462*, 247–253.
- Mitelman, F., Johansson, B., and Mertens, F. (2004). Fusion genes and rearranged genes as a linear function of chromosome aberrations in cancer. *Nat. Genet.* *36*, 331–334.
- MMWR(Weekly) (1981). Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* *30*, 305–308.
- Moir, S., and Fauci, A.S. (2009). B cells in HIV infection and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 235–245.
- Mollace, V., Nottet, H.S.L.M., Clayette, P., Turco, M.C., Muscoli, C., Salvemini, D., and Perno, C.F. (2001a). Oxidative stress and neuroAIDS: Triggers, modulators and novel antioxidants. *Trends Neurosci.* *24*, 411–416.
- Mollace, V., Nottet, H.S., Clayette, P., Turco, M.C., Muscoli, C., Salvemini, D., and Perno, C.F. (2001b). Oxidative stress and neuroAIDS: triggers, modulators and novel antioxidants. *Trends Neurosci.* *24*, 411–416.
- Molyneux, P. (2004). The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarín J. Sci. Technol.* *26*, 211–219.
- Montero, D., Tachibana, C., Rahr Winther, J., and Appenzeller-Herzog, C. (2013). Intracellular glutathione pools are heterogeneously concentrated. *Redox Biol.* *1*, 508–513.
- Moran, J.F., Klucas, R. V., Grayer, R.J., Abian, J., and Becana, M. (1997). Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: Prooxidant and antioxidant properties. *Free Radic. Biol. Med.* *22*, 861–870.
- Morceau, F., Duvoix, A., Delhalle, S., Schnekenburger, M., Dicato, M., and Diederich, M. (2004). Regulation of glutathione S-transferase P1-1 gene expression by NF- $\kappa$ B in tumor necrosis factor alpha-treated K562 leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.* *67*, 1227–1238.
- Morgan, M.J., and Liu, Z. (2011a). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Res.* *21*, 103–115.

- Morgan, M.J., and Liu, Z. (2011b). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Res.* *21*, 103–115.
- Morris, D., Guerra, C., Donohue, C., Oh, H., Khurasany, M., and Venketaraman, V. (2012). Unveiling the Mechanisms for Decreased Glutathione in Individuals with HIV Infection. *Clin. Dev. Immunol.* *2012*, 1–10.
- Morris, D., Ly, J., Chi, P.T., Daliva, J., Nguyen, T., Soofer, C., Chen, Y.C., Lagman, M., and Venketaraman, V. (2014). Glutathione synthesis is compromised in erythrocytes from individuals with HIV. *Front. Pharmacol.* *5 APR*, 1–6.
- Mousseau, G., Kessing, C.F., Fromentin, R., Trautmann, L., Chomont, N., and Valente, S.T. (2015). The Tat Inhibitor Didehydro-Cortistatin A Prevents HIV-1 Reactivation from Latency. *MBio* *6*, e00465–15.
- Muller, F. (2000). The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain: Its relevance to aging. *J. Am. Aging Assoc.* *23*, 227–253.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* *417*, 1–13.
- Mushahwar, I.K. (2007). Human Immunodeficiency Viruses: Molecular Virology, Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. *Congenital Other Relat. Infect. Dis. Newborn* *13*, 75–87.
- Musinova, Y.R., Sheval, E. V., Dib, C., Germini, D., and Vassetzky, Y.S. (2016). Functional roles of HIV-1 Tat protein in the nucleus. *Cell. Mol. Life Sci.* *73*, 589–601.
- Nakajima, S., and Kitamura, M. (2013). Bidirectional regulation of NF- $\kappa$ B by reactive oxygen species: A role of unfolded protein response. *Free Radic. Biol. Med.* *65*, 162–174.
- Nakamura, H., Masutani, H., and Yodoi, J. (2002). Redox imbalance and its control in HIV infection. *Antioxid. Redox Signal.* *4*, 455–464.
- Nambiar, M., and Raghavan, S.C. (2011). How does DNA break during chromosomal translocations? *Nucleic Acids Res.* *39*, 5813–5825.
- Narasimhan, M., Rathinam, M., Patel, D., Henderson, G., and Mahimainathan, L. (2012). Astrocytes Prevent Ethanol Induced Apoptosis of Nrf2 Depleted Neurons by Maintaining {GSH} Homeostasis. *Open J. Apoptosis* *01*, 9.
- Narayan, C., and Kumar, A. (2014). Antineoplastic and immunomodulatory effect of polyphenolic components of *Achyranthes aspera* (PCA) extract on urethane induced lung cancer in vivo. *Mol. Biol. Rep.* *41*, 179–191.
- Navarro, J., Obrador, E., Carretero, J., Petschen, I., Aviñó, J., Perez, P., and Estrela, J.M. (1999). Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* *26*, 410–415.
- Negrini, S., Gorgoulis, V.G., and Halazonetis, T.D. (2010). Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 220–228.
- Niedzwiecki, A., Roomi, M.W., Kalinovsky, T., and Rath, M. (2016). Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. *Nutrients* *8*.
- Noori, S. (2012). An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. *J. Clin. Cell. Immunol.* *01*, 1177–1188.
- Nougayrede, J.P., and Oswald, E. (2011). [Microbiota and colorectal cancer: genotoxic bacteria in the intestinal tract]. *Bull Acad Natl Med* *195*, 1295.
- Nowak, D.E., Tian, B., Jamaluddin, M., Boldogh, I., Vergara, L.A., Choudhary, S., and Brasier, A.R. (2008). RelA Ser276 Phosphorylation Is Required for Activation of a Subset of NF- $\kappa$ B-Dependent Genes by Recruiting Cyclin-Dependent Kinase 9/Cyclin T1 Complexes. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 3623–3638.
- Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* *194*, 23–28.
- Nunnari, G., Smith, J. a, and Daniel, R. (2008). HIV-1 Tat and AIDS-associated cancer: targeting the cellular anti-cancer barrier? *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *27*, 3.
- Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2010). Origin of Chromosomal Translocations in Lymphoid Cancer. *Cell* *141*, 27–38.
- Olinski, R., Gackowski, D., Foksinski, M., Rozalski, R., Roszkowski, K., and Jaruga, P. (2002). Oxidative DNA damage: Assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. *Free Radic. Biol. Med.* *33*, 192–200.

- De Oliveira, G.A., Cheng, R.Y.S., Ridnour, L.A., Basudhar, D., Somasundaram, V., McVicar, D.W., Monteiro, H.P., and Wink, D.A. (2017). Inducible Nitric Oxide Synthase in the Carcinogenesis of Gastrointestinal Cancers. *Antioxidants Redox Signal.* 26.
- Oliveira-Marques, V., Marinho, H.S., Cyrne, L., and Antunes, F. (2009). Role of hydrogen peroxide in NF-kappaB activation: from inducer to modulator. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2223–2243.
- Oliver, K.M., Garvey, J.F., Ng, C.T., Veale, D.J., Fearon, U., Cummins, E.P., and Taylor, C.T. (2009). Hypoxia Activates NF-κB-Dependent Gene Expression Through the Canonical Signaling Pathway. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2057–2064.
- Pace, G.W., and Leaf, C.D. (1995). The role of oxidative stress in HIV disease. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 523–528.
- Pacht, E.R., Diaz, P., Clanton, T., Hart, J., and Gadek, J.E. (1997). Serum vitamin E decreases in HIV-seropositive subjects over time. *J. Lab. Clin. Med.* 130, 293–296.
- Paiva, C.N., and Bozza, M.T. (2014). Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? *Antioxid. Redox Signal.* 20, 1000–1037.
- Pandey, K.B., and Rizvi, S.I. (2009). Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2, 270–278.
- Pantano, C., Reynaert, N.L., van der Vliet, A., and Janssen-Heininger, Y.M.W. (2006). Redox-sensitive kinases of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1791–1806.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., and Jemal, A. (2014). Cancer in Africa 2012. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 23, 953–966.
- Paulsen, C.E., and Carroll, K.S. (2010). Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. *ACS Chem. Biol.* 5, 47–62.
- Perry, S.W., Norman, J.P., Litzburg, A., Zhang, D., Dewhurst, S., and Gelbard, H.A. (2005). HIV-1 Transactivator of Transcription Protein Induces Mitochondrial Hyperpolarization and Synaptic Stress Leading to Apoptosis. *J. Immunol.* 174, 4333–4344.
- Phillips, A.N., Neaton, J., and Lundgren, J.D. (2008). The role of HIV in serious diseases other than AIDS. *Aids* 22, 2409–2418.
- Pieper, K., Grimbacher, B., and Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 959–971.
- Pocernich, C.B., Sultana, R., Mohmmad-Abdul, H., Nath, A., and Butterfield, D.A. (2005). HIV-dementia, Tat-induced oxidative stress, and antioxidant therapeutic considerations. *Brain Res. Rev.* 50, 14–26.
- Podhorecka, M., Skladanowski, A., and Bozko, P. (2011). H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J. Nucleic Acids* 2011, 1–9.
- Poulsen, H.E. (2005). Oxidative DNA modifications. *Exp. Toxicol. Pathol.* 57, 161–169.
- Prasad, S., Phromnoi, K., Yadav, V.R., Chaturvedi, M.M., and Aggarwal, B.B. (2010a). Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer. *Planta Med.* 76, 1044–1063.
- Prasad, S., Ravindran, J., and Aggarwal, B.B. (2010b). NF-κB and cancer: How intimate is this relationship. In *Molecular and Cellular Biochemistry*, pp. 25–37.
- Prasad, S., Gupta, S.C., and Tyagi, A.K. (2017a). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett.* 387, 95–105.
- Prasad, S., Gupta, S.C., and Tyagi, A.K. (2017b). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett.* 387, 95–105.
- Del Prete, A., Zaccagnino, P., Di Paola, M., Saltarella, M., Oliveros Celis, C., Nico, B., Santoro, G., and Lorusso, M. (2008). Role of mitochondria and reactive oxygen species in dendritic cell differentiation and functions. *Free Radic Biol Med* 44, 1443–1451.
- Price, T.O., Ercal, N., Nakaoke, R., and Banks, W.A. (2005). HIV-1 viral proteins gp120 and Tat induce oxidative stress in brain endothelial cells. *Brain Res.* 1045, 57–63.
- Puca, A., Fiume, G., Palmieri, C., Trimboli, F., Olimpico, F., Scala, G., and Quinto, I. (2007). IκB-α represses the transcriptional activity of the HIV-1 Tat transactivator by promoting its nuclear export. *J. Biol. Chem.* 282,

37146–37157.

- Pyo, C.W., Yang, Y.L., Yoo, N.K., and Choi, S.Y. (2008). Reactive oxygen species activate HIV long terminal repeat via post-translational control of NF- $\kappa$ B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *376*, 180–185.
- Quinchia, L.A., Delgado, M.A., Valencia, C., Franco, J.M., and Gallegos, C. (2011). Natural and synthetic antioxidant additives for improving the performance of new biolubricant formulations. *J. Agric. Food Chem.* *59*, 12917–12924.
- Rafieian-Kopaei, M., and Sewell, R.D.E. (2014). The history and ups and downs of herbal medicines usage. *J. HerbMed Pharmacol.* *J. HerbMed Pharmacol.* *J. HerbMed Pharmacol* *3*, 1–3.
- Raj, L., Ide, T., Gurkar, A.U., Foley, M., Schenone, M., Li, X., Tolliday, N.J., Golub, T.R., Carr, S.A., Shamji, A.F., et al. (2011). Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. *Nature* *475*, 231–234.
- Ray, P.D., Huang, B.-W., and Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* *24*, 981–990.
- Rayet, B., and Gélinas, C. (1999). Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* *18*, 6938–6947.
- Reeder, J.E., Kwak, Y.-T., McNamara, R.P., Forst, C. V., and D’Orso, I. (2015). HIV Tat controls RNA Polymerase II and the epigenetic landscape to transcriptionally reprogram target immune cells. *Elife* *4*.
- Reniers, G., Slaymaker, E., Nakiyingi-Miiro, J., Nyamukapa, C., Crampin, A.C., Herbst, K., Urassa, M., Otieno, F., Gregson, S., Sewe, M., et al. (2014). Mortality trends in the era of antiretroviral therapy. *Aids* *28*, S533–S542.
- Reynaert, N.L., Ckless, K., Korn, S.H., Vos, N., Guala, A.S., Wouters, E.F., van der Vliet, A., and Janssen-Heininger, Y.M. (2004). Nitric oxide represses inhibitory kappaB kinase through S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 8945–8950.
- Reynaert, N.L., van der Vliet, A., Guala, A.S., McGovern, T., Hristova, M., Pantano, C., Heintz, N.H., Heim, J., Ho, Y.-S., Matthews, D.E., et al. (2006). Dynamic redox control of NF-kappaB through glutaredoxin-regulated S-glutathionylation of inhibitory kappaB kinase beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 13086–13091.
- Ribrag, V., Camara-Clayette, V., Bosq, J., and Vasstezky, Y. (2012). Lymphome de Burkitt. *EMC - Hématologie* *7*, 1–11.
- Rice-Evans, C. a, Miller, N.J., and Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* *2*, 152–159.
- Richard, M.J., Guiraud, P., Didier, C., Seve, M., Flores, S.C., and Favier, a (2001). Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein impairs selenogluthathione peroxidase expression and activity by a mechanism independent of cellular selenium uptake: consequences on cellular resistance to UV-A radiation. *Arch. Biochem. Biophys.* *386*, 213–220.
- Richter, K., and Kietzmann, T. (2016). Reactive oxygen species and fibrosis: further evidence of a significant liaison. *Cell Tissue Res.* *365*, 591–605.
- Riedel, D.J., Rositch, A.F., Redfield, R.R., and Blattner, W.A. (2015). HIV-associated lymphoma sub-type distribution, immunophenotypes and survival in an urban clinic population. *Leuk. Lymphoma* *1–7*.
- Riedel, D.J., Rositch, A.F., Redfield, R.R., and Blattner, W.A. (2016). HIV-associated lymphoma sub-type distribution, immunophenotypes and survival in an urban clinic population. *Leuk. Lymphoma* *57*, 306–312.
- Rochette, L., Zeller, M., Cottin, Y., and Vergely, C. (2014). Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* *1840*, 2709–2729.
- Romani, B., Engelbrecht, S., and Glashoff, R.H. (2010a). Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* *91*, 1–12.
- Romani, B., Engelbrecht, S., and Glashoff, R.H. (2010b). Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.* *91*, 1–12.
- Romero-Laorden, N., and Castro, E. (2017). Inherited mutations in DNA repair genes and cancer risk. *Curr. Probl. Cancer* *41*, 251–264.
- Rossi, C., Balboni, P.G., Betti, M., Marconi, P.C., Bozzini, R., Grossi, M.P., Barbanti-Brodano, G., and Caputo,

- A. (1997). Inhibition of HIV-1 replication by a Tat transdominant negative mutant in human peripheral blood lymphocytes from healthy donors and HIV-1- infected patients. *Gene Ther.* *4*, 1261–1269.
- Rous, P. (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* *13*, 397–411.
- Russell, E.G., and Cotter, T.G. (2015). New Insight into the Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cellular Signal-Transduction Processes. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, pp. 221–254.
- Ryan, E., Hollingworth, R., and Grand, R. (2016). Activation of the DNA Damage Response by RNA Viruses. *Biomolecules* *6*, 2.
- Rydberg, B., and Johanson, K.J. (1978). Estimation of DNA Strand Breaks in Single Mammalian Cells. In *DNA Repair Mechanisms*, pp. 465–468.
- Sabharwal, S.S., and Schumacker, P.T. (2014). Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat. Rev. Cancer* *14*, 709–721.
- Saing, T., Lagman, M., Castrillon, J., Gutierrez, E., Guilford, F.T., and Venketaraman, V. (2016). Analysis of glutathione levels in the brain tissue samples from HIV-1-positive individuals and subject with Alzheimer's disease and its implication in the pathophysiology of the disease process. *BBA Clin.* *6*, 38–44.
- Sbrana, E., Paladini, A., Bramanti, E., Spinetti, M.C., and Raspi, G. (2004). Quantitation of reduced glutathione and cysteine in human immunodeficiency virus-infected patients. *Electrophoresis* *25*, 1522–1529.
- Schieber, M., and Chandel, N.S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* *24*, R453–R462.
- Schmidt-Hansen, M., Berendse, S., Marafioti, T., and McNamara, C. (2017). Does cell-of-origin or MYC, BCL2 or BCL6 translocation status provide prognostic information beyond the International Prognostic Index score in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab and chemotherapy? A systematic review. *Leuk. Lymphoma* *58*, 2403–2418.
- Schnittman, S.M., Lane, H.C., Higgins, S.E., Folks, T., and Fauci, a S. (1986). Direct polyclonal activation of human B lymphocytes by the acquired immune deficiency syndrome virus. *Science* *233*, 1084–1086.
- Schönberger, K., and Cabezas-Wallscheid, N. (2017). Vitamin C: C-ing a New Way to Fight Leukemia. *Cell Stem Cell* *21*, 561–563.
- Schreck, R., Rieber, P., and Baeuerle, P.A. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* *10*, 2247–2258.
- Schroer, K.T., Gibson, A.M., Sivaprasad, U., Bass, S.A., Ericksen, M.B., Wills-Karp, M., Lecras, T., Fitzpatrick, A.M., Brown, L.A.S., Stringer, K.F., et al. (2011). Downregulation of glutathione S-transferase pi in asthma contributes to enhanced oxidative stress. *J. Allergy Clin. Immunol.* *128*, 539–548.
- Secchiero, P., Zella, D., Capitani, S., Gallo, R.C., and Zauli, G. (1999). Extracellular HIV-1 tat protein up-regulates the expression of surface CXC-chemokine receptor 4 in resting CD4+ T cells. *J. Immunol.* *162*, 2427–2431.
- Sehn, L.H., and Gascoyne, R.D. (2015). Diffuse large B-cell lymphoma: Optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood* *125*, 22–32.
- Sen, R., and Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* *46*, 705–716.
- Sharma, B. (2014). Oxidative Stress in HIV Patients receiving Antiretroviral Therapy. *Curr. HIV Res.* *12*, 13–21.
- Shaw, G.M., and Hunter, E. (2012). HIV transmission. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*, 1–23.
- Shen, Z. (2011). Genomic instability and cancer: An introduction. *J. Mol. Cell Biol.* *3*, 1–3.
- Sheng, Z., Oka, S., Tsuchimoto, D., Abolhassani, N., Nomaru, H., Sakumi, K., Yamada, H., and Nakabeppu, Y. (2012). 8-Oxoguanine causes neurodegeneration during MUTYH-mediated DNA base excision repair. *J. Clin. Invest.* *122*, 4344–4361.
- Shi, M.M., Iwamoto, T., and Forman, H.J. (1994).  $\gamma$ -Glutamylcysteine synthetase and GSH increase in quinone-induced oxidative stress in BPAEC. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* *267*, L414–L421.
- Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 155–168.
- Shiloh, Y. (2006). The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem. Sci.* *31*, 402–410.

- Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2017). Cancer statistics, 2017. *CA. Cancer J. Clin.* *67*, 7–30.
- Sierra, S., Kupfer, B., and Kaiser, R. (2005). Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J. Clin. Virol.* *34*, 233–244.
- Silber, R., Farber, C.M., Papadopoulos, E., Nevrla, D., Liebes, L., Bruck, M., Brown, R., and Canellakis, Z.N. (1992). Glutathione depletion in chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes. *Blood* *80*, 2038–2043.
- Simon, V., Ho, D., and Karim, Q. (2010). HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment. *Lancet* *368*, 489–504.
- Singal, R., van Wert, J., and Bashambu, M. (2001). Cytosine methylation represses glutathione S-transferase P1 (GSTP1) gene expression in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* *61*, 4820–4826.
- Siomek, A. (2012). NF- $\kappa$ B signaling pathway and free radical impact. *Acta Biochim Pol* *59*, 323–331.
- Siomek, A., Gackowski, D., Rozalski, R., Dziaman, T., Szpila, A., Guz, J., and Olinski, R. (2007). Higher leukocyte 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and lower plasma ascorbate in aging humans? *Antioxid. Redox Signal.* *9*, 143–150.
- Sklyar, I., Iarovaia, O. V., Gavrilov, A.A., Pichugin, A., Germini, D., Tsfasman, T., Caron, G., Fest, T., Lipinski, M., Razin, S. V., et al. (2016). Distinct Patterns of Colocalization of the CCND1 and CMYC Genes with Their Potential Translocation Partner IGH at Successive Stages of B-Cell Differentiation. *J. Cell. Biochem.* *117*, 1506–1510.
- Smith, S.M., Anastasi, J., Cohen, K.S., and Godley, L.A. (2010). The impact of MYC expression in lymphoma biology: Beyond Burkitt lymphoma. *Blood Cells, Mol. Dis.* *45*, 317–323.
- Song, S., Gong, S., Singh, P., Lyu, J., and Bai, Y. (2017). The interaction between mitochondria and oncoviruses. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*
- Souto, G.R., Pereira, T.S., Castro, A.F., and Mesquita, R.A. (2013). Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified of the palate: A case report. *J. Clin. Exp. Dent.* *5*, e287–e290.
- Stauber, R.H., and Pavlakis, G.N. (1998). Intracellular trafficking and interactions of the HIV-1 Tat protein. *Virology* *252*, 126–136.
- Stebbing, J., Gazzard, B., Mandalia, S., Teague, A., Waterston, A., Marvin, V., Nelson, M., and Bower, M. (2004a). Antiretroviral Treatment Regimens and Immune Parameters in the Prevention of Systemic AIDS-Related Non-Hodgkin's Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* *22*, 2177–2183.
- Stebbing, J., Gazzard, B., Mandalia, S., Teague, A., Waterston, A., Marvin, V., Nelson, M., and Bower, M. (2004b). Antiretroviral treatment regimens and immune parameters in the prevention of systemic AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* *22*, 2177–2183.
- Storz, P. (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. *Front. Biosci.* *10*, 1881–1896.
- Stracker, T.H. (2017). Chaperoning the DNA damage response. *FEBS J.* *284*, 2375–2377.
- Stracker, T.H., and Petrini, J.H.J. (2011). The MRE11 complex: starting from the ends. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 90–103.
- Strange, R.C., Spiteri, M.A., Ramachandran, S., and Fryer, A.A. (2001). Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* *482*, 21–26.
- Sudhakar, a (2010). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods Akulapalli. *J Cancer Sci Ther.* *1*, 1–4.
- Sundaresan, M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Sulciner, D.J., Gutkind, J.S., Irani, K., Goldschmidt-Clermont, P.J., and Finkel, T. (1996). Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem. J.* *318* (Pt 2), 379–382.
- Suresh, D.R., Annam, V., Pratibha, K., and Prasad, B.V.M. (2009). Total antioxidant capacity--a novel early biochemical marker of oxidative stress in HIV infected individuals. *J. Biomed. Sci.* *16*, 61.
- Szatrowski, T.P., and Nathan, C.F. (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* *51*, 794–798.
- Täger, M., Ittenson, A., Franke, A., Frey, A., Gassen, H.G., and Ansorge, S. (1995). gamma-Glutamyl transpeptidase-cellular expression in populations of normal human mononuclear cells and patients suffering from leukemias. *Ann. Hematol.* *70*, 237–242.

- Takamatsu, S., Galal, A.M., Ross, S.A., Ferreira, D., ElSohly, M.A., Ibrahim, A.R.S., and El-Feraly, F.S. (2003). Antioxidant effect of flavonoids on DCF production in HL-60 cells. *Phyther. Res.* *17*, 963–966.
- Tanaka, T., Huang, X., Halicka, H.D., Zhao, H., Traganos, F., Albino, A.P., Dai, W., and Darzynkiewicz, Z. (2007). Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. *Cytom. Part A* *71*, 648–661.
- Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S., and Leder, P. (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 7837–7841.
- Tew, K.D., Manevich, Y., Grek, C., Xiong, Y., Uys, J., and Townsend, D.M. (2011). The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer. *Free Radic. Biol. Med.* *51*, 299–313.
- Tew, K.D., Townsend, D.M., Therapeutics, E., Carolina, S., Sciences, B., and Carolina, S. (2015). To Detoxification. *43*, 179–193.
- Tian, C., Sun, L., Jia, B., Ma, K., Curthoys, N., Ding, J., and Zheng, J. (2012). Mitochondrial glutaminase release contributes to glutamate-mediated neurotoxicity during human immunodeficiency virus-1 infection. *J. Neuroimmune Pharmacol.* *7*, 619–628.
- Toledano, M.B., Ghosh, D., Trinh, F., and Leonard, W.J. (1993). N-terminal DNA-binding domains contribute to differential DNA-binding specificities of NF-kappa B p50 and p65. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 852–860.
- Tome, M.E., Johnson, D.B., Rimsza, L.M., Roberts, R.A., Grogan, T.M., Miller, T.P., Oberley, L.W., and Briehl, M.M. (2005). A redox signature score identifies diffuse large B-cell lymphoma patients with a poor prognosis. *Blood* *106*, 3594–3601.
- Tomlins, S. a, Tomlins, S. a, Laxman, B., Laxman, B., Dhanasekaran, S.M., Dhanasekaran, S.M., Helgeson, B.E., Helgeson, B.E., Cao, X., Cao, X., et al. (2007). Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature* *448*, 595–599.
- Torres, M.A., Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* *141*, 373–378.
- Townsend, D.M., and Tew, K.D. (2003). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* *22*, 7369–7375.
- Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J., and Hiai, H. (1995). Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.* *358*, 1–3.
- Trachootham, D., Zhang, H., Zhang, W., Feng, L., Du, M., Zhou, Y., Chen, Z., Pelicano, H., Plunkett, W., Wierda, W.G., et al. (2008). Effective elimination of fludarabine-resistant CLL cells by PEITC through a redox-mediated mechanism. *Blood* *112*, 1912–1922.
- Tsfasman, T.M., Klibi, M., Pichugin, A.M., Lipinski, M., and Vassetzky, Y.S. (2012). HIV: Implication in Burkitt lymphoma. *Biopolym. Cell* *28*, 285–287.
- Tubbs, A., and Nussenzweig, A. (2017). Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell* *168*, 644–656.
- Tyagi, M., Rusnati, M., Presta, M., and Giacca, M. (2001). Internalization of HIV-1 Tat Requires Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. *J. Biol. Chem.* *276*, 3254–3261.
- Umeno, A., Biju, V., and Yoshida, Y. (2017). *In vivo* ROS production and use of oxidative stress-derived biomarkers to detect the onset of diseases such as Alzheimer’s disease, Parkinson’s disease, and diabetes. *Free Radic. Res.* *0*, 1–41.
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., and Shiloh, Y. (2003). Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J.* *22*, 5612–5621.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., and Telsler, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* *266*, 37–56.
- Vendeville, A., Rayne, F., Bonhoure, A., Bettache, N., Montcourrier, P., and Beaumelle, B. (2004). HIV-1 Tat enters T cells using coated pits before translocating from acidified endosomes and eliciting biological responses. *Mol. Biol. Cell* *15*, 2347–2360.
- Vene, R., Delfino, L., Castellani, P., Balza, E., Bertolotti, M., Sitia, R., and Rubartelli, A. (2010). Redox

- remodeling allows and controls B-cell activation and differentiation. *Antioxid Redox Signal* 13, 1145–1155.
- Viglianti, G.A., and Mullins, J.I. (1988). Functional comparison of transactivation by simian immunodeficiency virus from rhesus macaques and human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 62, 4523–4532.
- Vilhardt, F., Plastre, O., Sawada, M., Suzuki, K., Wiznerowicz, M., Kiyokawa, E., Trono, D., and Krause, K.H. (2002). The HIV-1 Nef protein and phagocyte NADPH oxidase activation. *J. Biol. Chem.* 277, 42136–42143.
- Vose, J.M. (1998). Current approaches to the management of non-Hodgkin's lymphoma. *Semin.Oncol.* 25, 483–491.
- Wang, C., Li, P., Xuan, J., Zhu, C., Liu, J., Shan, L., Du, Q., Ren, Y., and Ye, J. (2017). Cholesterol Enhances Colorectal Cancer Progression via ROS Elevation and MAPK Signaling Pathway Activation. *Cell. Physiol. Biochem.* 42, 729–742.
- Wang, J., Lin, D., Peng, H., Huang, Y., Huang, J., and Gu, J. (2013). Cancer-derived immunoglobulin G promotes tumor cell growth and proliferation through inducing production of reactive oxygen species. *Cell Death Dis.* 4, e945.
- Wang, J.H., Gostissa, M., Yan, C.T., Goff, P., Hickernell, T., Hansen, E., Difilippantonio, S., Wesemann, D.R., Zarrin, A.A., Rajewsky, K., et al. (2009). Mechanisms promoting translocations in editing and switching peripheral B cells. *Nature* 460, 231–236.
- Wang, T., Zhang, X., and Li, J.J. (2002). The role of NF- $\kappa$ B in the regulation of cell stress responses. *Int. Immunopharmacol.* 2, 1509–1520.
- Watanabe, L.M., Barbosa Júnior, F., Jordão, A.A., and Navarro, A.M. (2016). Influence of HIV infection and the use of antiretroviral therapy on selenium and selenomethionine concentrations and antioxidant protection. *Nutrition* 32, 1238–1242.
- Weber, J. (2001). The pathogenesis of HIV-1 infection. *Br. Med. Bull.* 58, 61–72.
- Wells, P.G., McCallum, G.P., Lam, K.C.H., Henderson, J.T., and Ondovcik, S.L. (2010). Oxidative DNA damage and repair in teratogenesis and neurodevelopmental deficits. *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.* 90, 103–109.
- Weng, S.W., Hsu, S.C., Liu, H.C., Ji, B.C., Lien, J.C., Yu, F.S., Liu, K.C., Lai, K.C., Lin, J.P., and Chung, J.G. (2015). Gallic acid induces DNA damage and inhibits DNA repair-associated protein expression in human oral cancer SCC-4 cells. *Anticancer Res* 35, 2077–2084.
- Westendorp, M.O., Shatrov, V.A., Schulze-Osthoff, K., Frank, R., Kraft, M., Los, M., Krammer, P.H., Dröge, W., and Lehmann, V. (1995). HIV-1 Tat potentiates TNF-induced NF-kappa B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state. *EMBO J.* 14, 546–554.
- Wheeler, M.L., and Defranco, A.L. (2012). Prolonged production of reactive oxygen species in response to B cell receptor stimulation promotes B cell activation and proliferation. *J. Immunol.* 189, 4405–4416.
- Wilén, C.B., Tilton, J.C., and Doms, R.W. (2012). HIV: Cell Binding and Entry. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006866–a006866.
- Woolley, J.F., Stanicka, J., and Cotter, T.G. (2013). Recent advances in reactive oxygen species measurement in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* 38, 556–565.
- Xia, C., Hu, J., Ketterer, B., and Taylor, J.B. (1996). The organization of the human GSTP1-1 gene promoter and its response to retinoic acid and cellular redox status. *Biochem. J.* 313 (Pt 1), 155–161.
- Xia, Y., Shen, S., and Verma, I.M. (2014). NF- $\kappa$ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol. Res.* 2, 823–830.
- Yang, S.-T., Kreutzberger, A.J.B., Kiessling, V., Ganser-Pornillos, B.K., White, J.M., and Tamm, L.K. (2017). HIV virions sense plasma membrane heterogeneity for cell entry. *Sci. Adv.* 3, e1700338.
- Yang, Y., Karakhanova, S., Hartwig, W., D'Haese, J.G., Philippov, P.P., Werner, J., and Bazhin, A. V. (2016). Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. *J. Cell. Physiol.* 231, 2570–2581.
- Yasui, M., Kanemaru, Y., Kamoshita, N., Suzuki, T., Arakawa, T., and Honma, M. (2014). Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome. *DNA Repair (Amst).* 15, 11–20.
- Zhao, M., and Weissleder, R. (2004). Intracellular Cargo Delivery Using Tat Peptide and Derivatives. *Med. Res.*

Rev. 24, 1–12.

- Zhou, B.B., and Elledge, S.J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433–439.
- Zhou, K., Xu, D., Cao, Y., Wang, J., Yang, Y., and Huang, M. (2014a). C-MYC aberrations as prognostic factors in diffuse large B-cell lymphoma: a meta-analysis of epidemiological studies. *PLoS One* 9, e95020.
- Zhou, K., Xu, D., Cao, Y., Wang, J., Yang, Y., and Huang, M. (2014b). C-MYC aberrations as prognostic factors in diffuse large b-cell lymphoma: A meta-analysis of epidemiological studies. *PLoS One* 9.
- Ziegler, J., and Facchini, P.J. (2008). Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 735–769.
- Zitka, O., Skalickova, S., Gumulec, J., Masarik, M., Adam, V., Hubalek, J., Trnkova, L., Kruseova, J., Eckschlager, T., and Kizek, R. (2012). Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol. Lett.* 4, 1247–1253.
- Zuo, L., Zhou, T., Pannell, B.K., Ziegler, A.C., and Best, T.M. (2015). Biological and physiological role of reactive oxygen species - the good, the bad and the ugly. *Acta Physiol.* 214, 329–348.

**Titre :** Effets des protéines virales sur l'organisation nucléaire des lymphocytes B du sang périphérique humain

**Mots clés :** VIH-1, Tat, stress oxydant, mitochondrie, dommages à l'ADN, lymphomes B

**Résumé :** L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est associée à la survenue de lymphomes B chez des patients infectés et l'incidence de certains lymphomes reste élevée même chez les individus infectés dont la fonction immunitaire est reconstituée sous traitement antirétroviral combiné. La contribution du VIH-1 à l'oncogenèse des cellules B reste donc énigmatique. Le VIH-1 induit un stress oxydant et des dommages à l'ADN (DA) dans les cellules infectées via de multiples mécanismes. Cependant il n'infecte pas les lymphocytes B. En revanche, la protéine virale Tat qui circule dans le sang des individus infectés est capable de pénétrer spontanément dans des cellules non infectables par VIH. Nous avons détecté des niveaux élevés d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), principalement mitochondriales, et des DA dans les cellules B d'individus infectés par le VIH. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que Tat pourrait induire des DA oxydants dans les cellules B et favoriser ainsi l'instabilité génétique et la transformation maligne de ces cellules.

Dans des cellules B isolées à partir du sang périphérique de donneurs sains et incubées en présence de protéine Tat recombinante, un stress oxydant a été induit, la capacité antioxydante a diminué avec la diminution de taux du glutathion, le facteur de transcription NF- $\kappa$ B a été activé, et sont apparus des DA accompagnés d'aberrations chromosomiques. En outre, tous les effets induits par Tat dépendaient de son activité transcriptionnelle.

Dans le but de mieux comprendre le(s) mécanisme(s) d'action de Tat chez les patients séropositifs, des extraits bruts de plantes endémiques du Liban ont été utilisés pour leur potentiel antioxydant. L'effet pro-oxydant de Tat a été contrecarré, le stress oxydant inhibé ainsi que les DA induits par la protéine virale. En conclusion, nous proposons que les dommages oxydants causés à l'ADN et les aberrations chromosomiques induites par Tat correspondent à de nouveaux facteurs oncogéniques favorisant le développement de lymphomes B chez les individus infectés par le VIH-1.

**Title:** Effects of viral proteins on the nuclear organization of human peripheral blood B-cells

**Keywords:** HIV-1, Tat, oxidative stress, mitochondria, DNA damage, B-cell lymphomas

**Abstract:** An infection with the Human immunodeficiency virus (HIV) is associated with B-cell lymphomas in infected patients. The incidence of some lymphomas remains elevated in HIV-infected individuals whose immune function has been reconstituted under combined antiretroviral therapy. Its contribution to B-cell oncogenesis cells remains enigmatic. HIV-1 is known to induce an oxidative stress and DNA damage (DD) in infected cells via multiple mechanisms. However, it does not infect B lymphocytes. This contrasts with the viral transactivator protein Tat which circulates in the blood of infected individuals and spontaneously penetrates even non infectable cells. We have detected high levels of reactive oxygen species (ROS), mainly from mitochondria, and DDs in B-cells of HIV-infected individuals. We have thus hypothesized that Tat could induce oxidative DD in B-cells thereby promoting genetic instability and malignant transformation in these cells.

In B-cells isolated from peripheral blood of healthy donors and incubated in the presence of purified recombinant protein Tat, an oxidative stress has been induced, the antioxidant capacity was decreased due to diminished glutathione levels, the transcription factor NF- $\kappa$ B was activated, and DD and chromosomal aberrations induced. All the effects induced by Tat were shown to depend on its transcriptional activity. To better understand the mechanism(s) of action of this viral protein, crude extracts from endemic plants of Lebanon were tested for their antioxidant potential. The pro-oxidative effect of Tat was inhibited, as well as the DD and chromosomal aberrations induced by the viral protein. In conclusion, we propose that the oxidative DNA damage and chromosomal aberrations induced by the Tat protein correspond to novel oncogenic factors that favor the development of B-cell lymphomas in HIV-1 infected individuals.

