



HAL
open science

Rôle de la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale humaine dans la réplication du VIH-1

Lydia Kobbi

► **To cite this version:**

Lydia Kobbi. Rôle de la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale humaine dans la réplication du VIH-1. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT: 2011PA114827. tel-00684390

HAL Id: tel-00684390

<https://theses.hal.science/tel-00684390>

Submitted on 2 Apr 2012

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.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ
PÔLE : INGENIERIE DES PROTEINES ET CIBLES THERAPEUTIQUES

DISCIPLINE : Sciences

ANNÉE 2011 - 2012

SÉRIE DOCTORAT

THÈSE DE DOCTORAT soutenu le 07/11/2011

par

Lydia KOBBI

Rôle de la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale
humaine dans la réplication du VIH-1.

Directeur de thèse :

Marc MIRANDE

DR-CNRS (Gif-sur-Yvette)

Composition du jury :

Président du jury :

Herman VAN THILBEURGH

PR-UPS (Orsay)

Rapporteurs :

Carine TISNE

DR-CNRS (Paris)

Roland MARQUET

DR-CNRS (Strasbourg)

Examineurs :

Marylène MOUGEL

DR-CNRS (Montpellier)

A ma grand-mère Mamas

A mes parents Ferroudja et Mohamed

Remerciements

Je remercie sincèrement le Dr Carine TISNE et le Dr Roland MARQUET de m'avoir fait l'honneur et pris le temps de juger le manuscrit de ce travail de thèse. Vos remarques et suggestions auront contribué à améliorer la qualité de ce dernier. Je remercie également le Dr Marylène MOUGEL d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse. Enfin, je remercie tout particulièrement le Pr Herman VAN THILBEURGH pour avoir accepté de présider le jury et pour sa gentillesse lors de nos entretiens annuels.

Je remercie vivement le Dr Jacqueline CHERFILS de m'avoir accueillie au LEBS durant ces trois années de thèse. Je la remercie également pour son implication dans le suivi annuel de tous les étudiants de son laboratoire.

C'est avec beaucoup de reconnaissance que je souhaite remercier mon directeur de thèse le Dr Marc MIRANDE, pour la formation scientifique de qualité qu'il m'a donné. Sa grande rigueur scientifique et sa passion pour les synthétases m'ont beaucoup appris. Je voudrais aussi le remercier pour le temps qu'il m'a accordé tout au long de ces années, pour sa présence et sa modestie. Merci de m'avoir guidée et conseillée, je pars avec un bagage scientifique très enrichi.

Je remercie très chaleureusement l'ensemble de mon équipe. Je commence par Martine parce que c'est elle qui a le plus supporté ma présence durant ces trois années, vraiment merci pour tout ce que tu as fait pour moi tant au labo qu'à l'extérieur ! C'est beaucoup, j'espère sincèrement qu'on restera en contact. Les post-doc Guillaume (guigui) et José (l'indien). Votre présence dans l'équipe au début de ma thèse était pour moi d'un grand réconfort merci pour votre aide précieuse et pour toutes les anneries que vous m'avez appris surtout toi l'indien ☺. A ton tour Svéta (ou lana, ça dépend des labo où tu te trouvais mais j'ai le mérite d'avoir été la seule à pouvoir prononcer Svítlana correctement et sans accent), merci pour ta gentillesse et surtout de m'avoir aidé à maîtriser les Macs grâce à tes doigts de fée. A l'arrivée de nos stagiaires M2 Azaria et Aurélien, l'équipe a pris une autre tournure et surtout pour moi depuis le début j'étais la plus jeune de l'équipe, la dernière arrivée mais avec vous ça a bien changé j'étais enfin la plus vieille des étudiantes j'étais vraiment comblée à ce moment là et on a bien rigolé ensemble ;) sans oublier Ricardo, Amadou, Antoine et Tania.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe 06. Amira (Mirou), Merci pour tout, tes conseils, ta joie de vivre, les fous rires qu'on a eu ensemble et tout les moments mémorables que nous avons partagé. Une vraie amitié est née et je t'adore ♥. Kaheina ma compatriote, tu es un exemple de pureté d'esprit, Audrey, Marcia, Isaline, les filles merci de m'avoir incluses dans votre clan ! Je n'oublierais jamais nos sorties à travers la France et toutes les fois où nous avions pris un verre nocturne tardif. Valérie. C, merci pour ta bonne humeur, tu es la meilleure !! Dominique (Hassan), merci pour nos longs débats et conversations dans le RER et pour le mouhahahahahahaha. Je termine par Aline et Philippe (Fliflou) de l'équipe 010, votre arrivée à l'étage a boosté l'ambiance et a apporté une bouffée d'oxygène.

Je remercie mes autres collègues du laboratoire, Jocelyne, merci pour tout surtout pour la fin, je te souhaite une bonne retraite. Tracy, Corine merci pour toutes les fois où je vous ai embêté avec mon PEG4000 70% et pour tout le reste. Un grand merci à Pascal pour ses blagues.

Je remercie l'ensemble des étudiants du LEBS, tout spécialement Chafika (Kika), tu as été pour moi la grande sœur que j'ai toujours rêvé d'avoir. Ton absence au labo a été pesante mais je suis très contente pour le petit bout de chou. Je remercie chaleureusement dans l'ordre des équipes : Jozsef, Andréa, Lionel, Jérémie, Manu, Carla, Goran, Amandine, Moutsé, Samantha, Laura, Yannik, Armelle, Olivier, Samira, Jakub, Joaquin et Sarah. Merci pour nos pots étudiants et pour toutes les fois où nous avons fait le chemin Paris-Gif, Gif-Paris ensemble. Je cite aussi mes compatriotes algériens des autres labo de Gif et d'Orsay : Mounir, Abder et Mehdi.

Je remercie très chaleureusement Daniel KERN qui a permis mon inscription en master à l'université de Strasbourg et pour l'effort qu'il a fourni pour caser ses étudiants en thèse. Je tiens également à remercier infiniment Philippe DUMAS et Dominique BURNOUF pour leur encadrement ainsi que toute l'équipe de cristallographie et l'ensemble des équipes du 4ème étage de l'IBMC et plus particulièrement Pascale ROMBY, Serena BERNACCHI, Jean-Christophe PAILLARD et Gaëlle MERCENNE pour leur aide précieuse.

Je remercie également le Dr Fadila AMRANI de l'USTHB pour son encadrement et sa sympathie ainsi que le Pr Fatima Zahra ARJOUN, première femme algérienne et arabe à occuper le poste de général des armées qui m'a accueillies dans son service pour mon stage de fin d'étude à l'hôpital central de l'armée. Ça a été un grand honneur pour moi d'être formée par ces deux femmes qui sont un très bel exemple de l'émancipation de la femme algérienne, arabe et africaine.

Je remercie chaleureusement mes amies de toujours, « The team », « les desperate housewives ». Je commence par Yasmine (ma yaya), tu as été pour moi « le service après vente » accrochée au tél tous les jours pendant 3 ans c'est un record ! Zineb (ma zinette), nous avons beaucoup partagé ces dernières années de bons et moins bons moments merci d'avoir été là pour moi coloc. Nissa (ninahhh) et Sarah (Sar), je vous ai moins vu ces dernières années mais mon affection pour vous est intacte. Je fini par Kahina (kakou) mon amie d'enfance plus de 20 ans ma grande ! Je remercie également tous mes amis algérois, strasbourgeois, tunisiens et parisiens ainsi que Pierre pour les moments magiques que nous avons passé ensemble.

Je remercie toute ma famille en Algérie et en France, merci à Nazim d'avoir pris la relève au près des parents après mon départ, je t'aime mon petit frère. Merci à mes deux tantes chéries Karima et Saliba et mon oncle Mohand pour leur soutien tout au long de ces 5 années passées en France loin des miens. Une mention spéciale pour mon petit bout de chou Naél mouah.

Je remercie du plus profond de mon âme ma grand-mère qui a toujours pensé à moi avant même de penser à elle. Mes parents chéris, ces deux personnes qui se sont donnés corps et âme pour m'offrir une éducation hors pair. Sans eux je ne serais pas ce que je suis et tous les mots du monde ne pourront pas exprimer l'amour et la reconnaissance que je leur dois.

INTRODUCTION GENERALE.....	1
I. Le virus de l'immunodéficience humaine.....	1
A. Une nouvelle maladie : Le SIDA.....	1
1. La découverte du virus	1
2. Les origines simiennes du VIH et son évolution.....	2
3. Les modes de transmission.....	2
4. Les traitements antirétroviraux.....	3
5. Le SIDA aujourd'hui dans le monde et en France.....	4
B. Le virus VIH-1	5
1. La structure du VIH-1	5
a. Le génome viral	6
b. Les protéines de l'enveloppe.....	9
➤ La protéine gp120.....	9
➤ La protéine gp41	9
c. Les protéines de structure	10
➤ La protéine de la matrice	10
➤ La protéine de la capsid	10
➤ La nucléocapside	11
d. Les protéines enzymatiques.....	11
➤ La protéase.....	11
➤ La transcriptase inverse	12
➤ L'intégrase.....	13
e. Les protéines régulatrices et accessoires	14
➤ La protéine Tat.....	14
➤ La protéine Rev	15
➤ La protéine Vpr.....	16
➤ La protéine Nef.....	17
➤ La protéine Vif.....	18
➤ La protéine Vpu.....	18
2. Le cycle réplcatif du VIH-1	19
a. La phase précoce du cycle réplcatif du VIH-1	19
➤ L'attachement à la cellule hôte et l'entrée	19
➤ La décapsidation et transcription inverse du génome viral	22
➤ L'import vers le noyau	22
➤ L'intégration.....	23
b. La phase tardive du cycle réplcatif du VIH-1	23
➤ L'expression de l'ADN proviral et l'export des ARN transcrits	23
➤ La traduction des précurseurs	25
➤ L'assemblage des virions	26
➤ Le bourgeonnement	27
➤ La maturation.....	28
3. La transcription inverse de l'ARN viral	28
a. Les étapes de la transcription inverse	29
➤ Le début de la transcription inverse et la synthèse de l'ADN sb "Strong-Stop" (-).....	29
➤ Le premier transfert de brin	29
➤ La synthèse du brin d'ADN (-)	31
➤ La synthèse du brin d'ADN (+) et second transfert de brin	31
➤ La synthèse des deux brins d'ADN et terminaison de la transcription inverse	32
b. L'initiation de la transcription inverse	32
➤ Les modalités de l'initiation de la transcription inverse	32
➤ Les exemples d'ARNt servant d'amorce à l'initiation de la transcription inverse.....	33
c. L'ARNt ^{Lys} et son encapsidation dans le VIH-1.....	33
➤ L'assemblage et la concentration des ARNt ^{Lys} dans le VIH-1	33
➤ Les mécanismes possibles d'encapsidation des ARNt ^{Lys}	35
➤ La Lysyl-ARNt synthétase, transporteur des ARNt ^{Lys}	35
II. Les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS).....	36
A. Généralités sur les aminoacyl-ARNt synthétases	36
1. La réaction d'aminocyclation	36
a. L'activation de l'acide aminé.....	36

b.	L'édition pré-transfert	38
c.	Le transfert de l'aminoacyl.....	38
d.	L'édition post transfert	38
2.	Les ARN de transfert.....	38
3.	L'organisation modulaire des aaRS et structure.....	41
4.	Les classes des aminoacyl-ARNt synthétases.....	43
a.	La classe I.....	44
b.	La classe II.....	44
B.	Formation de complexes multiprotéiques chez les eucaryotes	46
1.	Chez la levure : Le complexe Arc1p/MetRS/GluRS.....	46
2.	Chez les mammifères	47
a.	Le complexe multisynthétase MARS	48
b.	Le complexe VEGA "ValRS/EF1H "	49
C.	L'évolution et les rôles non canoniques des aaRS	51
1.	Les aaRS et la régulation de leur propre expression	51
a.	La ThrRS et la régulation au niveau de la traduction	52
b.	L'AlaRS et la régulation au niveau de la transcription	52
2.	Les LeuRS, TyrRS et leur implication dans l'épissage	52
3.	La TyrRS, et son activité cytokine	52
4.	La GluProRS et la formation du complexe GAIT.....	53
5.	Les protéines non catalytiques de MARS, rôles non canoniques.....	53
6.	La LysRS et la synthèse du diadénosine polyphosphates	54
III.	La Lysyl-ARNt synthétase et la réplication du VIH-1	55
A.	Généralités sur la Lysyl-ARNt synthétase (LysRS)	55
1.	La LysRS est de classe I ou de classe II.....	55
2.	La LysRS bactérienne	55
3.	La LysRS humaine	57
a.	La Fonction et la structure	57
b.	Les propriétés de l'extension N-terminale de la LysRS humaine.....	58
c.	Le motif de liaison de l'ARNt	58
4.	La Lysyl-ARNt synthétase mitochondriale humaine	60
B.	Rôle de la LysRS dans l'encapsidation de l'ARNt ₃ ^{Lys} dans les particules du VIH-1	62
1.	Le rôle du précurseur GagPol.....	62
2.	La source de LysRS encapsidé dans les particules virales.....	63
Chapitre I : Etude de l'association entre la LysRS mitochondriale humaine et le		
précurseur GagPol du VIH-1		
		67
I.	Description des protéines utilisées dans cette étude	67
A.	Les précurseurs Gag et GagPol.....	67
1.	Le décalage du cadre de lecture -1 et la traduction de GagPol	67
2.	L'encapsidation des précurseurs Gag et GagPol.....	68
B.	Les différentes LysRS et leurs domaines.....	70
C.	L'interaction entre cLysRS et p38 dans le complexe MARS	70
D.	Parenté structurale entre la LysRS et l'AspRS.....	72
II.	Etude du complexe d'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys}	72
A.	L'importance de la LysRS et l'espèce encapsidée dans les virions.....	72
B.	Gag n'est pas suffisant à l'encapsidation de l'ARNt ₃ ^{Lys}	74
III.	Analyse du complexe d'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys}	75
A.	L'approche du double hybride	75
1.	Description du système	76
2.	Nos résultats	77
3.	Les tests contrôles	77
B.	L'immunoprécipitation.....	78
C.	Les conclusions et perspectives	79
Article 1 : Association of Mitochondrial Lysyl-tRNA Synthetase with HIV-1 GagPol		
Involves Catalytic Domain of the Synthetase and Transframe and Integrase Domains of		
Pol.....		
		81

Chapitre II : Activation de la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale humaine après maturation de son précurseur prémitochondrial	97
I. Généralités sur la protéosynthèse chez l'homme.....	98
A. La synthèse protéique chez la mitochondrie est de type bactérien	98
1. Le génome mitochondrial.....	98
2. La synthèse protéique mitochondriale.....	98
3. L'origine endosymbiotique	99
4. Les aminoacyl-ARNt synthétases mitochondriales.....	99
B. La maturation de la pmLysRS humaine.....	99
C. Les autres activités potentielles de la LysRS mitochondriale.....	100
II. Activation de la LysRS lors de son import dans la mitochondrie	100
A. L'identification du site de maturation de la LysRS mitochondriale.....	101
B. La détermination de la séquence minimale de la pmLysRS permettant son import mitochondrial	101
1. Par microscopie confocale.....	101
2. Par complémentation dans les cellules de levure après sporulation.....	102
3. Conclusion.....	102
C. Caractérisation biochimique des deux formes de la LysRS mitochondriale	103
1. L'activité d'amination.....	103
2. La capacité d'interaction avec l'ARNt ^{Lys}	103
III. Rôle de la mLysRS dans l'encapsidation de l'ARNt^{Lys}	104
Article 2 : Activation of human mitochondrial lysyl-ARNt synthetase upon maturation of its premitochondrial precursor	107
Chapitre III: Analyse du rôle potentiel des protéines auxiliaires du VIH-1 dans l'association entre lysyl-ARNt synthétase et GagPol.....	137
I. Etude des interactions binaires entre les protéines auxiliaires du VIH-1 et la lysyl-ARNt synthétase humaine et ses domaines.	137
A. L'approche du double Hybride	138
1. Vérification de la localisation nucléaire des différentes protéines virales	138
2. Recherche des interactions par le double hybride	139
B. L'immunoprécipitation	140
C. Conclusion	140
II. Reconstitution <i>in vitro</i> du complexe d'encapsidation de l'ARNt.....	140
A. Expression des protéines.....	140
B. Vérification de l'interaction entre Pol et mLysRS.....	141
C. Implication de l'ARNt ^{Lys} sur la formation du complexe Pol-mLysRS.....	141
D. Implication de Rev et Vpr dans la formation du complexe d'encapsidation de GagPol:mLysRS:ARNt ^{Lys}	141
III. Conclusion générale	142
Article 3 : Interaction of HIV-1 Rev and Vpr with mitochondrial lysyl-tRNA synthetase does not impact its association with Pol.....	143
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	173
REFERENCES	181

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

I. Le virus de l'immunodéficience humaine

A. Une nouvelle maladie : Le SIDA

1. La découverte du virus

L'histoire commença en 1981 lorsque les premiers cas reconnus de syndrome d'immunodéficience acquise ont été décrits aux États-Unis par Gottlieb et collaborateurs. Il rapporte les premiers cas d'une immunodéficience sévère accompagnée d'une pneumonie due à *Pneumocystis Carinii* qui touche des jeunes hommes homosexuels (Gottlieb *et al*, 1981). À la fin de cette même année, on sait que cette maladie se transmet par voie sexuelle et sanguine. On sait également qu'elle ne touche pas seulement les homosexuels mais également des toxicomanes, des hémophiles et des hétérosexuels. À cette époque, le SIDA n'avait pas encore de nom, mais il était vite devenu évident que ces personnes présentaient un syndrome commun.

C'est en 1983, que la première description du virus à l'origine de cette immunodéficience est rendue publique, dans la revue Science. La découverte du virus a été réalisée à l'Institut Pasteur de Paris par l'équipe de Luc Montagnier. L'essentiel des travaux a été mené par Françoise Barré-Sinoussi. Le virus a été isolé à partir de lymphocytes ganglionnaires d'un patient atteint de lymphoadénopathie; on lui donna le nom de LAV "Lymphadenopathy Associated Virus" (Barre-Sinoussi *et al*, 1983). La même année, une équipe américaine dirigée par Robert Gallo du "*National Cancer Institute*" isole un virus qu'ils appelèrent HTLV-III " Human T-cell Lymphotropic Virus Type III" et qui s'avère être identique au LAV (Gallo *et al*, 1984).

Une dénomination commune au virus ne sera donnée qu'en 1986: HIV pour "Human Immunodeficiency Virus" en désignation anglaise. Au courant de cette année, le Pr Montagnier identifie un deuxième VIH isolé à partir de sujets originaires d'Afrique de l'ouest. Il fut appelé VIH-2 et le premier découvert est alors nommé le VIH-1.

2. Les origines simiennes du VIH et son évolution

Le clonage du génome du VIH (Alizon *et al*, 1984) en 1984 et son séquençage (Wain-Hobson *et al*, 1985) en 1985 prouvent définitivement qu'il appartient à la famille des rétrovirus, et plus précisément à la classe des lentivirus. Il est génétiquement très proche du SIV (Simian Immunodeficiency Virus) qui infecte des primates d'Afrique.

Des études par alignement de séquences génomiques ont permis d'établir un arbre phylogénétique des lentivirus de primates (Figure 1). La grande question qui se pose est quelle est exactement l'espèce de primate qui est à l'origine du passage de ce virus à l'homme. D'après les analyses phylogénétiques, la première observation fût que les VIH-1 et VIH-2 ont une distance phylogénétique importante. Ils sont clairement plus proches d'autres lentivirus retrouvés chez différents primates qu'ils ne le sont l'un l'autre. Le VIH-1 semble être proche de SIV-cpz (SIV du chimpanzé) (Gao *et al*, 1999), tandis que le VIH-2 est proche du SIVsm/SIVmac (SIV de sooty mangabey/SIV du macaque) (Santiago *et al*, 2005). De plus, ces deux types de VIH ont chacun une origine géographique différente. Le VIH-1 est originaire de l'Ouganda, le Burundi et le Rwanda, et le VIH-2 de l'Afrique occidentale.

Le VIH-1 est divisé en quatre groupes: le groupe M (Major), le groupe O (Outlier), le groupe N (non-M, non O), et le groupe P, dernier identifié en 2009. Ce sont les VIH-1 de sous type M qui sont responsables de la pandémie mondiale du SIDA, il en existe 9 sous-types caractérisés et plus de 43 formes recombinantes entre ces sous-types ont été identifiées, dont certaines très récemment. Ces sous-types sont retrouvés dans les populations d'Afrique, d'Europe, d'Amérique du Nord et d'Australie. Le VIH-2 est quant à lui responsable de cas de SIDA principalement en Afrique de l'ouest et est composé de sept sous-types.

3. Les modes de transmission

Le VIH infecte les lymphocytes T pour se répliquer et se multiplier. Il conduit à l'affaiblissement du système immunitaire de la personne infectée et au développement du SIDA. Ce virus est présent dans les liquides biologiques de l'organisme tels le sang, le sperme ou le liquide séminal d'un homme infecté. Chez une femme infectée, il est retrouvé dans les sécrétions vaginales ou le lait maternel.

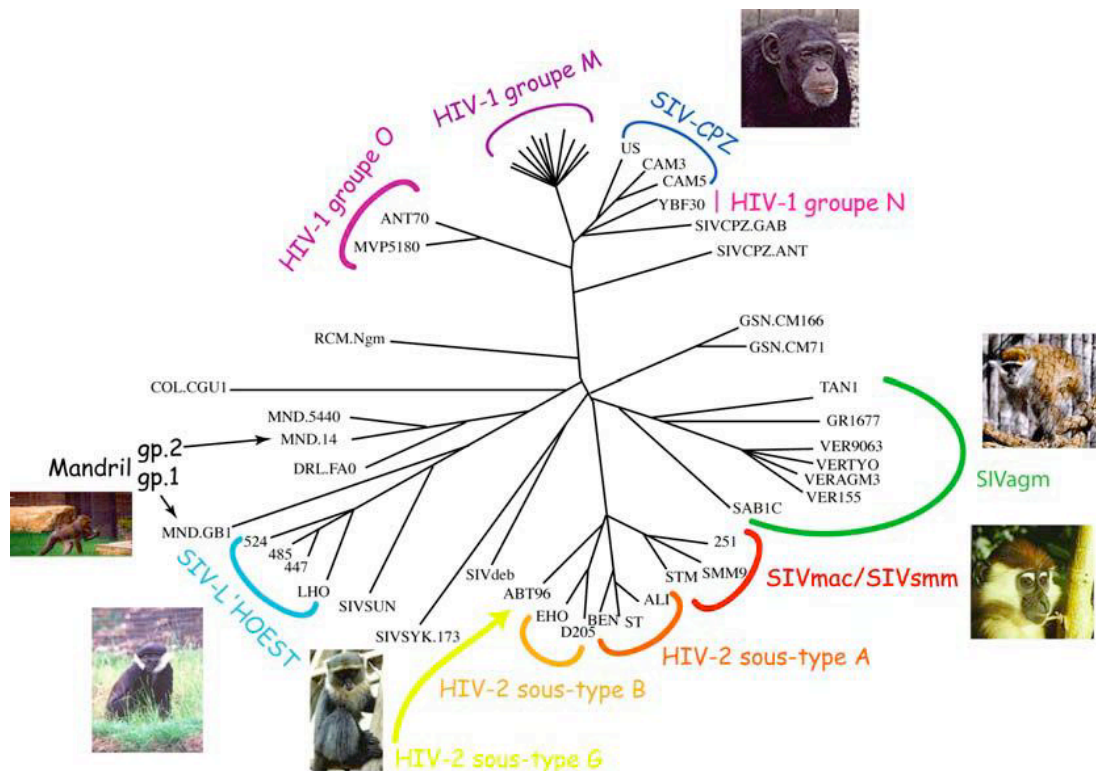


Figure 1. Arbre phylogénétique des lentivirus. L'arbre phylogénétique est établi selon des études de comparaison de séquences de virus de différentes espèces animales.

La première cause de contamination par le VIH est la transmission sexuelle (Quinn, 1989). Le virus peut également être transmis en utilisant des seringues contaminées lors d'une injection par voie intraveineuse chez les toxicomanes, ou accidentellement par transfusion sanguine dans les hôpitaux. La transmission de la mère à l'enfant est dite verticale, elle peut se produire à différents stades: *in utero*, lors de l'accouchement, ou pendant l'allaitement. Pour prévenir la contamination mère-enfant, il existe des traitements antiviraux qui sont administrés au cours du dernier trimestre de la grossesse et qui diminuent le taux de contamination de 25 à 10% (Royce *et al*, 1997).

4. Les traitements antirétroviraux

Dès la découverte de l'agent étiologique en 1983, les scientifiques du monde entier se sont mobilisés pour l'étude de ce virus. La première molécule antirétrovirale admise par la FDA "Food and Drug Administration" en 1987 est mise sur le marché. Il s'agit de l'AZT "Azidothymidine", c'est un inhibiteur de la transcriptase inverse du virus (Frick *et al*, 1988). L'administration d'un seul antirétroviral ou "monothérapie" montre vite ses limites dans le

traitement de la maladie. Ce n'est qu'en 1991 qu'une deuxième molécule est admise par la FDA, il s'agit du dideoxyinosine ou Videx. Tout comme l'AZT, c'est un inhibiteur nucléotidique de la transcriptase inverse.

La détermination de la structure tridimensionnelle de la protéase du VIH-1 a permis de donner naissance à une autre classe d'inhibiteurs antirétroviraux. Ce sont les inhibiteurs de la protéase. Ils ont été approuvés par la FDA en 1995 (Dorsey *et al*, 1994).

D'autres études sur le virus ont permis par la suite de découvrir les récepteurs du VIH sur les cellules infectées. Les CCR5 " Chemokine C-C motif Receptor 5" des lymphocytes T ont été isolés et démontrés comme nécessaires à l'entrée du virus dans la cellule (Deng *et al*, 1996). En 1996 également fût découvert le premier inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (Genin *et al*, 1996).

Ces découvertes successives ont amené l'ère des trithérapies. Elles représentent l'association de trois molécules. Deux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse et un inhibiteur de la protéase généralement. Ces trithérapies limitent durablement la multiplication du virus permettant la reconstitution partielle du système immunitaire pour réduire de ce fait les maladies opportunistes (Visier, 2005).

Un développement continu s'opère de 1998 à nos jours, de nouvelles molécules et de nouvelles classes thérapeutiques d'anti-rétroviraux sont identifiées, des inhibiteurs de fusion tel que le T20 (Burton, 2003), des inhibiteurs de l'intégrase comme le Raltegravir qui inhibe le transfert de brin, ou des antagonistes du co-récepteur CCR5 en 2007, le Maraviroc qui bloque l'entrée du virus via ces co-récepteurs.

5. Le SIDA aujourd'hui dans le monde et en France

D'après les données de l'ONU "Organisation des Nations Unies" en 2007, le pourcentage mondial des personnes vivant avec le VIH s'est stabilisé. Plus de 33 millions de personnes vivent avec le VIH (Figure 2).

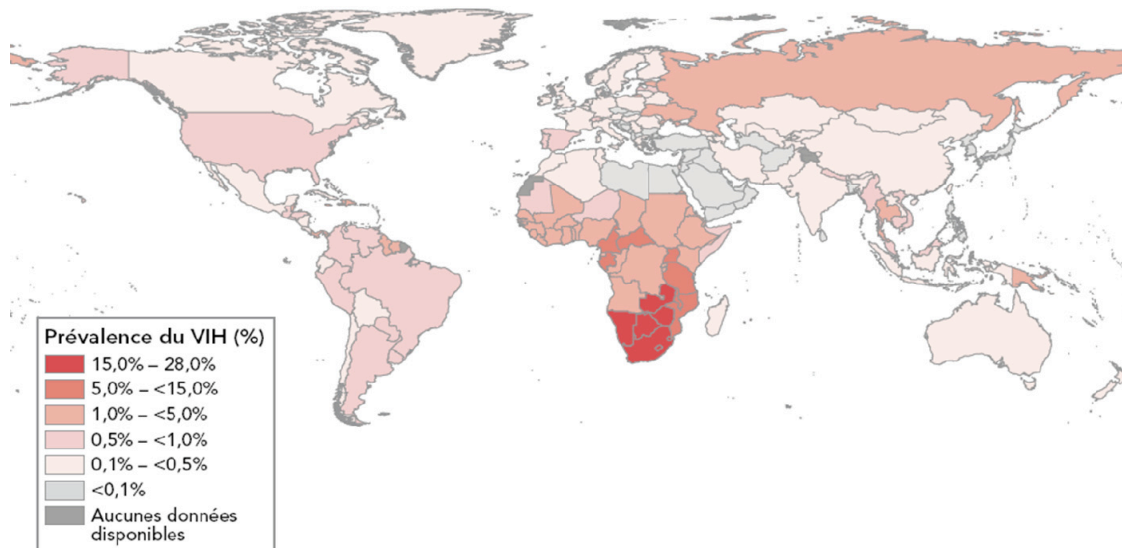


Figure 2. Distribution géographique du VIH-1 en 2007.

Les avancées, vers un accès universel aux traitements, aux soins et aux services d'assistance étaient un accomplissement significatif en 2009, étant donné les défis considérables. Plus de personnes dans le monde reçoivent les thérapies antivirales grâce à la consolidation mondiale pour des programmes VIH. En décembre 2009, plus de 5.2 millions de personnes des pays en voie de développement recevaient les thérapies antirétrovirales (World Health Organization): 37% en Afrique subsaharienne, 42% en Amérique centrale et Amérique du sud, 51% en Océanie, 48% dans les Caraïbes, 15 à 21% en Europe de l'est et l'Asie centrale. Ces chiffres représentent 30% de personnes en plus recevant le traitement que 12 mois plus tôt (Unaid).

En France, au 31 décembre 2007 plus de 120 000 personnes vivent avec le VIH. Le nombre de nouveaux cas de SIDA est de 1200 personnes infectées cette année-là. Le nombre de décès s'élève à 35 140 personnes cette même année. Les modes de contamination de personnes ayant découvert leur séropositivité cette année restent classiques (60% ont été contaminés par des rapports hétérosexuels, 38% lors de rapports homosexuels et 2% avec l'usage de drogues injectables).

B. Le virus VIH-1

1. La structure du VIH-1

Le virus infecte principalement les cellules lymphocytes T CD4+ du système immunitaire humain. Il cause leur destruction avec une demi-vie de moins de deux jours

(Perelson *et al*, 1996; Wei *et al*, 1998). Il infecte également les monocytes et macrophages. Pour mieux comprendre sa cytotoxicité, les recherches se sont basées entre autre sur les informations obtenues grâce à la résolution des structures cristallographiques de ses protéines.

Le virion mature se présente au microscope électronique sous forme d'une particule sphérique de 80 à 120 nm de diamètre (Figure 3). Le VIH-1 a les caractéristiques des lentivirus et présente des morphologies assez hétérogènes. Les virions infectieux montrent les caractéristiques suivantes: une enveloppe externe hérissée de spicules, elle entoure la matrice et la capsid. La capsid est aussi appelée "core" et donne la forme conique au virus. Dans la capsid se trouve d'une part le génome viral, composé de deux molécules d'ARN monocaténaire recouvertes et protégées par la protéine de nucléocapsid. Le génome viral est un ARN dont la transcription inverse est réalisée par une ADN polymérase ARN-dépendant, la transcriptase inverse. D'autre part, il y a également les protéines enzymatiques (la protéase virale et l'intégrase) mais aussi d'autres types de protéines: des protéines régulatrices (Rev et Tat) et des protéines auxiliaires (Vpu, Vif, Vpr et Nef) et quelques molécules d'origine cellulaire. Par convention, toutes les protéines virales (p) sont désignées avec un nombre correspondant à leur taille en kDa.

a. Le génome viral

Le génome du VIH-1 comprend deux molécules homologues d'ARN simple brin de polarité positive. Il a une taille de 9181 nucléotides. Il possède neuf cadres ouverts de lecture (Open Reading Frames, ORFs) et code pour 16 protéines virales (Figure 4). Trois d'entre eux codent pour les polyprotéines Gag, GagPol et Env spécifiant respectivement les protéines de structure, les enzymes et les protéines de l'enveloppe. Les six autres ORFs codent pour des protéines régulatrices Tat (*Transactivator of transcription*) et Rev (*Regulator of viral expression*) et des protéines accessoires Vpu (*Viral protein U*), Vif (*Viral infectivity factor*), Vpr (*Viral protein R*) et Nef (*Negatif factor*). Ces dernières protéines régissent la capacité du VIH-1 à infecter une cellule (McCune, 1991).

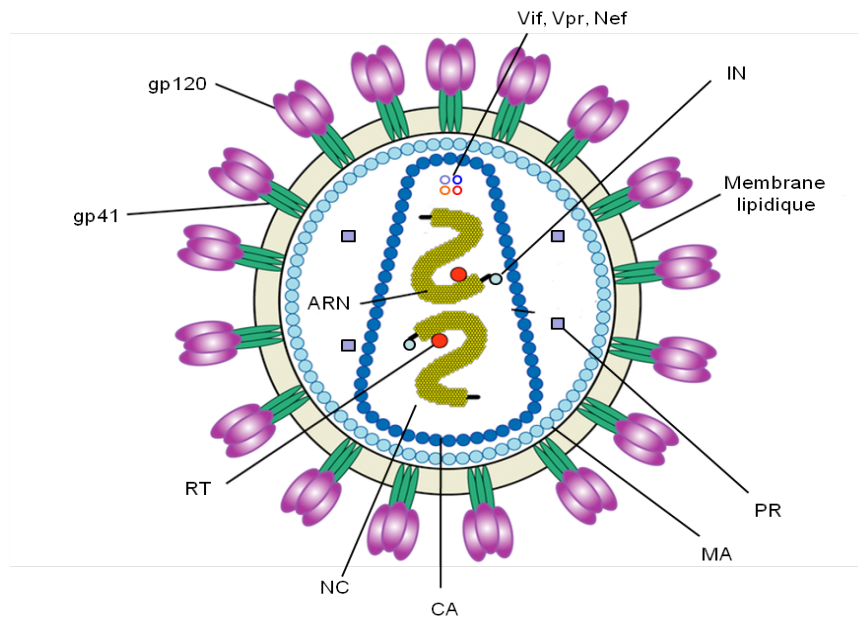


Figure 3. La structure du virus: Le virion mature est sous forme conique, il porte le génome ARN et les protéines auxiliaires.

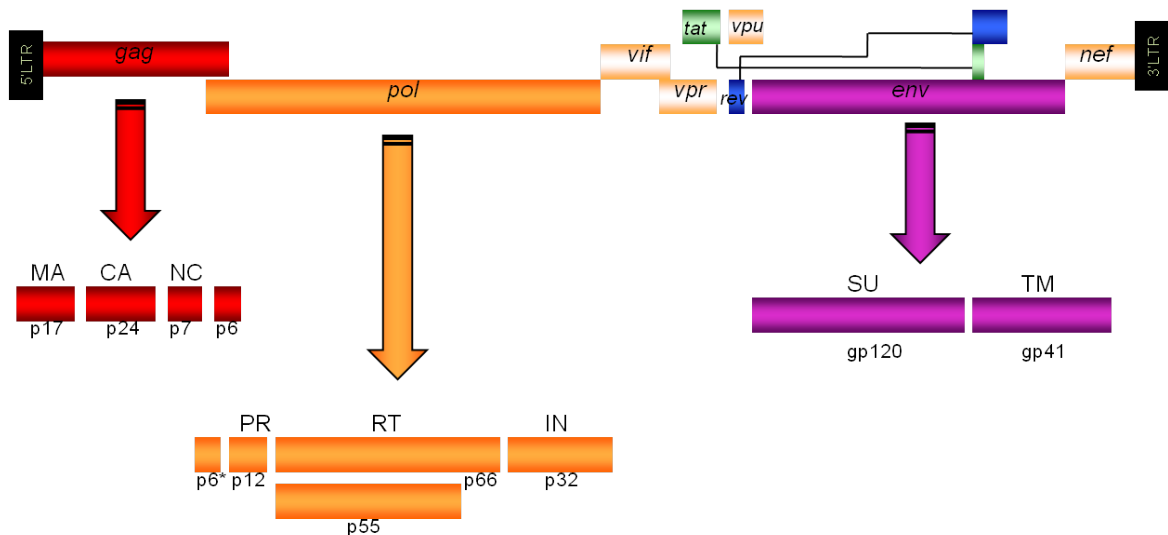


Figure 4. Génome du VIH-1: Le génome viral code pour trois polyprotéines Gag, GagPol et Env. Il code également pour les protéines régulatrices Tat, Rev et accessoires Nef, Vif, Vpu et Vpr.

La dimérisation de l'ARN est indispensable pour son encapsidation lors du bourgeonnement. Elle se fait d'une manière non covalente en 5' de l'ARN. Dans cette région 5'UTR de l'ARN viral se trouve aussi une tige boucle appelée Ψ , elle joue également un rôle important dans l'encapsidation du génome viral. Ψ et une région en aval riche en ribonucléotides AG sont également requises pour la dimérisation de l'ARN génomique (Russell *et al*, 2003). Le site de dimérisation est appelé DLS "Dimer Linkage Sequence", il est situé en aval du principal site donneur d'épissage "SD". Plus récemment, un autre site de dimérisation a été caractérisé, le DIS "Dimer Initiation Site", situé en amont de SD (Figure 5A) (Clever *et al*, 1996). La dimérisation de l'ARN viral est initiée par la formation d'un complexe transitoire de type boucle-boucle appelé "Kissing-loop complex". Il donnera un duplex plus stable de 22 paires de bases (Figure 5B) (Ennifar *et al*, 2001; Ennifar *et al*, 1999). Le kissing-loop complex a été pris comme cible antirétrovirale potentielle, des études ont démontré la liaison spécifique de certains aminoglycosides sur le DIS ce qui préviendrait la dimérisation de l'ARN viral et de ce fait son encapsidation dans de nouvelles particules virales (Ennifar *et al*, 2006).

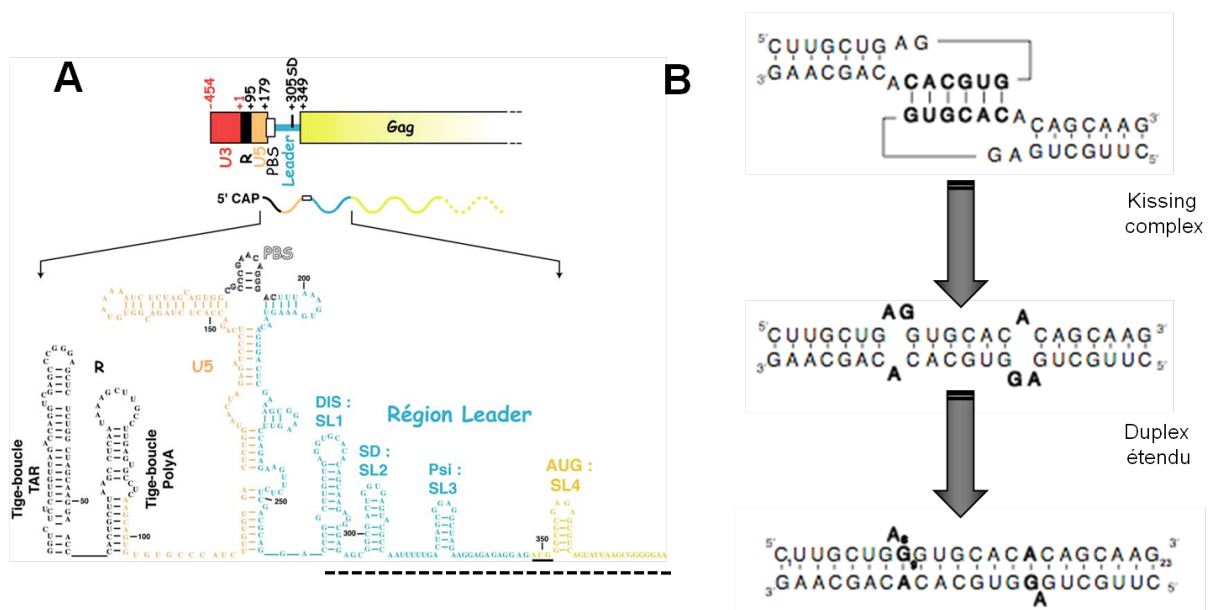


Figure 5. La région 5' UTR de l'ARN viral et l'initiation de la dimérisation de l'ARN viral : (A): La région 5' non traduite porte de nombreuses structures ayant chacune une fonction spécifique au cours du cycle viral. La région Leader soulignée par des pointillés porte quatre tiges boucles, la première tige boucle SL1 correspond au site d'initiation de la dimérisation de l'ARN viral. (B): La dimérisation est initiée par un contact boucle-boucle « kissing-loop complex » qui est rapidement converti en un duplex étendu de 22 paires de bases.

Les régions codantes de l'ADN proviral issu de la transcription inverse sont entourées par deux régions non codantes longues et répétées, elles sont identiques et appelées LTR "Long Terminal Repeat". Ces régions additionnelles contiennent plusieurs éléments génétiques permettant de réguler la transcription du génome viral. Elles sont composées de 3 régions U3 (Unique en 3'), R (Redondante) et U5 (Unique en 5').

D'une manière générale, le génome viral porte plusieurs motifs au niveau des LTR. Ils sont impliqués dans la régulation de sa réplication mais aussi dans la transcription et l'expression de ses gènes. Cette régulation nécessite l'intervention de facteurs cellulaires et de certaines protéines virales, conduisant à une forte ou faible production de particules du VIH-1. C'est le cas de la protéine Tat, qui se lie au motif retrouvé dans le LTR et va induire des modifications de la chromatine.

b. Les protéines de l'enveloppe

L'enveloppe est en grande partie d'origine cellulaire, elle est issue de la membrane plasmique de la cellule infectée et est formée lors du bourgeonnement des particules virales. L'enveloppe est constituée d'une double couche lipidique dans laquelle sont insérés 72 spicules. Chaque spicule est composé des protéines suivantes: la protéine de surface SU de 120 kDa (ou gp120) et la protéine transmembranaire TM de 41 kDa (ou gp 41). Elles sont issues du gène *Env* "enveloppe" après maturation. Ces deux protéines sont glycosylées et forment des trimères à la surface de la particule virale (Prabakaran *et al*, 2007).

➤ *La protéine gp120*

La structure tridimensionnelle de la protéine gp120 a été résolue. Elle montre que cette protéine interagit avec le récepteur CD4 du lymphocyte T et engage la pénétration du virus dans la cellule. Cette liaison est néanmoins insuffisante pour une infection optimale et requiert l'implication de corécepteurs CXCR4 et CCR5. La gp120 interagit aussi avec le récepteur de type lectinique exprimé par les cellules dendritiques et les macrophages.

➤ *La protéine gp41*

La protéine gp41 est composée de trois parties, un ectodomaine N-terminal, un domaine transmembranaire et un segment C-terminal intraviral, qui interagit avec la protéine de matrice. La structure tridimensionnelle de domaines correspondant à des portions de l'ectodomaine N-terminal est connue (Chan *et al*, 1997; Tan *et al*, 1997; Weissenhorn *et al*,

1997). Elle montre que cette protéine est principalement impliquée dans la pénétration de la capsid virale dans la cellule infectée grâce au peptide N-terminal qui est nécessaire à la fusion de l'enveloppe virale à la membrane cellulaire. Ce sont ces complexes qui reconnaissent les récepteurs des cellules à infecter et permettent la fusion des deux membranes.

c. Les protéines de structure

Les protéines de structure sont issues du clivage protéolytique du précurseur Pr55^{Gag} codé par le gène *Gag* ("Group-Specific Antigen"). Le précurseur est myristyllé puis clivé au cours de la maturation donnant ainsi les protéines structurales matures; la protéine de matrice MA de 17 kDa (ou p17), de capsid CA de 24 kDa (ou p24), de nucléocapsid NC de 7 kDa (ou p7) et les peptides p2 et p6.

➤ *La protéine de la matrice*

La protéine de matrice MA est de 17 kDa. Sa structure cristallographique a été déterminée (Hill *et al*, 1996), elle cristallise en monomère et en trimère. Elle possède un groupement myristate sur le résidu Gly en N-terminal lui permettant de se lier à la bicouche lipidique de l'enveloppe virale. Ces protéines tapissent la partie intérieure de l'enveloppe virale pour former la matrice par oligomérisation.

MA va intervenir à différentes étapes du cycle viral: elle facilite l'import du complexe de préintégration vers le noyau, elle participe à l'intégration et permet l'incorporation de la gp120 et de la gp41 dans l'enveloppe virale lors de l'assemblage des virions (Bukrinskaya, 2007).

➤ *La protéine de la capsid*

La protéine de capsid CA de 24 kDa (ou p24) est composée de deux domaines. Un domaine de dimérisation C-terminal (CTD) (Gamble *et al*, 1997) et un domaine N-terminal d'assemblage (NTD). Cette protéine forme des dimères et lors de l'oligomérisation donne une capsid ou "core" du virus, de forme conique, qui entoure un complexe ribonucléoprotéique (ARN génomique, la nucléocapsid et le reste des protéines virales).

La protéine de capsid intervient dans l'infectivité du virus et participe à la réplication. Elle participe aussi à l'assemblage des virions. En effet, elle se lie via son domaine NTD à une proline isomérase d'origine cellulaire, la Cyclophiline A (CypA) qui est encapsidée grâce à sa liaison à CA à raison de 200 copies de CypA par virion (Braaten *et al*, 1996). CypA est une chaperonne et aiderait à modifier la structure de la capsid et faciliterait l'étape de décapsidation.

➤ *La nucléocapsid*

La nucléocapsid de 7 kDa (ou p7) est une petite protéine basique, contenant deux motifs en doigts de zinc de type CCHH (Darlix *et al*, 2011). Elle a la capacité d'interagir avec les acides nucléiques grâce aux deux doigts de zinc participant ainsi à l'encapsidation de l'ARN viral. La nucléocapsid joue le rôle de reconnaissance et d'emballage de l'ARN viral (Aldovini & Young, 1990) en réunissant les deux brins d'ARN entre eux. Elle s'y fixe spécifiquement et forme ainsi la nucléocapsid. Elle peut aussi lier l'ARNt amorce (Tisné *et al*, 2001).

d. Les protéines enzymatiques

Les protéines enzymatiques sont issues du clivage du domaine *Pol* " Polymerase" du précurseur GagPol (Pr160^{GagPol}). En effet, la traduction de GagPol met en jeu un mécanisme de glissement du cadre de lecture de type -1 au niveau d'une séquence riche en uracile. C'est un phénomène rare, se produisant avec une fréquence inférieure à 10%. L'autocatalyse de la région pol va générer 4 protéines: la protéase (PR), l'intégrase (IN), la transcriptase inverse (*Reverse Transcriptase*, RT) et un peptide transframe TF ou p6*.

➤ *La protéase*

La protéase PR de 12 kDa (ou p12) est la première protéine virale à avoir été structuralement caractérisée (Navia *et al*, 1989). Par la suite, se sont des complexes avec des inhibiteurs qui ont été cristallisés dans le but d'aider au développement de ces inhibiteurs (Wlodawer & Erickson, 1993) (Figure 6).

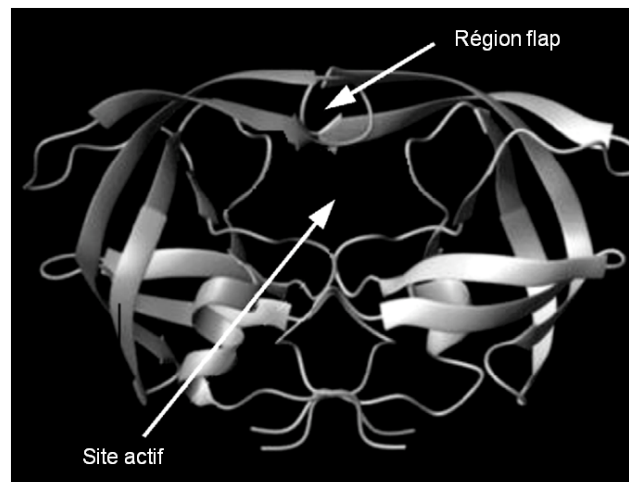


Figure 6. Structure cristallographique de la protéase: La protéase est un homodimère. Le site actif est localisé à l'interface des deux sous-unités, il est recouvert par une région flap (Navia *et al*, 1989).

La protéase est un homodimère symétrique, elle est structurellement similaire aux aspartyl protéases de la famille des pepsines. Le site actif de l'enzyme se trouve à l'interface des deux sous unités et contient la triade catalytique (Asp25-Thr26-Gly27) responsable des réactions de clivage protéolytique.

La protéase est l'une des enzymes clés du virus. En effet, elle est produite à partir du précurseur GagPol ($\text{Pr160}^{\text{GagPol}}$) par un phénomène d'autocatalyse. Une fois maturée dans les virions, elle va permettre à son tour de catalyser la maturation des pré-protéines pour donner ainsi les protéines de structure et les enzymes après l'étape de bourgeonnement des nouvelles particules virales. Elle participe de ce fait au changement de morphologie des virions et conduit à leur maturation et infectivité.

➤ *La transcriptase inverse*

La transcriptase inverse RT (ou p66/p51) est l'enzyme qui catalyse la synthèse de l'ADN proviral à partir du génome ARN. Cet enzyme est issu d'un clivage protéolytique du précurseur GagPol ($\text{Pr160}^{\text{GagPol}}$) après assemblage des nouveaux virions. La RT est produite initialement sous forme d'un homodimère de deux molécules de p66 et subit une étape supplémentaire de maturation formant ainsi la RT mature. Elle se présente sous forme d'un hétérodimère formé par les deux sous unités p66 et p51 (Figure 7). La sous unité p66 porte l'activité ADN polymérase capable d'incorporer les désoxyribonucléotides sur une molécule d'ADN ou d'ARN. Elle contient une grande partie analogue à celle du fragment de Klenow de

l'ADN polymérase I d'*E. coli* (Kohlstaedt *et al*, 1992). Elle porte également l'activité endonucléase ADN/ARN dépendante (RNase H) qui dégrade l'ARN dans les duplex ARN/ADN. La sous-unité p51 quant à elle résulte d'un clivage en C-terminal du domaine RNase H. Elle est catalytiquement inactive (Le Grice *et al*, 1991) mais elle interagit avec le domaine RNase H de l'hétérodimère, conférant ainsi une stabilité structurale à l'enzyme.

La RT est une polymérase lente, elle incorpore entre 1 à 100 nucléotides par seconde. Elle montre également une faible fidélité (10^{-4} erreurs par base incorporée) et est dépourvue d'une activité de correction d'erreurs. Elle génère une mutation par génome et par cycle de transcription inverse. Ceci confère au virus une grande variabilité génétique.



Figure 7. Structure cristallographique de la transcriptase inverse: La partie représentée en gris correspond à la sous-unité p55 tandis que la partie colorée représente la sous-unité p66. Sur cette figure est également représentée l'interaction de la RT à l'ARN amorce (en rose) et à l'ARN matrice (en bleu) (Kohlstaedt *et al*, 1992).

➤ *L'intégrase*

La protéine intégrase IN de 32 kDa (ou p32) est une protéine essentielle pour l'incorporation de l'ADN proviral dans l'ADN chromosomique de la cellule hôte. Cette protéine est constituée de trois domaines fonctionnels et structuraux bien distincts; un domaine N-terminal présentant un motif de type His-His-Cys-Cys et fixant le zinc pour

faciliter l'oligomérisation. Un domaine central catalytique dont le site actif appartient à la famille des polynucléotidyl-réductases et un domaine C-terminal de liaison à l'ADN (Van Wamel & Berkhout, 1998) (Figure 8). L'association de l'intégrase au coactivateur transcriptionnel LEDGF/p75 augmente l'activité d'intégration *in vitro*. Une unité fonctionnelle d'intégration comprend deux dimères asymétriques d'intégrase et deux molécules de LEDGF/p75. Au niveau de l'ADN, dans chaque dimère, une première molécule d'intégrase réalise la réaction catalytique tandis que la deuxième molécule positionne l'ADN viral dans le site actif du dimère opposé (Michel *et al*, 2009).

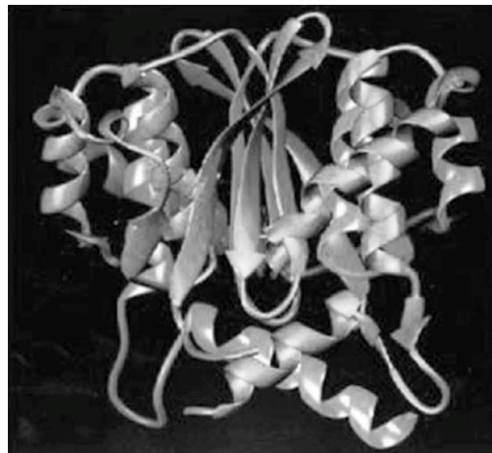


Figure 8. Structure cristallographique de l'intégrase: L'intégrase est un homodimère. La forme active de cet enzyme est un tétramère. C'est un dimère de l'homodimère. Chaque homodimère est constitué de deux sous-unités identiques avec un site catalytique localisé dans la région centrale (Van Maele & Debyser, 2005).

e. Les protéines régulatrices et accessoires

Les protéines régulatrices et accessoires du VIH-1 interviennent à différents niveaux du cycle réplcatif. Les protéines Tat et Rev ont un effet important dans l'expression du virus. Elles contrôlent l'expression du VIH-1 au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel respectivement. D'autres études ont montré que lorsqu'il y avait de petits changements dans l'expression de Vif, Vpr ou Vpu cela affectait l'infectivité et la réplication du virus (Bour & Strebel, 2000; Zhao *et al*, 2007).

➤ La protéine Tat

Tat est une petite protéine de 14 kDa (ou p14). Elle est appelée Tat car son rôle principal est la transactivation de la transcription du VIH-1. Elle est codée par deux exons.

L'exon 1 code pour les acides aminés 1 à 72 et l'exon 2 code pour les aa 73 à 86. Tat 66 (66 premiers aa) contient à elle seule les fonctions de transactivation (Kuppuswamy *et al*, 1989). Elle possède un segment basique (R49KKRRQRR57) lui permettant d'interagir avec l'élément agissant en cis, appelé TAR "*trans*-activation-responsive region" retrouvé dans la région R du LTR. Cette interaction, va induire des modifications de la chromatine au niveau du promoteur de l'ADN proviral. En effet, l'ADN proviral est intégré dans la chromatine cellulaire et recouvert par des nucléosomes. La transcription n'est rendue possible uniquement par un remodelage de la chromatine et le détachement des nucléosomes. Le remodelage des nucléosomes est initié par des événements cellulaires. Tat a la capacité d'interagir avec des protéines cellulaires et contribue à la transcription du génome viral. Elle recrute certains de ces facteurs comme SWI/SNF, p300/CREB-binding Protein (CBP), p300/CBP-associated factor (PCAF) et hGCN5 au niveau du promoteur. Elle se lie aussi au facteur positif d'élongation de la transcription b (P-TEFb) et à la TATA-binding protein (TBP), TFIIB, TFIIF et P-TEFb. Tat se lie au promoteur pour former le complexe de préinitiation actif qui va permettre d'activer l'initiation de la transcription (Gatignol, 2007).

➤ *La protéine Rev*

La protéine Rev (ou p19) est une petite protéine phosphorylée de 116 aa. Rev peut être divisée en deux domaines bien distincts; un domaine N-terminal contenant un motif riche en arginine (NRRRRW) (Malim *et al*, 1989a) qui sert à la fois de signal de localisation nucléaire (NLS), et de domaine de liaison de l'ARN (RBD). Ce domaine est flanqué par des séquences moins bien définies servant à la multimérisation de Rev. Le domaine C-terminal est riche en leucine. Il a été originalement considéré comme domaine activateur ou effecteur et contient un signal d'export nucléaire (NES) (Pavlakakis & Felber, 1990). Rev effectue la navette entre le noyau et le cytoplasme grâce à ses signaux de localisation et d'export nucléaire. Il représente un élément très important pour le transfert des ARNm viraux incomplètement épissés du noyau vers le cytoplasme où est réalisée l'étape de la traduction des protéines virales. Rev assure l'export et la stabilité de ces ARNm non épissés ou incomplètement épissés. La liaison de Rev à ces ARNm est hautement spécifique, Rev se lie à un élément *cis*-acting hautement structuré localisé dans un intron de l'ARNm Env (Daly *et al*, 1989; Malim *et al*, 1989b). Il est appelé motif RRE "Rev Responsive Element". Un premier monomère de Rev se lie avec une grande affinité au site RRE. Des molécules additionnelles de Rev vont par la suite s'y lier et se multimériser via une coopération entre des interactions protéine-protéine et ARN-protéine.

➤ *La protéine Vpr*

Vpr est une protéine accessoire d'un poids moléculaire de 12 kDa, produite aux derniers stades de l'infection virale. Vpr est hautement conservée chez le VIH, le SIV mais est absente dans d'autres lentivirus (Tristem *et al*, 1998). La structure tridimensionnelle de Vpr a été analysée par RMN. Vpr contient un domaine hélice α -tour-hélice α , retrouvé en N-terminal entre les résidus 17 à 46. Une longue hélice α est également retrouvée entre les résidus 53 à 78 en C-terminal (Schüler *et al*, 1999). Ces trois hélices α forment un cœur hydrophobe donnant à la protéine Vpr la possibilité de former de multiples interactions avec différentes protéines cellulaires (Morellet *et al*, 2003). Ces interactions permettent à Vpr d'agir comme un facteur pathogène.

Vpr intervient principalement à deux niveaux dans la cellule hôte. Elle participe au transport de l'ADN viral vers le noyau (Heinzinger *et al*, 1994), et cause l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (He *et al*, 1995). Vpr est aussi impliquée dans la mort cellulaire programmée (apoptose) (Stewart *et al*, 1997).

Transport nucléaire du complexe de préintégration

Dans les cellules infectées, l'ADN proviral double brin doit être transporté du cytoplasme vers le noyau où il sera intégré au génome cellulaire. Cette étape est réalisée via la formation d'un complexe de préintégration (PIC). Vpr est l'un des régulateurs de l'import nucléaire (Heinzinger *et al*, 1994). Une petite fraction de Vpr est phosphorylée. La phosphorylation de la Ser79 de Vpr est critique pour son activité lors de l'importation nucléaire.

Induction de l'arrêt du cycle cellulaire à la transition G2/M

La transition de la phase G2 à M est contrôlée par la phosphorylation d'une protéine kinase cyclin-dépendante "CDK". Cette protéine régule le cycle cellulaire dans toutes les cellules eucaryotes. Vpr va induire l'arrêt en phase G2 du cycle cellulaire de la cellule hôte. Vpr agit en provoquant l'hyperphosphorylation de la protéine kinase CDK1 (Zhao *et al*, 1996), en inhibant la protéine phosphatase Cdc 25 (Bartz *et al*, 1996) et en activant la protéine kinase Wee 1 (Elder *et al*, 2001).

Induction de l'apoptose

La voie majeure de l'induction de l'apoptose par Vpr se fait via la mitochondrie. Ce phénomène est initié par la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Green & Kroemer, 2004). Vpr va s'associer à l'ANT (adénine nucléotide translocator), une protéine localisée sur la membrane interne de la mitochondrie (Jacotot *et al*, 2001; Jacotot *et al*, 2000). Le relargage des facteurs mitochondriaux proapoptotiques pourrait aussi impliquer la liaison de Vpr au facteur HAX-1 (facteur anti-apoptotique) qui se trouve dans la membrane externe de la mitochondrie ce qui provoquerait son inhibition (Yedavalli *et al*, 2005).

Vpr peut se lier à d'autres protéines cellulaires mais on ne connaît pas précisément l'impact de ces associations sur la réplication du virus et sur sa pathogénicité dans la cellule hôte. On peut citer pour exemple la protéine HHR23A humaine (protéine se liant au protéasome) (Gragerov *et al*, 1998), l'uracil-DNA glycosylase "UNG" (enzyme qui excise l'uracile de l'ADN) (Bouhamdan *et al*, 1996) ou des coactivateurs de la transcription (Kino *et al*, 2002).

➤ *La protéine Nef*

Le facteur négatif du VIH-1, Nef, est une protéine de 27 kDa. C'est un facteur de régulation dont l'extrémité N-terminale est myristoylée. Il est exprimé en grandes quantités lors de l'infection virale (Goldsmith *et al*, 1995). Cette protéine permet d'atteindre et de maintenir une haute charge virale dans les cellules infectées.

Nef joue deux rôles bien distincts: augmenter et promouvoir la réplication virale et stimuler la réduction du nombre des récepteurs CD4 à la surface de la cellule infectée (Goldsmith *et al*, 1995).

Un rôle dans l'entrée du virus a été proposé, quelques études sur des pseudo particules virales suggèrent que Nef puisse promouvoir la fusion à la membrane cellulaire à pH neutre (Chazal *et al*, 2001). La majorité des résultats obtenus concerne sa fonction intracellulaire dans la réplication virale. Nef pourrait stimuler la transcription inverse du génome viral (Aiken & Trono, 1995). Toutefois, des études plus récentes suggèrent que l'incorporation de Nef dans les virions n'est pas nécessaire pour augmenter la réplication et l'inféctivité des virions (Fackler *et al*, 2006).

Une des fonctions peut être la plus physiologique de Nef pourrait être la régulation négative de la concentration du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) et des CD4 à la surface cellulaire (Stove *et al*, 2005). Ceci limiterait la surinfection par le VIH-1.

➤ *La protéine Vif*

Vif est une protéine basique de 23 kDa, elle est produite en phase tardive du cycle répliatif et son expression est dépendante de Rev (Garrett *et al*, 1991; Schwartz *et al*, 1991). Des délétions de *Vif* sont associées à une réduction ou une perte de l'infectivité des virions (Strebel *et al*, 1987).

Malim et ses collaborateurs avaient identifié une protéine cellulaire qui provoquait l'inhibition de l'infection par le VIH-1, cette inhibition était levée par l'expression de la protéine Vif (Sheehy *et al*, 2002). Cette protéine, APOBEC3G, est une cytidine déaminase qui induit des mutations C à U dans les brins négatifs de l'ADN nouvellement synthétisé. L'ADN hypermuté sera ensuite dégradé (Strebel, 2007). Vif va induire l'ubiquitination et la dégradation d'APOBEC3G via les protéines Cullin5, Elongin B et C qui forment un complexe E3 ubiquitine ligase (Harris *et al*, 2003; Marin *et al*, 2003). Vif, en provoquant la dégradation d'APOBEC3G, empêche son encapsidation dans les particules virales naissantes, ce qui prévient la déamination de l'ADN viral néosynthétisé (Sheehy *et al*, 2003).

➤ *La protéine Vpu*

Vpu est une protéine membranaire intégrale de 16 kDa. Elle est composée de deux domaines. Le domaine hydrophobe retrouvé en N-terminal assure deux fonctions, celle de peptide signal et d'encrage dans la membrane cellulaire. Le domaine retrouvé en C-terminal est hydrophile. Il est exposé à l'intérieur du virus. Vpu et Env sont exprimées par un ARNm bicistronique sous la dépendance de la protéine Rev (Schwartz *et al*, 1990). Vpu est exprimée tardivement dans le cycle viral. Vpu est impliquée dans le relargage des particules virales lors du bourgeonnement en interagissant avec les composants des canaux K⁺ (Hsu *et al*, 2004). Son action est probablement de former des pores dans la membrane cellulaire (Bour *et al*, 1996). Vpu peut aussi réguler négativement l'expression et augmenter la dégradation des CD4 (Lenburg & Landau, 1993). Vpu contrecarre également l'action d'une protéine membranaire appelée BST-2 ou tetherin. Cette protéine, qui a été identifiée comme étant un acteur cellulaire antiviral qui empêche la libération des particules virales lors du bourgeonnement,

participe à l'immunité antivirale innée (Neil *et al*, 2008). Les modalités selon lesquelles Vpu bloque la tetherin sont encore méconnues (Douglas *et al*, 2010). Vpu pourrait séquestrer la tetherin dans les endosomes car les deux protéines y sont co-localisées (Neil *et al*, 2008) et le taux de la tetherin est diminué à la surface des cellules (Van Damme *et al*, 2008).

2. Le cycle répliatif du VIH-1

Comme pour l'ensemble des lentivirus, le cycle répliatif du VIH-1 passe par une étape d'intégration de son génome dans les chromosomes de la cellule hôte. L'intégration lui permettra d'acquérir une résistance permanente en tant que provirus et de pouvoir par la suite se répliquer et donner des particules virales filles. Ces dernières vont permettre à ces nouveaux virus d'infecter d'autres cellules saines et d'assurer leur survie.

Le cycle répliatif du VIH-1 schématisé par la figure 9, débute par l'entrée du virus dans la cellule hôte, suivie de la transcription inverse de l'ARN génomique qui donnera un ADN complémentaire « ADNc » viral. Après la translocation du double brin d'ADN dans le noyau et l'intégration dans le génome de la cellule hôte, la première phase du cycle viral prend fin. La transcription de l'ADN proviral intégré marque le début de la phase tardive, qui inclue d'autres événements qui sont l'export des ARNs viraux vers le cytoplasme, leur traduction, l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales filles.

a. La phase précoce du cycle répliatif du VIH-1

➤ *L'attachement à la cellule hôte et l'entrée*

L'entrée rétrovirale est un mécanisme complexe à multi étapes. Il a été particulièrement bien étudié pour le VIH-1. Premièrement, les glycoprotéines de l'enveloppe gp120, présentes à la surface des particules virales en trimères gp41/gp120 vont reconnaître les récepteurs CD4 retrouvés à la surface des lymphocytes T, des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules gliales. Cette interaction conduit à un changement conformationnel des CD4 et gp120. Les réarrangements des domaines de gp120 exposent les sites de liaison aux corécepteurs CCR5 et CXCR4 puis provoquent leur recrutement (Rizzuto *et al*, 1998) (Figures 10, 11). Cette seconde interaction va aboutir à de nouveaux changements conformationnels de gp120 (Kwong *et al*, 1998). Ensemble, CD4 et les corécepteurs vont induire des changements conformationnels additionnels de gp41 incluant l'exposition du

peptide de fusion qui est le premier à être déplacé vers la membrane cellulaire et y être inséré par la suite (Doms & Moore, 2000). Il va en résulter la fusion des membranes virale et cellulaire et l'entrée de la capside virale dans le cytoplasme.

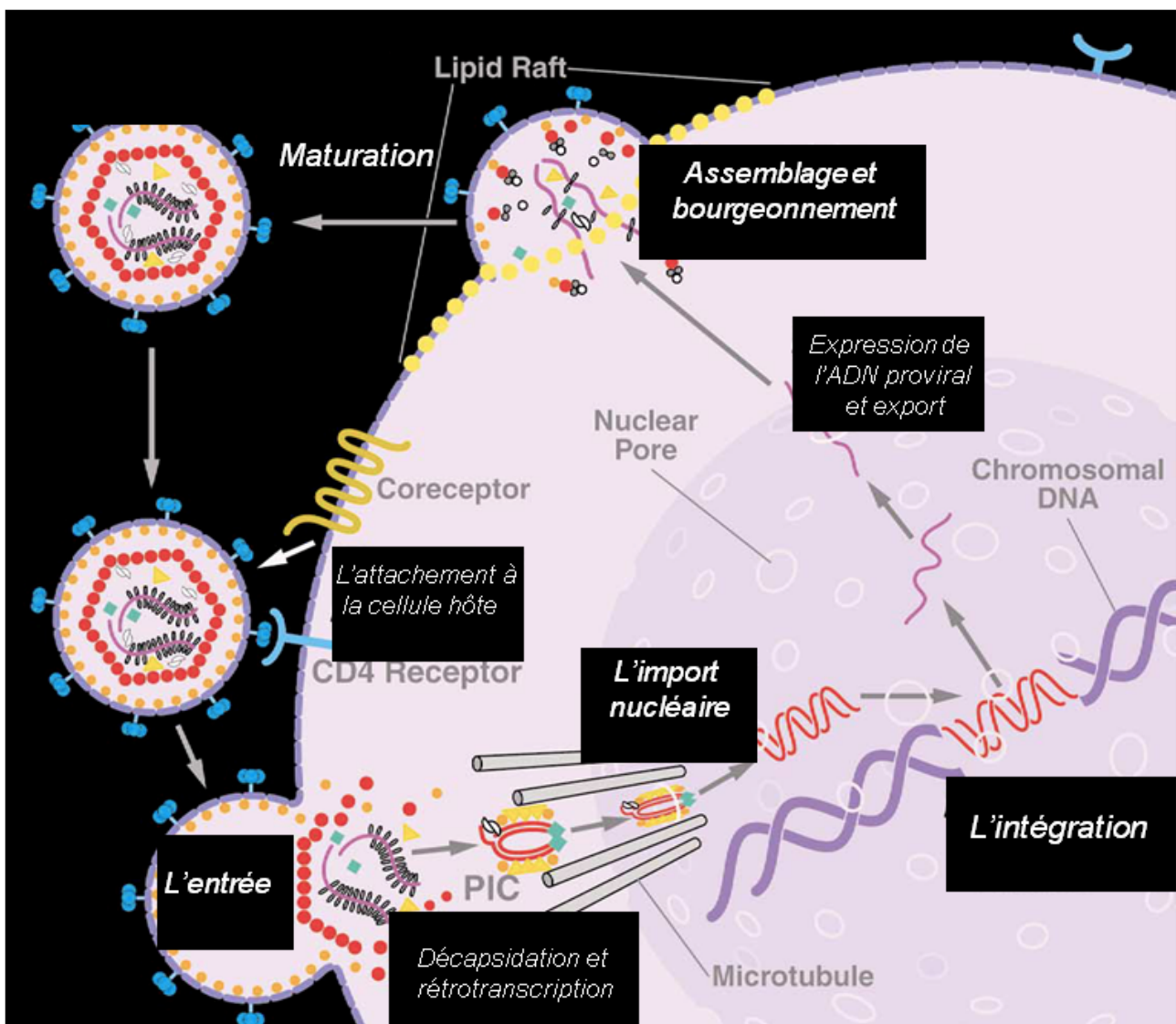


Figure 9. Cycle réplcatif du VIH-1: La première étape du cycle viral est la reconnaissance et la fusion avec la membrane de la cellule hôte. Le génome viral est rétrotranscrit et intégré au génome cellulaire. Le provirus est transcrit et les protéines virales sont produites. La dernière étape est celle de l'assemblage, bourgeonnement et maturation. Figure modifiée à partir de (Sherman & Greene, 2002).

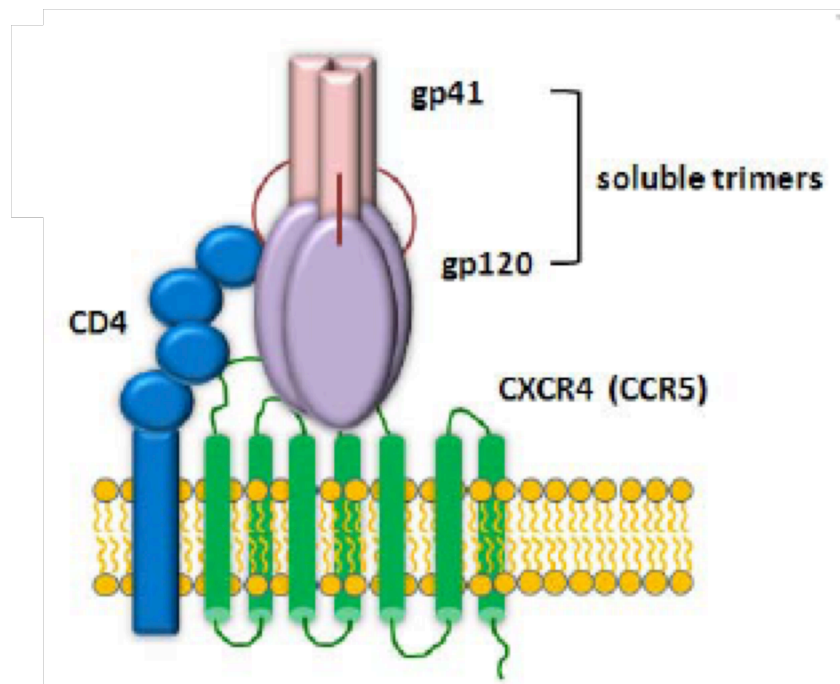


Figure 10. La glycoprotéine Env: La glycoprotéine Env est un hétérodimère formé du domaine gp120 attaché non covalamment au domaine transmembranaire gp41 (Tagliamonte *et al*, 2011).

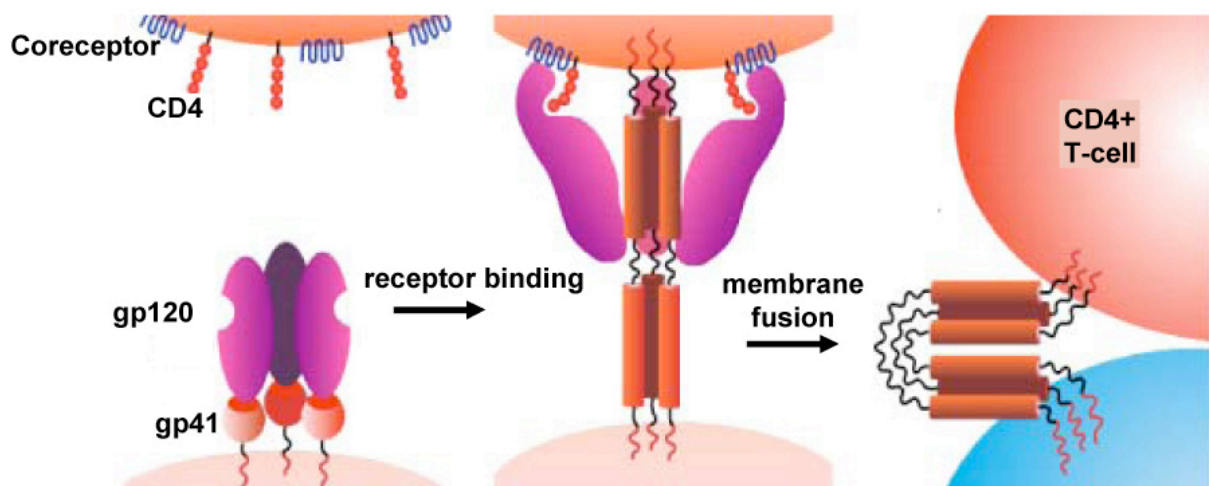


Figure 11. Modèle d'attachement du virion et entrée: gp120 se lie au récepteur CD4 puis aux corécepteurs CCR5/CXCR4 conduisant à la fusion des membranes et à l'entrée dans la cellule (Tagliamonte *et al*, 2011).

➤ *La décapsidation et la transcription inverse du génome viral*

La fusion des membranes virale et cellulaire délivre la capsidie virale dans le cytoplasme, où l'ARN viral sera rétrotranscrit générant un ADN double brin appelé ADN proviral ou "provirus" (Telesnitsky & Goff, 1997). L'essentiel du processus est réalisé par la transcriptase inverse virale (RT). Elle requiert la présence de l'ARN viral, qui sert de matrice, et de l'ARNt₃^{Lys} cellulaire qui sert d'amorce. La synthèse de l'ADN proviral est principalement cytoplasmique, au sein d'un complexe nucléoprotéique, mais l'étape essentielle d'initiation se fait dans le milieu clos de la capsidie virale avant libération de l'ARN viral dans le cytoplasme de la cellule hôte. En plus de la RT, d'autres facteurs cellulaires et viraux contribuent à l'efficacité de la transcription inverse. Les détails de cette étape seront retrouvés dans le paragraphe concernant "la transcription inverse de l'ARN viral".

➤ *L'import vers le noyau*

L'ADN viral est acheminé vers le noyau sous forme de complexe avec des protéines virales. Il est appelé complexe de préintégration "PIC" (Figure 12). Le complexe PIC est capable de traverser la membrane nucléaire (Bukrinsky *et al*, 1992). Il est composé d'un ADN double brin linéaire associé aux protéines virales MA, RT, IN et Vpr et à quelques protéines cellulaires comme LEDGF. Le diamètre de PIC est plus grand que celui du pore nucléaire. Le VIH a développé un mécanisme de transport actif. Les protéines virales associées au PIC, qui possèdent des signaux de localisation nucléaire (NLS), jouent un rôle significatif dans l'entrée dans le noyau. Une structure à trois brins d'ADN retrouvée au centre de l'ADN viral et appelée "DNA flap" est également requise pour l'import nucléaire (Zennou *et al*, 2000).

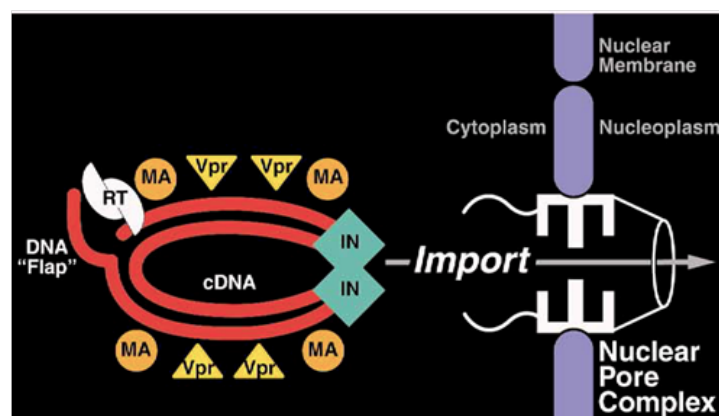


Figure 12. Complexe de préintégration PIC: PIC est composé des protéines IN, MA, RT et Vpr. Ces protéines aident l'import de l'ADNc dans le noyau de la cellule infectée (Sherman & Greene, 2002).

➤ *L'intégration*

L'intégration de l'ADN proviral représente la seule façon pour le virus de maintenir l'information génétique dans la cellule hôte. Plus de 500 sites d'intégration ont été identifiés dans le génome de lignées de cellules T, révélant que les sites préférentiels de l'intégration du VIH-1 sont les gènes hautement transcrits par l'ARN pol II (Pryciak & Varmus, 1992). C'est l'intégrase du virus qui va médier l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de l'hôte (Asante-Appiah & Skalka, 1997). L'intégrase va interagir avec des protéines de l'hôte qui ont la capacité de se lier à l'ADN pour diriger le PIC aux sites cibles pour l'intégration (Van Maele & Debyser, 2005). Ces protéines sont par exemple la protéine Ini1 et la sous-unité du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (Kalpana *et al*, 1994), ou le cofacteur transcriptionnel LEDGF.

Le travail de l'intégrase commence dans le cytoplasme (Figure 13), elle va reconnaître un fragment d'ADN de 20 pb situé aux extrémités 3' et 5' des séquences LTR et va cliver un dinucléotide GT sur les deux brins d'ADN. Le résultat est une molécule d'ADN bicaténaire, portant aux extrémités un groupement hydroxyle (Farnet & Haseltine, 1990).

Une fois le complexe PIC dans le noyau, l'intégrase va cliver l'ADN cellulaire en un site cible et procède à une réaction de transestérification entre les extrémités 3' hydroxyle (OH) de l'ADN viral et 5' phosphate de l'ADN cellulaire. Les enzymes cellulaires de réparation de l'ADN vont finir l'intégration en clivant les nucléotides non associés et en réparant le double brin d'ADN (Yoder & Bushman, 2000)

b. La phase tardive du cycle réplcatif du VIH-1

➤ *L'expression de l'ADN proviral et l'export des ARN transcrits*

Le provirus est inséré dans des structures de la chromatine cellulaire réprimant sa transcription et l'obligeant à rester sous forme latente. Le provirus va parasiter la machinerie transcriptionnelle de la cellule hôte pour l'expression de ses gènes. Ce phénomène se produit lors de changements physiologiques de la cellule comme un stress ou une activation immunitaire. Le provirus se comporte comme un gène cellulaire. En effet, il possède dans sa région U3 du LTR les éléments structuraux caractéristiques des promoteurs des gènes eucaryotiques. Ce promoteur va faciliter le fonctionnement de l'ARN Pol II cellulaire lors de l'initiation de la transcription. Les ARNm viraux seront coiffés en 5', polyadénylés en 3' et épissés comme les ARNm eucaryotes.

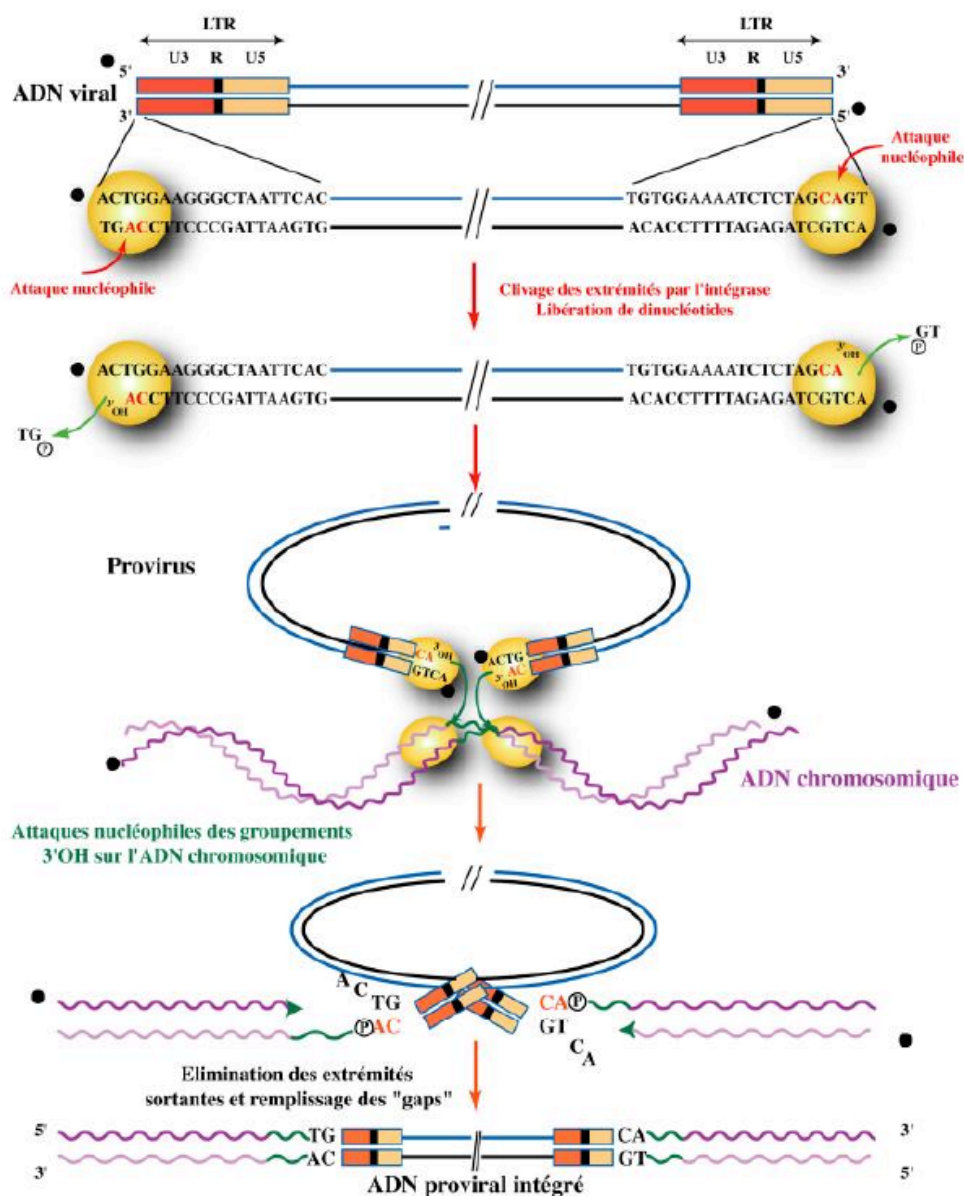


Figure 13. Mécanisme d'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte : L'intégrase virale se lie aux extrémités des LTR des deux côtés de l'ADN viral et par attaque nucléophile, les deux nucléotides GT sont enlevés, libérant une extrémité 3'-hydroxyle. L'intégrase clive également l'ADN de l'hôte et les extrémités 3'-hydroxyle de l'ADN proviral sont liguées aux extrémités 5' phosphate de l'ADN hôte par l'intégrase. Les sites de ligation sont réparés par les enzymes cellulaires (Abbink & Berkhout, 2007).

La synthèse des ARNm à partir du provirus est continue, très efficace et contrôlée par un système de régulation très puissant via la protéine Tat et des protéines d'origine cellulaire.

Des étapes distinctes peuvent être décrites pour l'expression des gènes du VIH-1: la première est sous la dépendance exclusive des facteurs de transcription cellulaire.

L'élongation par l'ARN Pol II n'y est pas très efficace et donne des ARNm abortifs, non polyadénylés. Ces ARNm viraux sont multi-épissés et traduits par la machinerie cellulaire. Ils vont conduire à la production des protéines virales Tat, Rev et Nef.

La seconde étape dépend de l'activation par la protéine Tat. Tat une fois synthétisée va retourner dans le noyau et stimuler très fortement (x 100) la transcription de l'ADN proviral en augmentant la processivité du complexe transcriptionnel formé par l'ADN Pol II (Strebel, 2003). Tat se lie à la tige boucle TAR, en début de la synthèse de l'ARN viral. Elle agit comme une molécule adaptatrice qui dirige des composants de la machinerie transcriptionnelle au niveau de l'ARN viral pour promouvoir la processivité de la polymérase cellulaire. Elle permet de recruter le facteur d'élongation P-TEFb (Figure 14). Les ARNm produits lors de cette étape sont de taille variable. Ils sont issus d'un seul transcrit par un mécanisme d'épissages alternatifs (Schwartz *et al*, 1992). Les ARNm non épissés codent pour les polyprotéines Gag et GagPol tandis que les mono-épissés codent pour les protéines Vif, Vpr, Vpu et les glycoprotéines de l'enveloppe. La protéine Rev permet l'export des ARNm non épissés et mono-épissés de grande taille dans le cytoplasme (Strebel, 2003).

Ce phénomène est observé en phase tardive du cycle viral et permet l'accumulation des ARNm viraux de haut poids moléculaire dans le cytoplasme.

➤ *La traduction des précurseurs*

La traduction des ARNm viraux est réalisée dans le cytoplasme et se fait en parasitant la machinerie cellulaire. Elle permet la synthèse des précurseurs protéiques Gag et GagPol à partir d'un même transcrit, tout comme la synthèse des protéines de l'enveloppe et Vpu. La traduction des deux précurseurs ne se fait pas de la même manière.

La protéine GagPol est obtenue grâce à un décalage du cadre de lecture de type -1 des ribosomes en fin de traduction du précurseur Gag. La présence d'une séquence de glissement associée à une tige boucle permet un décalage d'un nucléotide vers le 5' du cadre de lecture (Jacks *et al*, 1988) avec un rapport entre la synthèse de Gag et de GagPol (20:1) qui est critique pour la propagation du virus (Karacostas *et al*, 1993).

La synthèse des protéines Env et Vpu est obtenue à partir d'un ARNm bi-cistronique. Il contient deux ORF, Vpu et Env qui se suivent et se chevauchent. La traduction de Env se fait grâce à un mécanisme appelé "Leaky scanning". Il consiste à sauter le codon d'initiation

de Vpu, ce dernier ne se trouvant pas dans un contexte nucléotidique très efficace au démarrage de la traduction (Schwartz *et al*, 1990).

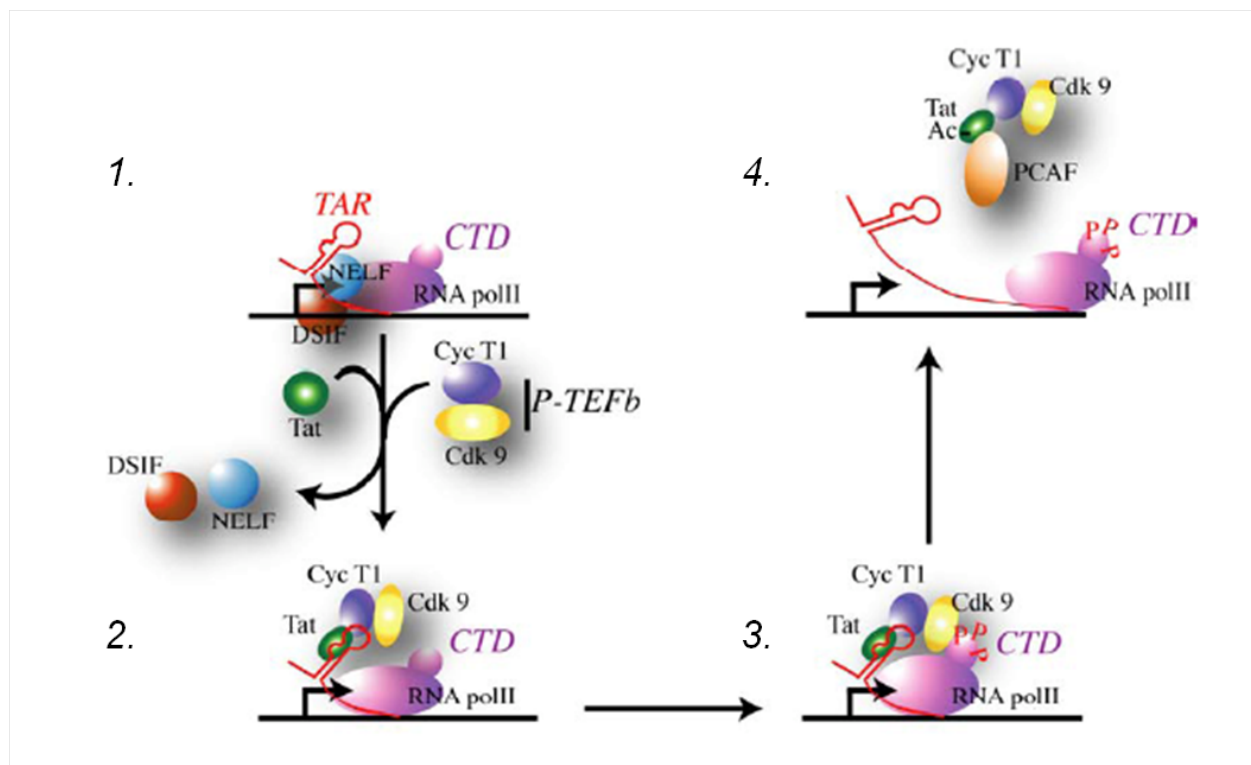


Figure 14. Modèle de l'action de la Tat: 1 : Synthèse d'un faible taux d'ARN messagers viraux non polyadénylés. 2 : Fixation de Tat sur TAR en 5' de l'ARNv et recrutement du complexe P-TEFb (Cycline T1 et la protéine kinase Cdk 9) 3 : Hyperphosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II par Cdk9 ; 4 : Dissociation du complexe Tat-TAR-Cycline T1:Cdk9 et synthèse de longs transcrits polyadénylés augmentant la production de protéines virales.

➤ L'assemblage des virions

L'assemblage est un processus très sélectif, le virus encapside l'ARN non épissé, l'ARN génomique "ARNg", une espèce minoritaire d'ARN qui sert aussi d'ARNm à Gag et GagPol. C'est le précurseur Gag aussi appelé Pr55^{Gag} qui joue le rôle central dans la formation des particules et conduit à l'assemblage des complexes protéine-protéine, protéine-ARN et protéine-lipide. Il orchestre ainsi l'incorporation des composants principaux dans les virions. Pr55^{Gag} est l'unique composant du virus qui peut s'auto-assembler par une multimérisation de ces monomères et peut former les GagVLPs "Virus-like particles". Ce sont des structures sphériques qui forment des particules virales immatures (Gheysen *et al*, 1989).

L'assemblage se fait au niveau du site du bourgeonnement du virus qui est la membrane plasmique. Le domaine MA du précurseur Pr55^{Gag} est démontré comme étant le déterminant majeur responsable de l'adressage et l'attachement de Gag à la membrane plasmique. Ce domaine est myristylé et va ancrer Pr55^{Gag} dans la membrane plasmique grâce au groupement myristyl qui s'enchaîne dans la bicouche lipidique (Göttlinger *et al*, 1989). L'assemblage des autres composants du virus requiert l'intervention de Pr55^{Gag}. La protéine Env est synthétisée sous forme de précurseur gp160 qui transite par le réticulum endoplasmique où il est glycosylé. Après maturation, gp120 et gp41 s'associent au domaine MA de Gag. L'encapsidation des ARNg non épissés se fait grâce au domaine NC de Pr55^{Gag}. La région de Pol spécifiant les enzymes PR, RT et IN est incorporée grâce à des interactions entre les précurseurs Pr55^{Gag} et la portion Gag du Pr160^{GagPol}.

Durant l'assemblage, d'autres composants sont également incorporés dans les particules virales à savoir des protéines virales et cellulaires. Elles ne sont pas indispensables à l'assemblage proprement dit mais absolument nécessaires pour convertir le virion en particule virale infectieuse. Vpr est encapsidée par une interaction avec la partie N-terminale du domaine p6 du précurseur Pr55^{Gag}. La protéine Vif ayant la capacité de se lier à la fois avec l'ARN viral (Dettenhofer *et al*, 2000; Zhang *et al*, 2000) et avec les précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{GagPol} (Huvent *et al*, 1998) pourrait jouer un rôle dans l'assemblage. La protéine Nef qui est retrouvée au niveau du core de la particule virale est incorporée selon un mécanisme encore inconnu. Les composants cellulaires qui sont également retrouvés dans les particules virales sont : l'ARNt₃^{Lys} qui est l'amorce de la transcription inverse du génome du VIH-1 et la lysyl-ARNt synthétase qui sert de co-transporteur à cet ARNt, ainsi que d'autres protéines cellulaires qui sont des partenaires potentiels de Pr55^{Gag} à savoir la cyclophiline A, la protéine Hsp70 et Tsg101.

➤ *Le bourgeonnement*

Le virion assemblé doit bourgeonner de la cellule productrice pour pouvoir infecter de nouvelles cellules du système immunitaire de l'hôte. Cette dernière étape met en jeu le domaine L "late" de Pr55^{Gag} dont le motif Pro-Thr/Ser-Ala-Pro est hautement conservé. Il est localisé en N-terminal de la région p6 du Pr55^{Gag} (Göttlinger *et al*, 1991; Huang *et al*, 1995).

Plusieurs protéines cellulaires ont été identifiées comme favorisant le bourgeonnement des virions et leur libération dans le milieu extracellulaire. Ce sont des

protéines qui sont impliquées dans le trafic membranaire et la dégradation par le protéasome (Morita & Sundquist, 2004; Pornillos *et al*, 2002). La région p6 de Pr55^{Gag} est mono-ubiquitinilée. La mono-ubiquitination sert de signal pour recruter les protéines membranaires notamment la protéine Tsg101 "Tumor Suppressor Gene 101", une protéine de conjugaison de l'ubiquitine E2. Le virus en se liant à cette protéine pourrait accéder à la machinerie qui catalyse le bourgeonnement des vésicules VPS (ESCRT) "Endosomal Sorting Complexes Required for Transport" et ainsi permettre le bourgeonnement des particules virales.

➤ *La maturation*

Pendant le bourgeonnement ou peu de temps après, les virus naissant vont subir des changements structuraux et morphologiques conduisant à leur maturation. Pendant l'assemblage, l'interaction de deux précurseurs Pr160^{GagPol} permet la dimérisation des domaines protéase ce qui conduit à la formation d'une protéase homodimérique active. Elle sera libérée par un mécanisme autocatalytique (Debouck *et al*, 1987). Les précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{GagPol} sont clivés par la protéase virale. La libération de la protéine CA mature va permettre un changement morphologique significatif du virus. Elle permet de former la capsid virale (Briggs *et al*, 2004). La génération de NC et MA ont également des conséquences significatives dans la maturation des virus. La NC mature permet de condenser le complexe ribonucléoprotéique (RNP) et de stabiliser l'ARN viral dimérique. Ces deux propriétés sont importantes pour la réplication rétrovirale (Rein *et al*, 1998). La MA mature s'organise et forme l'enveloppe interne. Les virus formés sont viables et infectieux.

3. La transcription inverse de l'ARN viral

La transcription inverse ou rétrotranscription est une étape centrale du cycle répliatif du VIH-1. La conversion du génome viral ARN en ADN double brin est réalisée essentiellement par la RT. Cet enzyme requiert un ARNt cellulaire spécifique, l'ARNt₃^{Lys} qui lui servira d'amorce pour la rétrotranscription du génome viral. Les modalités exactes du démarrage de la réplication ne sont pas encore clairement comprises. Plusieurs données montrent que l'initiation de la réplication se fait avant la libération de l'ARN viral dans le cytoplasme des cellules infectées.

a. Les étapes de la transcription inverse

La transcription inverse de l'ARNg du VIH-1 se déroule selon les étapes communes aux rétrovirus. Ces étapes sont décrites dans ce paragraphe et illustrées par la figure 15.

➤ *Le début de la transcription inverse et la synthèse de l'ADN ss "Strong-Stop" (-)*

La transcription inverse commence par l'attachement de l'ARNt₃^{Lys} à l'ARN viral (Figure 15a). L'extrémité 3' de l'ARNt₃^{Lys} possède une séquence de 18 nucléotides terminaux appelée anti-PBS (Figure 16A). Elle est strictement complémentaire au site de liaison de l'amorce PBS "Primer Binding Site" retrouvé en position (+182 à +199) dans la région 5' UTR de l'ARN viral (Figure 16B). Cette étape requiert également d'autres appariements entre les deux molécules d'ARN (Isel *et al*, 1995). La RT reconnaît un homoduplex ARN-ARN formé et correctement replié entre l'ARNt₃^{Lys} et l'ARN viral (Figure 16C), puis elle catalyse l'extension de l'extrémité 3' de l'amorce ARNt en utilisant l'ARN viral comme matrice. L'ADNc synthétisé jusqu'à l'extrémité 5' de l'ARNg est un intermédiaire appelé minus strand strong-stop DNA ou ADNss (-) (Figure 15b). Le domaine RNaseH de la RT dégrade l'ARN matrice qui avait servi à la synthèse de l'ADNss (-). Sans dégradation complète de ces fragments, le transfert de brin qui doit suivre cette étape n'est pas possible. Par contre, l'homoduplex ARN/ARN n'est pas dégradé par la RNaseH et servira d'amorce à une étape ultérieure.

➤ *Le premier transfert de brin*

L'ADNss (-) est transloqué sur la région R à l'extrémité 3' du génome viral (Figure 15c). Cette étape est considérée comme le premier transfert de brin. Des études suggèrent que le premier transfert de brin peut être intra- ou intermoléculaire étant donné la nature dimérique du génome viral (Aldovini & Young, 1990; Van Wamel & Berkhout, 1998). Lors de cette étape, la NC et éventuellement l'actine facilitent le transfert de brin. Après transfert et hybridation totale, l'ADNss (-) va servir d'amorce à la synthèse du brin (-).

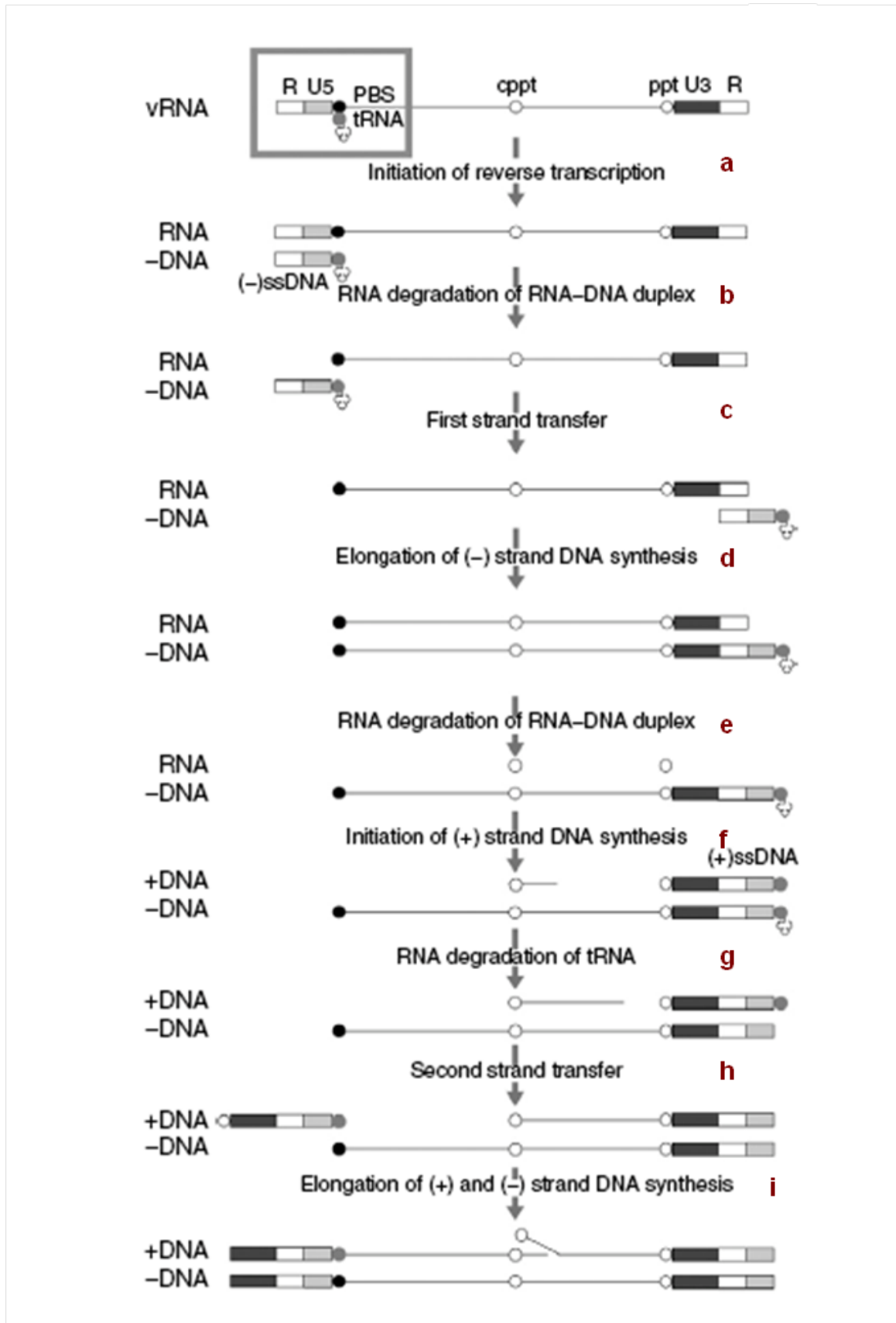


Figure 15. Transcription inverse du VIH-1: Ce phénomène est multi étapes. Les différentes étapes sont illustrées sur ce schéma et indiquées de a à i. Le produit final est un ADN double brin, il servira de matrice à la synthèse des protéines virales (Abbink & Berkhout, 2007).

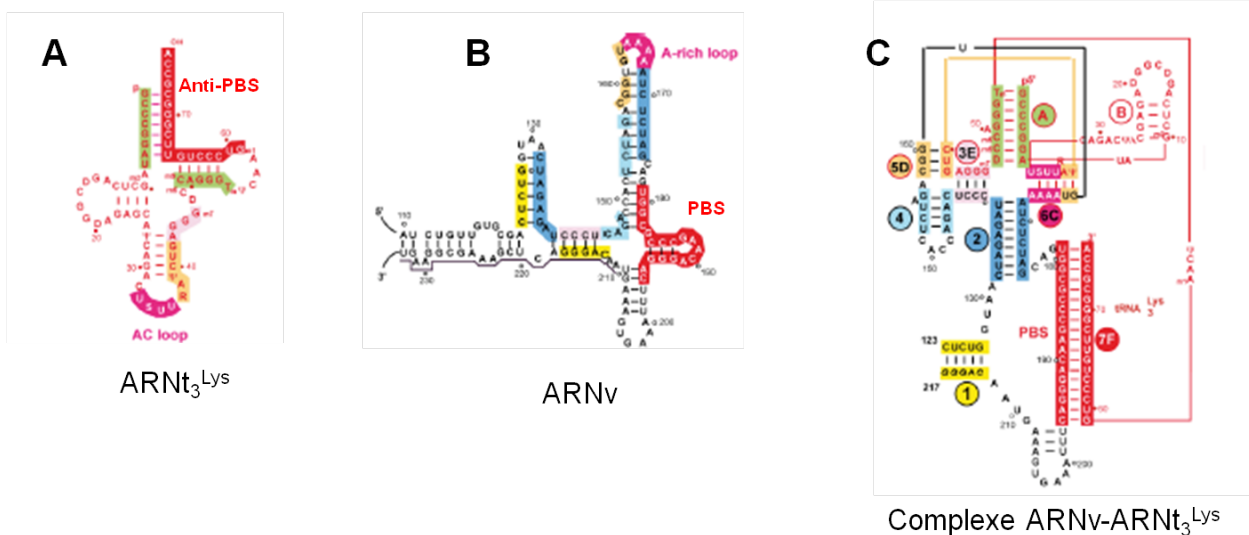


Figure 16. Structures secondaires des ARNt et ARNv: (A): Sur l'ARNt₃^{Lys} est montré en rouge la région anti-PBS de 18 nucléotides qui reconnaît en (B) la région PBS de l'ARNv et va s'y hybrider pour former le complexe ARNv-ARNt₃^{Lys} présenté en (C). (Isel *et al*, 1995).

➤ *La synthèse du brin d'ADN (-)*

La transcription inverse se poursuit jusqu'au PBS (Figure 15d). La RNaseH dégrade l'ARN viral matrice à l'exception de deux fragments qui résistent au clivage: ce sont les "polypurine tracts", des séquences riches en purines et longues de 15 nucléotides. Elles sont respectivement retrouvées dans la région U3 (PPT3') et au centre de la matrice ARN (PPTc) (Figure 15e).

➤ *La synthèse du brin d'ADN (+) et second transfert de brin*

L'ADN (-) servira à son tour de matrice pour la synthèse du brin d'ADN de polarité positive, ADN (+). Les séquences ARN persistantes (PPT3', PPTc) vont quant à elles servir d'amorce (Figure 15f).

La synthèse d'ADN (+) à partir du PPT3' va continuer d'avancer jusqu'à l'ARNt₃^{Lys}, ce dernier étant toujours attaché à l'ADN (-). Ses 18 nucléotides 3'-terminaux sont donc retrotranscrits et la synthèse va s'arrêter à sa première base modifiée. Il s'agit d'une méthylation en position 1 du nucléotide A₅₈ de l'ARNt₃^{Lys}. Cette méthylation est indispensable pour éviter l'obtention de produits trop longs. Le clivage de l'ARNt₃^{Lys} par la RNaseH s'effectue entre les ribonucléotides A et C 3' terminaux de cet ARNt, laissant le A lié

à l'ADN (Figure 15g). Cette excision conduit au second saut de brin, il consiste à transférer l'ADN positif "strong stop" ou ADNss (+) à l'extrémité 3' du brin complet d'ADN (-) et hybridé sur la séquence PBS (Figure 15h).

➤ *La synthèse des deux brins d'ADN et terminaison de la transcription inverse*

La transcription inverse se poursuit le long du brin négatif jusqu'à ce que la RT rencontre le PPTc (+). L'élongation va alors s'arrêter au niveau du PPTc par un mécanisme appelé "strand displacement" jusqu'à ce que la RT atteigne un site voisin (80-100 nts en aval): une séquence centrale de terminaison appelée CTS, riche en ribonucléotides A et T (Figure 15i).

La fin de la transcription inverse donne un ADN proviral double brin qui est flanqué par deux régions identiques comprenant les séquences U3-R-U5, appelées LTR "Long Terminal Repeat". Il contient aussi un ADN (+) discontinu, appelé "DNA flap" au centre. Cette structure à trois brins est spécifique aux lentivirus et est importante à l'étape de l'import nucléaire et à la réplication virale dans des cellules qui ne sont pas en division.

b. L'initiation de la transcription inverse

➤ *Les modalités de l'initiation de la transcription inverse*

Les modalités exactes du démarrage de la réplication ne sont pas encore clairement comprises. Il existe une régulation spatio-temporelle de l'initiation de la transcription inverse du génome viral dans la cellule hôte. Un démarrage précoce de la rétrotranscription lors de la phase tardive du cycle répliatif y est empêché par l'action de la nucléocapside. Lorsque l'un ou les deux doigts de zinc de NC sont délétés, il a été observé la synthèse d'ADN viral dans la cellule hôte avant encapsidation. L'encapsidation de l'ADN viral dans les particules donne des virions non infectieux (Houzet *et al*, 2008). D'autres données soulignent la possibilité du déroulement des premières étapes dans la capsid des particules virales peu avant l'étape d'attachement du virus à la cellule cible (Huang *et al*, 1997; Lori *et al*, 1992; Oude Essink *et al*, 1996; Trono, 1992), ou dans le cytoplasme de la cellule infectée avant la décapsidation. Des études ont montré la présence d'ADN viral court de polarité négative dans les virions, il correspond à l'allongement de l'ARNt amorce jusqu'au premier signal d'arrêt (Lori *et al*, 1992; Zhang *et al*, 1995). Les mécanismes responsables de cette restriction sont méconnus, mais certains motifs et structures de l'ARN viral seraient impliqués tout comme la faible concentration des dNTP à l'intérieur de la capsid (Beerens & Berkhout, 2002b; Beerens &

Berkhout, 2002a; Cobrinik *et al*, 1991; Cobrinik *et al*, 1988; Isel *et al*, 1995; Liang *et al*, 1997). Indirectement, une autre étude montre que Vif est moins efficace pour bloquer l'action d'APOBEC3G si cette dernière est incorporée dans les virions (Liu *et al*, 2004). Ceci démontre qu'il y a de l'ADN nouvellement synthétisé dans les virions et pouvant être modifié par APOBEC3G. Enfin, lorsque l'ARNt amorce n'est pas encapsidé, l'infectivité des virions en est réduite (Guo *et al*, 2003). Ces arguments démontrent la nécessité d'encapsider l'ARNt amorce sélectivement lors de l'assemblage des virions.

➤ *Les exemples d'ARNt servant d'amorce à l'initiation de la transcription inverse*

Ce phénomène ne se limite pas au VIH-1, d'autres rétrovirus et rétrotransposons dont la synthèse de l'ADNc nécessite une amorce complémentaire à leur région PBS utilisent des ARNt cellulaires pour initier la transcription inverse de leur ARN génomique. Pour exemple, l'ARNt^{Trp} est utilisé comme amorce par les virus de sarcome aviaire (ASV) "Avian Sarcoma Virus" et (ALV) "Avian Leukosis Virus" (Sawyer & Dahlberg, 1973; Waters *et al*, 1975). L'ARNt^{Pro} est utilisé par le virus de la leucémie murine de Moloney (Mo-MuLV) (Peters *et al*, 1977).

c. L'ARNt^{Lys} et son encapsidation dans le VIH-1

L'ARNt₃^{Lys} est utilisé comme amorce par le VIH-1. Il existe trois isoformes majeures de l'ARNt^{Lys} dans les cellules de mammifères (Raba *et al*, 1979) (Figure 17A.B). Les ARNt₁^{Lys} et ARNt₂^{Lys} diffèrent l'un de l'autre par une paire de bases située dans la tige de l'anticodon et sont les amorces de plusieurs rétrovirus incluant le virus Mason-Pfizer du singe ou le virus humain "Human Foamy Virus" (HFV). L'ARNt₃^{Lys} sert d'amorce au virus des tumeurs mammaires de souris (Waters & Mullin, 1977). Il sert aussi d'amorce aux lentivirus. A savoir, au virus de l'anémie infectieuse du cheval, au virus de l'immunodéficience féline (FIV), au virus de l'immunodéficience simienne (SIV) et aux virus de l'immunodéficience humaine de type 1 et 2.

➤ *L'assemblage et la concentration des ARNt^{Lys} dans le VIH-1*

Les ARNt^{Lys} sont encapsidés sélectivement durant l'assemblage des rétrovirus. Des études produisant le VIH-1 dans les cellules COS7 transfectées par de l'ADN proviral ont montré que les trois isoformes d'ARNt^{Lys} sont très majoritairement retrouvées encapsidées dans les virions. Ils sont retrouvés à des ratios ARNt₃^{Lys} / ARNt_{1,2}^{Lys} équivalents à ceux qui

prévalent dans le cytoplasme des cellules infectées (Huang *et al*, 1997). Il a été estimé qu'il y avait 20 molécules d'ARNt^{Lys} par virion (pour deux molécules d'ARN génomique) (Huang *et al*, 1997). La concentration en ARNt^{Lys} dans les particules virales est un des facteurs contrôlant l'infectivité des populations du VIH-1 (Gabor *et al*, 2002). L'altération du ratio ARNt₃^{Lys} / ARNt_{1,2}^{Lys} affecte l'infectivité.

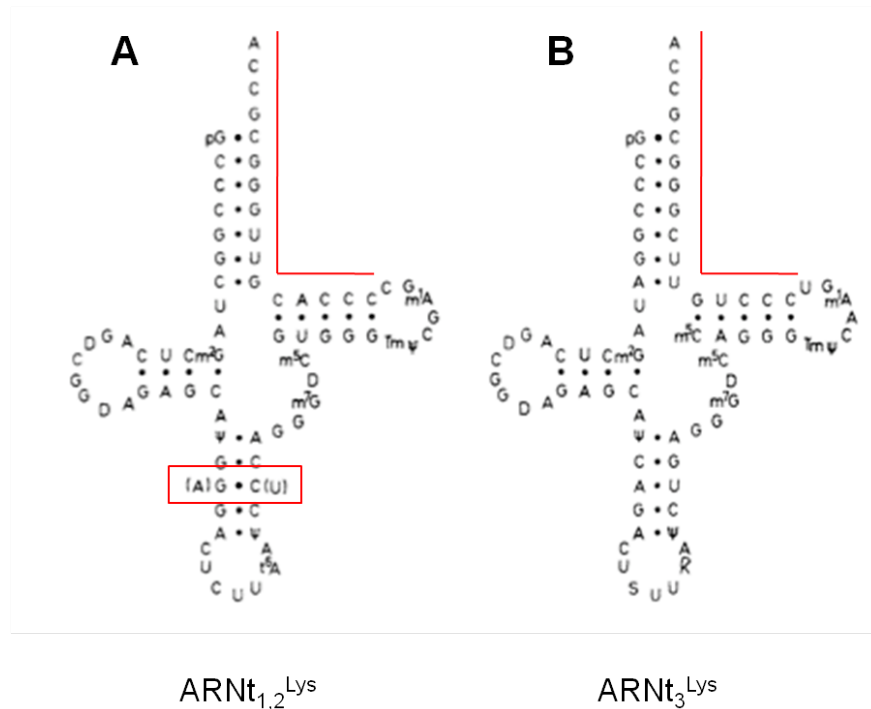


Figure 17. Les trois isoformes de l'ARNt^{Lys} : (A) L'ARNt₁^{Lys} a une paire de base G-C au milieu de la tige de l'anticodon tandis que l'ARNt₂^{Lys} a une paire A-U à cet emplacement. (B) L'ARNt₃^{Lys}: S est mcm⁵s²U, et R est ms²t⁶A (Raba *et al*, 1979). Pour l'ARNt₃^{Lys}, la région indiquée en rouge correspond à l'anti-PBS. Les nucléotides entourés pour les trois ARNt sont les bases qui diffèrent les ARNt_{1,2}^{Lys} de l'ARNt₃^{Lys} et qui sont requis à l'hybridation sur la région PBS du génome du VIH-1.

Les ARNt_{1,2}^{Lys} qui diffèrent de l'ARNt₃^{Lys} de 14 ou 16 nucléotides ne peuvent pas servir d'amorce à la rétrotranscription du génome viral, car leur séquence dans la partie 3' anti-PBS diffère de 5 nucléotides sur les 18 nucléotides de la séquence PBS. Leur fonction éventuelle dans le VIH-1 n'est pas connue. Des études récentes suggèrent qu'ils pourraient jouer un rôle lors de l'import du complexe de préintégration vers le noyau des cellules infectées (Zaitseva *et al*, 2006). L'ARNt₃^{Lys} servira d'amorce, on ne sait pas si sa liaison au génome viral se fait avant ou après l'étape de bourgeonnement du virus. D'autres études menées par Tisé et collaborateurs se sont focalisées sur la recherche des nucléotides de l'ARNt₃^{Lys} qui sont indispensables à l'initiation de la transcription inverse. Le groupement 2-thio en position 34

de l'ARNt₃^{Lys} semble jouer un rôle important dans ce processus (Isel et al, 1993; Tisné *et al*, 2000). Le placement de l'amorce ARNt sur le génome viral est facilité par l'activité chaperonne de la NC. Elle agit en deux étapes. Elle facilite l'échange de brin au niveau de la tige acceptrice de l'ARNt₃^{Lys}, et agit également en déstabilisant les interactions tertiaires hautement stables au niveau de la boucle TΨC de l'ARNt (Tisné, 2005; Tisné *et al*, 2004).

➤ *Les mécanismes possibles d'encapsidation des ARNt^{Lys}*

Comme la séquence d'hybridation à la région PBS n'est pas retrouvée dans les ARNt_{1,2}^{Lys}, l'appariement des ARNt à la séquence PBS ne peut être impliquée dans l'encapsidation de ces ARNt. Des études ont montré que l'ARN génomique n'est pas requis pour l'incorporation de l'amorce ARNt par le virus VIH-1 (Jiang *et al*, 1993; Mak *et al*, 1994). Cette observation est aussi valable pour les virus ASV (Prats *et al*, 1988) et Mo-MuLV (Levin & Seidman, 1981). Plusieurs études *in vitro* indiquent que la séquence de la RT des rétrovirus est impliquée dans l'encapsidation des ARNt. La RT mature lierait l'anticodon et les boucles D et TΨC de l'ARNt₃^{Lys} (Barat *et al*, 1989; Mishima & Steitz, 1995). D'autres protéines comme la NC (Mely *et al*, 1995) et la polyprotéine Gag (Feng *et al*, 1999) ont été décrites comme pouvant interagir avec l'ARNt₃^{Lys}.

Toutefois, les associations décrites ne sont pas très spécifiques des ARNt^{Lys} car ces protéines ont une haute affinité pour les acides nucléiques d'une manière générale. Aucune donnée actuelle ne montre que ces protéines sont directement impliquées dans l'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys}. Elles sont probablement impliquées dans les étapes de placement et d'hybridation de l'amorce sur la séquence PBS dans les virions matures.

➤ *La Lysyl-ARNt synthétase, transporteur des ARNt^{Lys}*

L'encapsidation sélective des ARNt^{Lys} cellulaires ne semble pas être dictée par une association spécifique et directe à une protéine virale. Elle implique l'intervention d'une protéine de la cellule hôte.

L'incorporation des ARNt^{Lys} se ferait sous forme d'un complexe avec l'un de ses partenaires naturels de la synthèse protéique car cet ARNt n'est jamais libre dans une cellule où la synthèse protéique est active. Le partenaire de l'ARNt₃^{Lys} proposé a été la lysyl-ARNt synthétase (LysRS) car les trois isoformes de l'ARNt^{Lys} sont retrouvées encapsidées dans le virus. Des anticorps polyclonaux dirigés contre la LysRS cytoplasmique humaine ont permis

d'identifier un polypeptide immunoréactif de 70 kDa dans des extraits de particules virales purifiées du VIH-1 (Cen *et al*, 2001).

II. Les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS)

A. Généralités sur les aminoacyl-ARNt synthétases

La très grande conservation du code génétique universel suggère que les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) ont été développées très tôt et sont parmi les premières protéines douées d'une activité enzymatique du "RNA world".

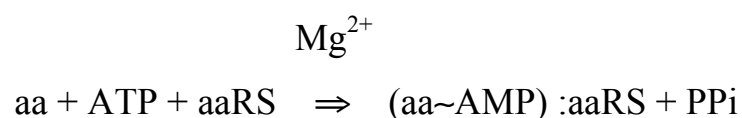
Les aaRS sont des enzymes clés de la synthèse protéique chez les organismes eucaryotes mais aussi procaryotes. Ce sont des adaptateurs entre le langage des protéines et le langage des acides nucléiques. Elles aminoacylent spécifiquement les ARN de transfert (ARNt) qui pourront être acheminés vers le ribosome et se fixer spécifiquement sur les ARN messagers (Figure 18). Cette réaction d'aminocyclation est spécifique, elle est en général catalysée par une famille de 20 aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS). Chaque enzyme de cette famille reconnaît un acide aminé et un ou plusieurs ARNt isoaccepteurs. Cette réaction est appelée aminoacylation de l'ARNt. Les aaRS sont modulaires: elles présentent un domaine catalytique, site actif de l'aminocyclation, ainsi que d'autres modules peptidiques dont le rôle est de reconnaître et lier l'ARNt. Il existe deux classes d'aaRS, les classe I et II. Les aaRS sont classées selon leur structure hautement conservée (Eriani *et al*, 1990). Chez les eucaryotes, plusieurs d'entre-elles sont retrouvées dans des complexes supramoléculaires (multisynthétases).

1. La réaction d'aminocyclation

Les aaRS assurent la synthèse d'aminocycl-ARNt (aa-ARNt) en plusieurs étapes, dont la contribution relative à la spécificité varie d'un enzyme à un autre.

a. L'activation de l'acide aminé

L'aaRS lie l'acide aminé sélectivement et positionne son groupement carboxyle pour attacher le phosphate α de l'ATP.



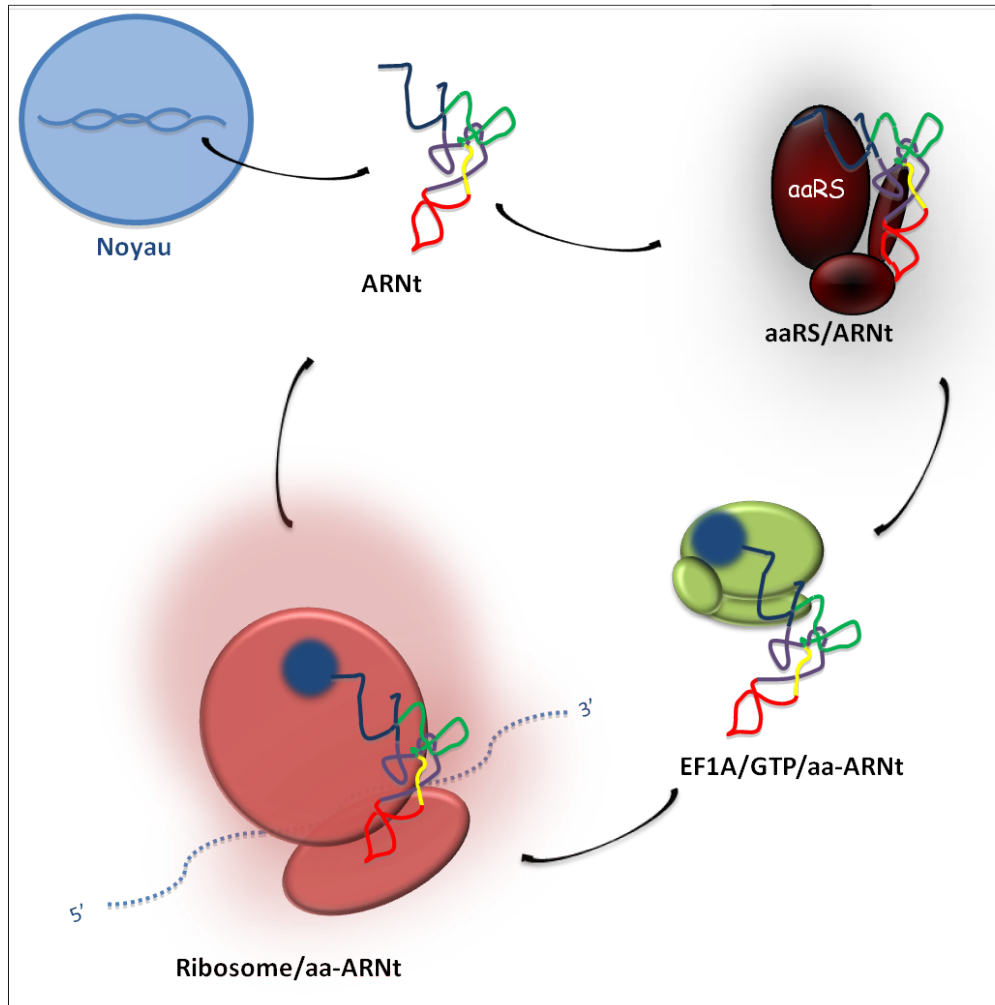


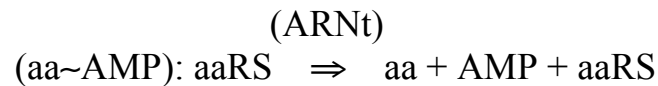
Figure 18. Rôle des aminoacyl-ARNt synthétases dans la synthèse protéique: Les aaRS aminoacylent les ARNt spécifiquement lors de la biosynthèse des protéines. L'ARNt forme ensuite un complexe ternaire EF1A/GTP/aa-ARNt qui est le donneur d'ARNt pour la synthèse protéique ribosomale.

L'ATP attaché lors de cette étape d'activation de l'acide aminé est dans une conformation caractéristique à ce type de protéines: 5' phosphate étendu pour les enzymes de classe I (Perona *et al*, 1993) ou replié en arrière de la base pour la classe II (Cusack *et al*, 1990). La réaction chimique paraît similaire pour les deux classes vis à vis du déplacement du pyrophosphate de l'ATP par le groupement carboxyle de l'acide aminé. Le rôle catalytique des aaRS de classe I et II est également similaire. Elles vont créer plusieurs liaisons entre ces substrats en utilisant des groupements conservés retrouvés dans les sites actifs des synthétases. De plus, les éléments conservés des synthétases de classes I et II offrent des groupements polaires qui stabilisent spécifiquement le pyrophosphate et l'état de transition

pour la formation de l'adenylate (aa~AMP). Les deux types d'aaRS utilisent des métaux divalents et des acides aminés polaires comme l'arginine, la lysine et l'histidine pour catalyser cette étape. Dans chacune des deux classes de synthétases, les sites actifs se superposent parfaitement et les éléments structuraux jouant le même rôle ont été identifiés (Arnez & Moras, 1997).

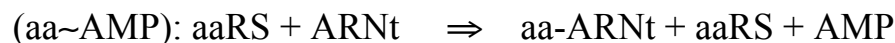
b. L'édition pré-transfert

Un acide aminé activé par la synthèse de son adenylate ne va pas forcément servir à charger un ARNt. Certaines synthétases de type I ont une fonction d'édition. Elles hydrolysent les aminoacyl-adenylates misactivés avant leur transfert vers l'ARNt (Fersht, 1977).



c. Le transfert de l' aminoacyl

L' aminoacyl-ARNt est formé suite à l'attaque de l'hydroxyle 2' ou 3' du ribose terminal de l'ARNt sur le carbone de la fonction carbonyle de l' aminoacyl-adénylate lié à l'enzyme (Perona *et al*, 1993).



d. L'édition post transfert

Même après le transfert de l' aminoacyl, l'aa-ARNt n'est pas nécessairement conduit vers le ribosome. Une édition hydrolytique de l'ARNt mischargé est possible (Eldred & Schimmel, 1972). A ce stade, l'aaRS peut encore corriger les erreurs qui n'ont pas été détectées auparavant. Ce dernier niveau d'édition, dépendant des aaRS et de l'acide aminé non apparenté (Freist & Sternbach, 1989), permet une aminoacylation exacte et stricte.

2. Les ARN de transfert

Prédits par F. Crick en 1955, les ARNt ont été découverts par Hoagland et collaborateurs en 1958. Depuis, les séquences de gènes d'ARNt chez différents organismes sont répertoriés dans la banque d'ARNt (Sprinzl & Vassilenko, 2005) (<http://www.tRNA.uni-bayreuth.de>). Plus de 80 modifications post-transcriptionnelles ont été identifiées (Sprinzl & Vassilenko, 2005). La structure 2D en feuille de trèfle des ARNt a été prédite grâce au

séquençage du premier ARNt, l'ARNt^{Ala} (Holley *et al*, 1965). La première structure cristallographique résolue est celle de l'ARNt^{Phe} de levure (Kim *et al*, 1974; Robertus *et al*, 1974).

Chez les procaryotes, les gènes d'ARNt sont généralement organisés en opéron tandis que chez les eucaryotes, ils sont isolés et transcrits par l'ARN Pol III. Après leur transcription, les ARNt transcrits subissent six étapes de maturation majeures (Hopper & Phizicky, 2003), il s'agit essentiellement de l'addition de la séquence CCA en 3' pour les ARNt d'eucaryotes, de plusieurs bactéries ainsi que de quelques archae et d'organelles (Levinger *et al*, 2004). Une seconde modification est l'épissage des introns de certains ARNt d'eucaryotes et de quelques archae (Abelson *et al*, 1998). Ils sont aussi le site de nombreuses modifications post-transcriptionnelles.

La taille des ARNt varie d'environ 60 (chez certains ARNt mitochondriaux) à une centaine de nucléotides (pour les ARNt ayant une longue boucle variable). Ils adoptent une structure secondaire canonique en feuille de trèfle (Figure 19A) mettant en évidence leurs différents domaines: un bras accepteur qui porte la séquence simple brin CCA, site d'attachement de l'acide aminé. Une boucle TΨC qui est le domaine le plus conservé chez les ARNt, une boucle DhU qui contient le dihydrouridine, une région variable dont la longueur varie selon les deux classes d'ARNt. Enfin, une boucle de l'anticodon qui porte le triplet de nucléotide appelé l'anticodon. Cette séquence est comprise entre les nucléotides 34 et 36. Ces trois nucléotides sont complémentaires au codon présent sur l'ARNm.

La structure tridimensionnelle de l'ARNt en forme de « L » (Figure 19B.C) a été déterminée grâce aux structures cristallographiques d'ARNt. Elles montrent que certains des résidus sont impliqués dans des interactions tertiaires, en plus des interactions secondaires, donnant un repliement tridimensionnel en forme de "L". La forme "L" présente une branche acceptrice, issue du repliement des bras accepteur et du bras TΨC ainsi qu'une branche de l'anticodon issue du repliement du bras accepteur et du bras DhU.

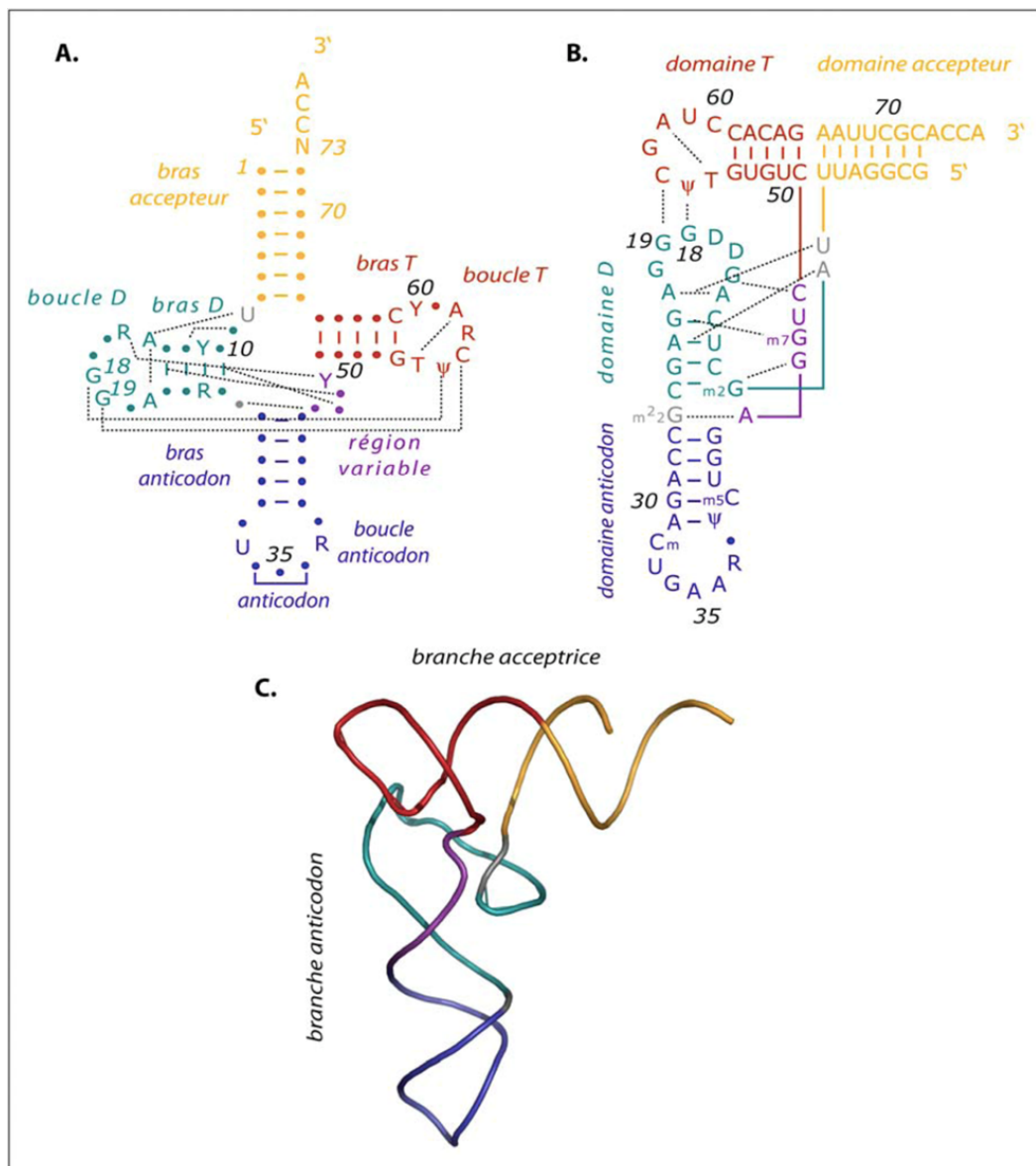


Figure 19. La structure des ARNt: Les ARNt sont généralement représentés par leur structure secondaire sous forme de feuille de tréfle (A) ou sous forme de « L » (B, C). La forme 3D (C) est issue des associations tertiaires au sein des structures (A) et (B). Ces interactions sont représentées en lignes continues et discontinues.

La sélection des ARNt est le résultat d'interactions spécifiques entre l'ARNt et sa synthétase homologue. Ces interactions sont médiées par des éléments positifs qui définissent la reconnaissance et sont appelés "déterminants d'identité". Des interactions non spécifiques entre l'ARNt et une synthétase non homologue sont empêchées par des éléments négatifs qui définissent le rejet, ils sont appelés "anti-déterminants d'identité" (Giegé *et al*, 1998). De manière générale, la structure en "L" des ARNt permettrait la présentation correcte de ces éléments à l'enzyme. Les structures tridimensionnelles de complexes aaRS-ARNt montrent

que cette interaction conduit à des changements conformationnels de l'ARNt au niveau de l'extrémité acceptrice et de la boucle de l'anticodon (Rould *et al*, 1989). La majorité de ces déterminants d'identité se situent dans ces régions de l'ARNt et la plupart d'entre eux ne sont pas nécessairement conservés d'un ARNt à un autre. Ces signaux peuvent être un nucléotide, dont très souvent le N73, une paire de base, souvent parmi les 5 dernières paires de bases de la tige acceptrice, un motif structural particulier comme la boucle D et la région variable de l'ARNt^{Phe} (Perret *et al*, 1992), ou encore la modification post-transcriptionnelle d'une base comme celle en position 34 de l'ARNt^{Ile} chez *E. coli* (Muramatsu *et al*, 1988).

3. L'organisation modulaire et structure des aaRS

Les aaRS sont des enzymes modulaires de tailles, de structures oligomériques et de séquences en acides aminés très hétérogènes. La taille des sous-unités chez *E. coli* varie de 344 pour la TrpRS à 951 aa pour la ValRS (Freist *et al*, 1997; Shiba *et al*, 1997).

Les structures quaternaires des aaRS sont composées de monomères (α), d'homodimères et de tétramères (α_2 , α_4) mais aussi d'hétérotétramères ($\alpha_2\beta_2$). L'AlaRS est un tétramère α_4 alors que la PheRS adopte une structure tétramérique $\alpha_2\beta_2$ pour l'enzyme cytoplasmique chez tous les organismes procaryotes et eucaryotes connues, alors que la forme mitochondriale chez la levure et l'homme est sous forme de monomère (Bullard *et al*, 1999).

Elles sont globalement composées de deux modules principaux: le premier est le domaine catalytique (CAT) "ancestral", qui est le siège de l'activation et du transfert de l'acide aminé. Le second est un domaine de liaison de l'anticodon de l'ARNt "Anticodon-Binding Domain" (ABD) (Figure 20). La réaction d'aminacylation n'est efficace que lorsque ces deux domaines sont liés de manière covalente (Zhang & Hou, 2005). Aux deux domaines fonctionnels peuvent s'ajouter une soixantaine de modules peptidiques additionnels de structures variées en C- ou N-terminal. Ils sont impliqués dans les fonctions canoniques des aaRS ou encore confèrent de nouvelles propriétés à l'enzyme, indépendantes de la synthèse protéique (O'Donoghue & Luthey-Schulten, 2003; Schimmel & dePouplana, 1999; Wolf *et al*, 1999).

Les modules additionnels chez les eucaryotes confèrent la possibilité d'une forte liaison aux acides nucléiques et sont souvent impliqués dans la rétention de l'ARNt. Effectivement, ces domaines fusionnés ne vont pas déformer ou réorienter les complexes aaRS-ARNt mais augmenter le taux "on" et diminuer le taux "off" de l'association avec

l'ARNt (Kaminska *et al*, 2001; Morales *et al*, 1999). Pour exemple, le motif "coiled-coil" est retrouvé en N- ou C-terminal des GluProRS, GlyRS, HisRS, TrpRS, ProRS, GluRS et MetRS (Cahuzac *et al*, 2000) et des séquences riches en lysine à l'extrémité N-terminale des AspRS et LysRS d'eucaryotes (Francin *et al*, 2002; Frugier *et al*, 2000).

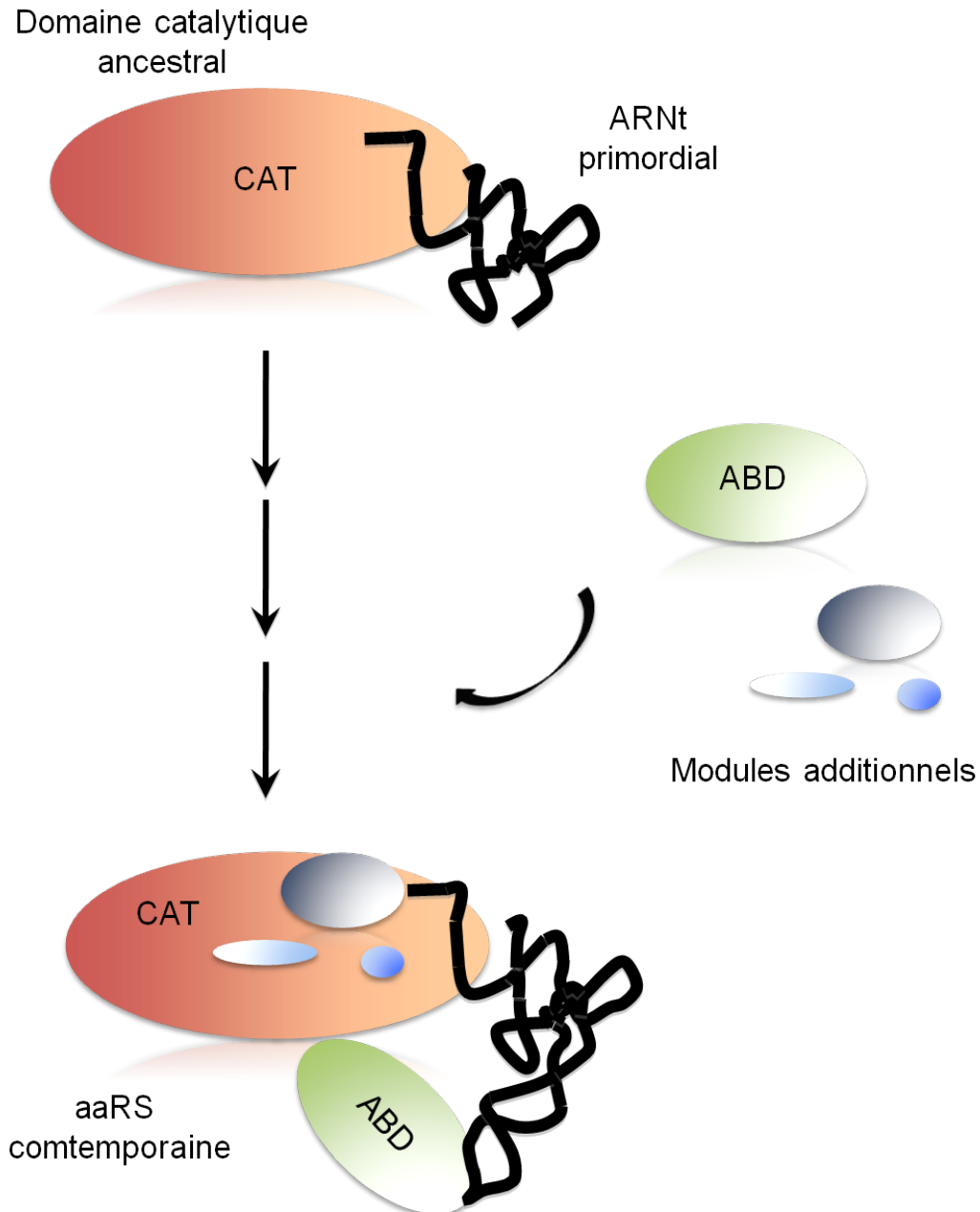


Figure 20. Evolution des aaRS: La forme ancestrale des aaRS consiste en un domaine catalytique (CAT), auquel se serait ajouté le domaine de liaison de l'ARNt (ABD) au cours de l'évolution ainsi que d'autres domaines additionnels, de façon concomitante à l'évolution de l'ARNt.

4. Les classes des aminoacyl-ARNt synthétases

De part leur grande variabilité, de nombreuses études tentèrent d'unifier la famille des aaRS en cherchant des corrélations structurales et fonctionnelles. Les aaRS ont pu être divisées en deux grandes classes I et II de 10 membres chacune (Figure 21) selon la présence de motifs peptidiques mutuellement exclusifs en séquence d'acides aminés (Arnez & Moras, 1997; Cusack, 1997; Eriani *et al*, 1990). Cette division reflète des topologies structurellement distinctes de leur site catalytique (Figures 21, 22).

	Classe I		Classe II	
Principales caractéristiques				
Motifs conservés				
Liaison au substrat	HIGH KMSKS		Motif 2: ...FRxE Motif 3: ... (Gx)3ER... Motif 1: ...P...	
Dimérisation				
Repliement du site actif	Feuillet β parallèle (repliement De Rossman)		Feuillet β anti-parallèle	
Conformation de l'ATP	Etendue		Repliée	
Liaison à l'ARNt				
Bras accepteur	Sillon mineur		Sillon majeur	
Boucle variable	Face au solvant		Face à la protéine	
Site d'aminocyclation	2'OH		3'OH	
	Sous-classe Ia		Sous-classe IIa	
	ValRS	α	SerRS	$\alpha 2$
	IleRS	α	ThrRS	$\alpha 2$
	LeuRS	α	ProRS	$\alpha 2$
	MetRS	$\alpha 2$	GlyRS	$\alpha 2 \beta 2$
	CysRS	α	HisRS	$\alpha 2$
	ArgRS	α	Sous-classe IIb	
	Sous-classe Ib		AspRS	$\alpha 2$
	TyrRS	$\alpha 2$	LysRS	$\alpha 2$
	TrpRS	$\alpha 2$	AsnRS	$\alpha 2$
	Sous-classe Ic		Sous-classe IIc	
	GluRS	α	PheRS	$\alpha 2 \beta 2$
	GlnRS	α	AlaRS	$\alpha 4$

Figure 21. Classification des aaRS: Les deux classes des aaRS sont représentées avec les membres de chaque famille, leurs caractéristiques et les sous classes.

a. La classe I

Les aaRS de ce groupe sont pour la plupart monomériques ou homodimériques. Le domaine catalytique des enzymes de la classe I est constitué par une cage $\alpha/\beta/\alpha$ et d'un cœur interne formé par cinq brins β parallèles. Il est appelé "domaine de Rossmann". Il est connu pour être un élément de liaison des nucléotides. Ce dernier a été caractérisé lors de la résolution de la première structure d'aaRS, la TyrRS de *Bacillus stearothermophilus* (Brick & Blow, 1987).

Les synthétases de ce groupe présentent deux motifs consensus HIGH (His-Ile-Gly-His) et KMSKS (Lys-Met-Ser-Lys-Ser). Ces motifs sont des éléments cruciaux dans la structure du site actif pour la synthèse de l'aminocyl-adenylate.

Les aaRS de classe I approchent l'ARNt du côté du petit sillon et catalysent l'attachement de l'acide aminé en position 2' OH de l'adénosine A76 terminale de l'ARNt (Figures 21,22A).

Les aaRS de la classe I sont divisées en 3 sous-classes à partir d'alignement des séquences (Cusack *et al*, 1991; Eriani *et al*, 1990). La répartition des différentes aaRS est basée sur des similarités de séquences. Elle est corrélée avec la classification des acides aminés qu'elles fixent. La classe Ia (MetRS, IleRS, LeuRS, ValRS, CysRS, ArgRS) regroupe les aaRS spécifiques des acides aminés hydrophobes, la classe Ib (GluRS, GlnRS) est spécifique quant à elle d'un acide aminé chargé et de son dérivé amide, tandis que la dernière sous classe Ic est spécifique des acides aminés aromatiques, regroupant les TyrRS et TrpRS. Ces dernières sont dimériques et cette dimérisation est essentielle à leur activité enzymatique (Brick *et al*, 1989; Doublie *et al*, 1995).

b. La classe II

Les enzymes de classe II sont multimériques, essentiellement dimériques à l'exception de la PheRS mitochondriale humaine et de levure qui est monomérique. Contrairement à la classe I, la structure du site catalytique des aaRS de classe II ne possède pas de domaine de Rossmann. Il se replie en un feuillet de 9 brins β antiparallèles entourés par des hélices α . Elles ne sont pas caractérisées par un haut degré de similarité mais partagent trois motifs plus ou moins

conservés: les motifs 1, 2 et 3. Le motif 1 participe à la dimérisation et est caractérisé par la présence d'une proline invariable. La substitution de ce résidu affecte l'activité catalytique ainsi que la dimérisation des monomères. Les motifs 2 et 3 participent à la formation du site catalytique et présentent chacun une arginine dans un contexte précis (Figures 21,22B).

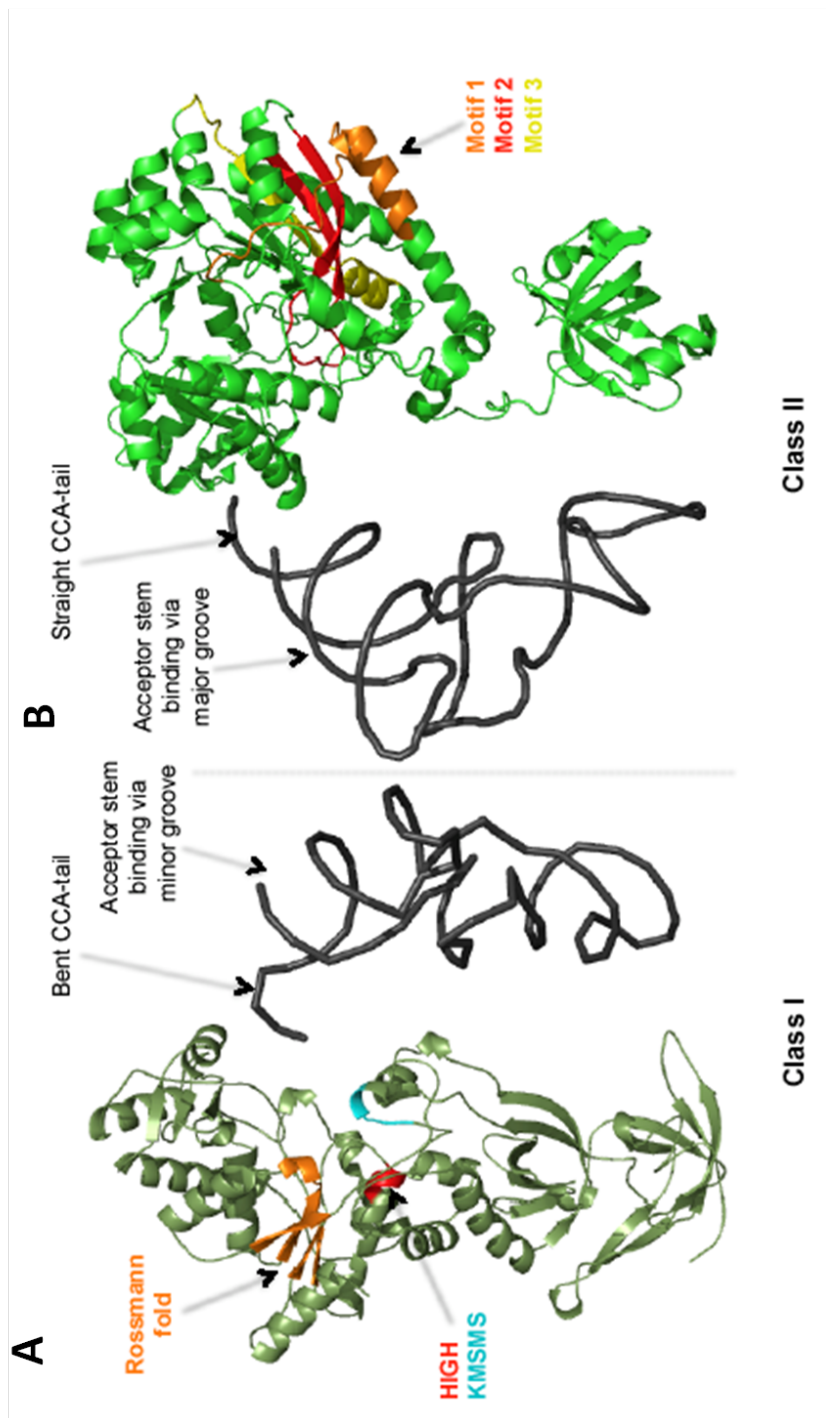


Figure 22. Les deux classes des aminoacyl-ARNt synthétases: L'organisation structurale et les modes d'interaction avec l'ARNt des aaRS des deux classes sont représentés. Les structures tridimensionnelles de la GlnRS, classe I (A) et de l'AspRS classe II (B) d'*E coli* sont représentées.

Tout comme les aaRS de classe I, les enzymes de classe II peuvent être subdivisés en 3 groupes d'après leur similarité de séquence. Les aaRS de la sous classe IIa ont la même organisation en feuillet β de leur domaine C-terminal à l'exception de la SerRS. Les trois aaRS de la sous classe IIb conservent la même organisation de leur domaine de liaison à l'anticodon de l'ARNt en tonneau β . Enfin, la classe IIc est constituée par défaut des synthétases ne répondant pas aux critères (structure oligomérique non conservée) (Figure 21).

Les synthétases de classe II ainsi que la TyrRS et la TrpRS de la classe I fixent l'acide aminé sur le 3'OH du ribose de l'adénosine terminale de l'ARNt. Elles fixent l'ARNt par le grand sillon à l'exception de la PheRS et fixent l'ATP sous sa forme coucée.

B. Formation de complexes multiprotéiques chez les eucaryotes

L'évolution moléculaire des aaRS eucaryotiques se traduit par l'acquisition de modules protéiques. Elles sont sous forme d'extensions polypeptidiques localisées généralement aux extrémités N- ou C-terminales de ces enzymes. Elles ont des tailles variables allant de 50 à 200 résidus. Ces domaines sont parfois impliqués dans le renforcement de l'interaction des synthétases avec leur ARNt homologue. Elles peuvent aussi être engagées dans des interactions protéine-protéine avec les autres constituants de la machinerie de synthèse des protéines.

1. Chez la levure : Le complexe Arc1p/MetRS/GluRS

Ce complexe est retrouvé chez *Saccharomyces cerevisiae*. Il est composé de trois protéines: la protéine Arc1p "Aminoacyl tRNA synthetase Cofactor 1 Protein" et les synthétases MetRS et GluRS (Simos *et al*, 1996a) (Figure 23A,B). Arc1p interagit avec les deux synthétases par son domaine N-terminal. Les MetRS et GluRS s'y lient également via leurs extensions N-terminales (Figure 23B). Ces interactions sont nécessaires et suffisantes pour former ce complexe (Galani *et al*, 2001). Arc1p est composée de trois régions, une partie N-terminale responsable de l'interaction avec MetRS et GluRS mais aussi de deux autres parties: M et C-terminale. Le domaine M est riche en lysines. Il est décrit comme pouvant lier les ARNt mais sans spécificité. La région C-terminale est un domaine EMAPII-like, pouvant lier spécifiquement les ARNt (Simos *et al*, 1998). Arc1p libre peut se lier à une large panoplie d'ARNt tandis que quand elle est en complexe, celui-ci lie uniquement les ARNt^{Met} et ARNt^{Glu} *in vitro* (Deinert *et al*, 2001) et *in vivo* (Simos *et al*, 1996a). L'activité catalytique des

synthétases est augmentée de 100 fois pour la MetRS (Simos *et al*, 1996a) et 10 fois pour la GluRS dans le complexe avec Arc1p (Graindorge *et al*, 2005). Arc1p joue également un rôle dans la localisation cytoplasmique du complexe (Golinelli-Cohen & Mirande, 2007). Effectivement, la GluRS mitochondriale est maintenue dans le cytoplasme par sa liaison à Arc1p qui constitue une plateforme subcellulaire. C'est un nouveau mécanisme de régulation de la localisation cytoplasme/mitochondrie qui piège la forme mitochondriale de la GluRS dans le cytoplasme (Frechin *et al*, 2009).

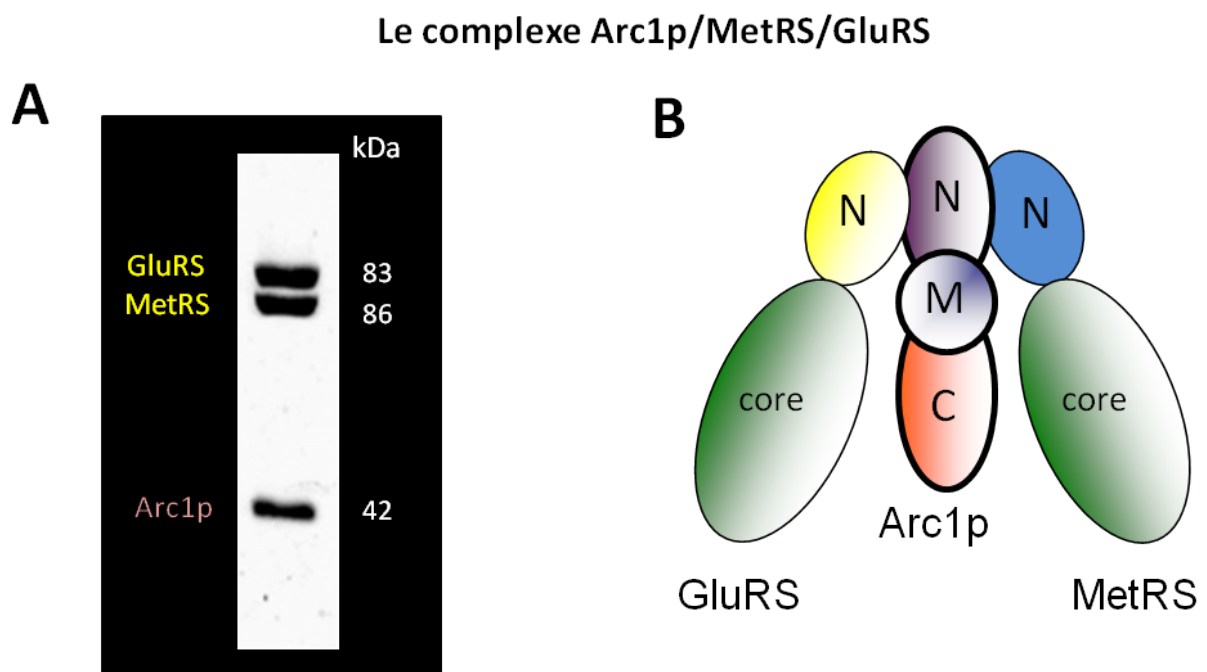


Figure 23. Structure du complexe Arc1p/MetRS/GluRS: (A) Composition polypeptidique du complexe. (B) Modèle de l'organisation du complexe.

2. Chez les mammifères

Chez les mammifères, deux types d'assemblages supramoléculaires ont été retrouvés, il s'agit du complexe multisynthétase MARS regroupant 9 synthétases, et du complexe VEGA comprenant une seule synthétase la ValRS (Cirakoglu *et al*, 1985a). Ces associations sont impliquées directement dans l'organisation cellulaire de la traduction dans les cellules des eucaryotes supérieures (Mirande, 2005).

a. Le complexe multisynthétase MARS

MARS pour "Multi-Aminoacyl-tRNA Synthetases complex" contient 11 composants avec des masses moléculaires apparentes allant de 20 à 171 kDa. Les 9 synthétases qui forment MARS sont les ArgRS, AspRS, GluRS, GlnRS, IleRS, LeuRS, LysRS, MetRS et la ProRS. Trois autres polypeptides qui ne sont pas des synthétases sont également retrouvés dans ce complexe. Ils sont nommés selon leur masse moléculaire: p43, p38 et p18 (Figure 24A) (Mirande, 2005).

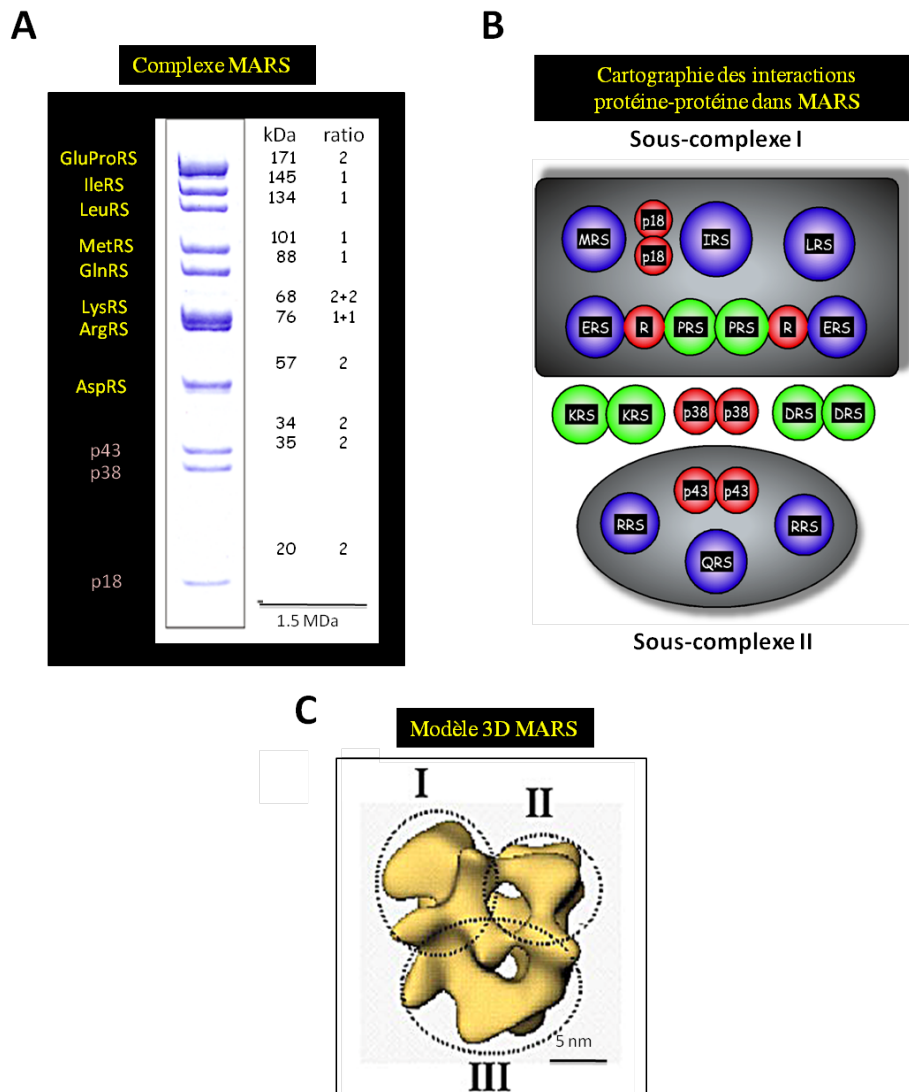


Figure 24. Complexe multisynthétases MARS: (A) Le complexe MARS a été purifié à partir de foies de lapin. Les 9 synthétases et 3 protéines non synthétases sont séparées sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. La taille et le ratio de chaque composant sont représentés. (B) Une cartographie des interactions protéiques entre les différents composants a été proposée (Kaminska *et al*, 2009). (C) modèle tridimensionnel du complexe obtenu par cryoEM (Wolfe *et al*, 2005).

MARS a été isolé à partir de tissus et d'organismes différents avec un ratio constant des 11 polypeptides. Les interactions entre les protéines de MARS ont été étudiées par double hybride, co-sédimentation, « pull down », des méthodes de pontages covalents, et une cartographie des interactions protéine-protéine a été proposée (Figure 24B). A ce jour, la structure à haute résolution de ce complexe n'est pas connue à cause de sa grande taille. Un modèle a été obtenu par microscopie électronique (Figure 24C). MARS y apparaît comme une particule dont les paramètres sont 190x160x100 Å (Wolfe *et al*, 2005).

La protéine p38 a été caractérisée comme la protéine d'échafaudage du complexe. Des expériences par double hybride montrent que p38 peut interagir avec la plupart des composants du complexe (Quevillon *et al*, 1999). Des études *in vitro* montrent que les partenaires de la protéine p38 interagissent avec différentes régions de cette dernière (Robinson *et al*, 2000). En absence de p38, deux sous-complexes stables peuvent se former *in cellulo* (Kaminska *et al*, 2009). Le sous-complexe I contient les GluProRS, IleRS, LeuRS, MetRS et p18. Le sous-complexe II contient les ArgRS, GlnRS et p43 (Figure 24).

La protéine p43, protéine homologue d'Arc1p de levure, a deux fonctions principales au sein de MARS. C'est un élément structural important pour la formation du sous-complexe II. Les premiers 106 acides aminés de la partie N-terminale de p43 sont nécessaires pour l'association au complexe (Kaminska *et al*, 2009). p43 confère également la capacité d'interaction aux ARNt. Les données suggèrent qu'il agit comme cofacteur en trans de l'aminacylation de l'un des composants de MARS comme Arcp1 chez la levure (Guigou *et al*, 2004). En C-terminal de p43 est retrouvé un domaine EMAPII qui est décrit comme une cytokine proinflammatoire (Shalak *et al*, 2001).

La protéine p18 est quant à elle nécessaire pour l'ancrage de la MetRS dans MARS (Kaminska *et al*, 2009). En dehors du complexe MARS, p18 peut interagir avec l'ATM kinase. Cette dernière est impliquée dans la régulation du suppresseur de tumeur p53 (Park *et al*, 2005).

b. Le complexe VEGA "ValRS/EF1H "

Le deuxième complexe identifié dans les cellules eucaryotiques est le complexe ValRS/EF1H. Il est composé de la ValRS et de la forme lourde du facteur d'élongation 1 de la traduction (Bec *et al*, 1989; Jiang *et al*, 2005) (Figure 25A). EF1H est un complexe

tétramérique formé de 4 sous-unités A, B α , B β et B γ avec un ratio 2:1:1:1 (Janssen *et al*, 1994). Le complexe ValRS/EF1H a une masse de 700 kDa, il contient deux monomères de ValRS et deux modules de EF1H (Figure 25B). Les sous-unités EF1B sont fortement attachées à la ValRS, tandis que l'association avec EF1A est transitoire. La ValRS est associée à EF1H via son domaine GST-like (retrouvé en N-terminal) à la sous unité EF1B β (Bec *et al*, 1994). L'organisation structurale tridimensionnelle du complexe VEGA a été étudiée par microscopie électronique (Jiang *et al*, 2005). Ses dimensions sont de 120x80 Å (Figure 25C).

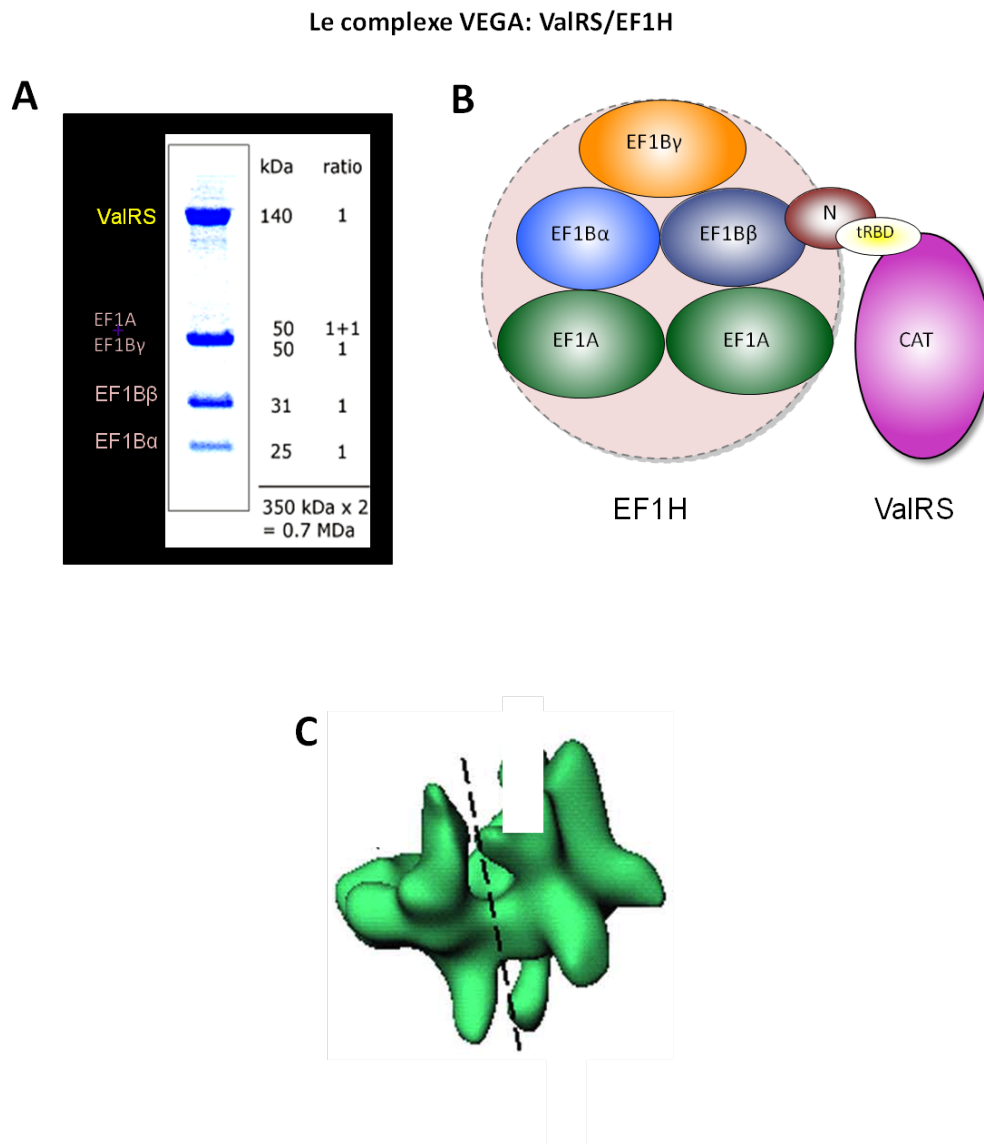


Figure 25. Structure du complexe VEGA: (A) Composition polypeptidique du complexe. (B) Modèle de l'organisation du complexe VEGA. (C) L'organisation structurale tridimensionnelle du complexe VEGA a été étudiée par microscopie électronique (Jiang *et al*, 2005).

C. L'évolution et les rôles non canoniques des aaRS

Les aaRS sont des enzymes très étudiées. Elles constituent une famille de protéines intéressantes car elles sont impliquées dans de nombreux mécanismes. En effet, bien que leur rôle principal opère lors de l'amination des ARNt, ces enzymes ubiquitaires montrent un rôle essentiel dans d'autres fonctions cellulaires. Ci-dessous sont indiqués quelques un des rôles non canoniques des aaRS comme l'épissage, la régulation de l'expression génique ou la transduction du signal (Figure 26).

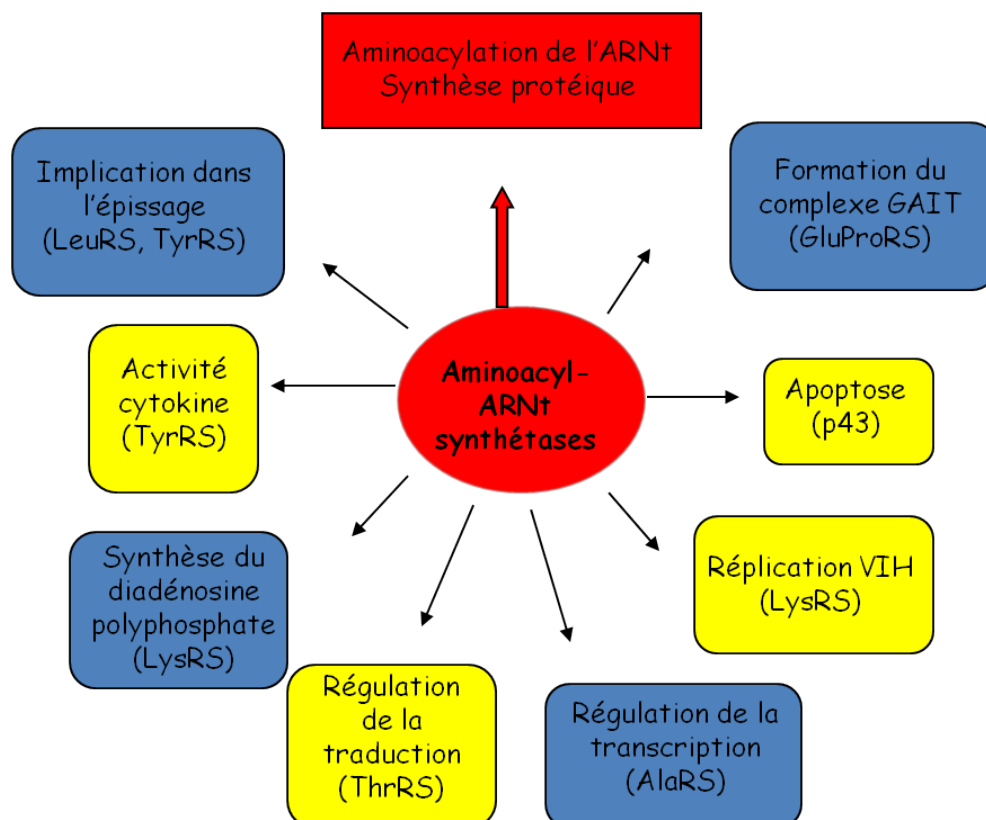


Figure 26. Rôles non canoniques des aaRS: Les aaRS interviennent à de nombreux niveaux dans la cellule, quelques exemples sont cités sur ce schéma mais leur fonction principale reste l'amination lors de la synthèse protéique.

1. Les aaRS et la régulation de leur propre expression

Certaines aaRS se lient spécifiquement à leur ARNm ou à l'ADN et régulent leur propre expression à différents stades.

a. La ThrRS et la régulation au niveau de la traduction

La ThrRS d'*E. coli* régule sa propre expression au niveau de la traduction. Elle se lie à deux domaines repliés en épingle à cheveux de l'opérateur de l'ARNm. Ces domaines séparément vont mimer la tige boucle de l'anticodon de l'ARNt^{Thr} (Romby *et al*, 1996). L'enzyme va réprimer sa propre traduction en inhibant la liaison du ribosome à l'ARNm grâce à une compétition pour la fixation des ribosomes et de la ThrRS sur l'ARNm (Sacerdot *et al*, 1998).

b. L'AlaRS et la régulation au niveau de la transcription

L'AlaRS d'*E. coli* se lie à une séquence palindromique sur le promoteur de son propre gène, *alaS*, et réprime la transcription *in vitro* (Putney *et al*, 1981). La PheRS de *T. thermophilus* a également été retrouvée comme pouvant se lier spécifiquement à l'ADN, les implications fonctionnelles de cette interaction sont indéfinies (Lechler & Kreutzer, 1998).

2. Les LeuRS, TyrRS et leur implication dans l'épissage

Les LeuRS et TyrRS sont essentielles pour l'épissage de certains introns mitochondriaux. Ces aaRS favorisent le repliement des introns dans les pré-ARNm pour leur conférer une structure catalytiquement active. Trois synthétases mitochondriales facilitent l'épissage des introns (Lambowitz & Perlman, 1990). Il s'agit de la TyrRS de *Neurospora crassa* (Akins & Lambowitz, 1987) et de *Podospora anserina* (Kamper *et al*, 1992) ainsi que de la LeuRS de *S. cerevisiae* (Labouesse, 1990). Le rôle de la LeuRS dans la levure semble être tout à fait distinct de celui de la TyrRS dans *N. crassa* où un domaine particulier contribue à l'épissage (Cherniack *et al*, 1990).

3. La TyrRS, et son activité cytokine

La TyrRS humaine peut être divisée en deux cytokines bien distinctes résultantes des domaines N et C-terminaux (Wakasugi & Schimmel, 1999a; Wakasugi & Schimmel, 1999b). L'enzyme native est inactive pour une large variété d'activités de cytokine. Les dérivés cytokines de la TyrRS sont libérés après clivage de l'enzyme native en un site situé entre les deux domaines. Le domaine EMAP II-Like "Endothelial-Monocyte Activating Polypeptide II" C-terminal (Kleeman *et al*, 1997) perd son rôle dans l'aminoacylation mais lorsqu'il est libéré du domaine N-terminal, il présente une activité chimiotactique leucocytaire et

monocytaire significative. Le domaine C-terminal libéré va induire la production de myeloperoxydase, de TNF α et des facteurs tissulaires.

4. La GluProRS et la formation du complexe GAIT

La GluProRS est une synthétase atypique. Elle est composée de deux synthétases bien distinctes, la GluRS et la ProRS, reliées entre-elles par des domaines répétés. En plus de l'aminacylation, cette aaRS joue un rôle clé dans la régulation de la traduction de certains ARNm. Suivant la réponse à l'interféron, la GluProRS est capable de contrôler l'expression de l'oxydase ou de la céruloplasmine (Cp), ce qui limite la réponse inflammatoire (Sampath *et al*, 2004).

Il a été démontré que la GluProRS est le composant principal du complexe GAIT "interferon-Gamma-Activated Inhibitor of Translation". Ce complexe inhibe la traduction de la Cp, une protéine plasmatique synthétisée et sécrétée par les hépatocytes et qui active les macrophages. Le traitement des cellules par INF- γ induit la phosphorylation et la libération de la GluProRS du complexe MARS. Elle va se lier à la ribonucléoprotéine NSAP1 et former le précomplexe GAIT. Ce précomplexe est incapable d'inhiber la traduction de Cp, il requiert la liaison de deux composants additionnels; la protéine ribosomale L13a et la GAPDH "Glyceraldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase". Le complexe GAIT formé peut alors se lier à la région 3'-UTR de l'ARNm de Cp et bloquer sa traduction (Sampath *et al*, 2004).

5. Les protéines non catalytiques de MARS, rôles non canoniques

La protéine p43 porte un domaine EMAP2 en C-terminal. EMAP2 est décrit comme étant une cytokine proinflammatoire. Il active la migration chimiotactique des granulocytes polymorphonucléaires et des phagocytes mononucléaires. Il induit également l'activité de facteurs tissulaires dans les cellules endothéliales (Kao *et al*, 1992). Lors de l'apoptose, ce domaine C-terminal de p43 est clivé, donnant une cytokine active. Ce processus bloque la machinerie traductionnelle et initie l'apoptose dans les cellules (Shalak *et al*, 2007; Shalak *et al*, 2001).

La protéine p38 est impliquée dans la maladie de Parkinson. Il a été démontré que Parkin, une protéine-ubiquitine ligase E3 interagit avec p38 et provoque son ubiquitinylation et sa dégradation (Corti *et al*, 2003). La délétion du gène de p38 cause la létalité néonatale

chez la souris. Une étude a démontré les mécanismes moléculaires sous-jacents de la létalité des mutants p38. Les souris déficientes présentent des défauts dans la différenciation des poumons et le syndrome de détresse respiratoire (Kim *et al*, 2003). p38 lie le facteur activateur de c-myc3, qui est le FBP « FUSE-binding protein » et cause son ubiquitinylation puis sa dégradation. c-myc (requis pour la différenciation des cellules alvéolaires de type II) sera sous régulé.

La protéine p18 interagit avec la protéine kinase ATM qui est impliquée dans l'activation du suppresseur de tumeur p53 (Park *et al*, 2005). Plus récemment, la structure tridimensionnelle de p18 a été déterminée (Kim *et al*, 2008). Comme suggéré précédemment (Quevillon & Mirande, 1996), p18 adopte une conformation GST-like, et est composée de deux domaines. Les données cristallographiques suggèrent que p18 peut rentrer dans deux types d'interactions qui impliquent deux interfaces: une similaire à ce que l'on observe dans un dimère de GST, et une seconde qui ressemble à l'interaction entre GluRS et Arc1p dans le complexe Arc1p/MetRS/GluRS.

6. La LysRS et la synthèse du diadénosine polyphosphates

La LysRS est requise pour la synthèse d'un diadénosine polyphosphate, le 5', 5'-diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) qui est une molécule de signalisation intracellulaire. Dans les cellules souches, l'Ap₄A est un régulateur négatif de la formation des complexes protéiques Hint-MITF ou Hint-USF2. La dissociation de Hint de MITF ou USF2 permet à ces facteurs de transcription d'initier la transcription de leurs gènes cibles en réponse à un stimulus spécifique. Ces données suggèrent que la LysRS est un régulateur positif des facteurs de transcription via l'Ap₄A dans les cellules eucaryotes (Lee *et al*, 2004; Yannay-Cohen *et al*, 2009).

La LysRS sous forme libre est six fois plus active dans la production de Ap₄A que lorsqu'elle est liée à MARS (Wahab & Yang, 1985). Une étude plus récente montre que dans des cellules immunoactivées, la LysRS est phosphorylée sur la Ser²⁰⁷ d'une manière MAPK dépendante, elle est dissociée de MARS et transloquée vers le nucléole où elle régule l'activité des deux facteurs de transcription.

Comme détaillé dans la partie III, la LysRS est impliquée dans un autre mécanisme cellulaire. Lors de l'infection des lymphocytes par le VIH-1, la LysRS est détournée de sa voie naturelle et sera l'un des maillons importants de la réplication du virus.

III. La Lysyl-ARNt synthétase et la réplication du VIH-1

A. Généralités sur la Lysyl-ARNt synthétase (LysRS)

1. La LysRS est de classe I ou de classe II

La LysRS est un membre spécial parmi la famille des synthétases. Elle est retrouvée dans les deux classes (LysRSI, LysRSII). La majorité des bactéries et tous les eucaryotes contiennent la LysRSII. Tandis que la majorité des archaea et quelques bactéries contiennent la LysRSI. Chez les bactéries, la LysRSI est retrouvée uniquement chez certaines espèces pathogènes, comme les spirochètes : *Borrelia burgdoferi* et *Treponema pallidum*. Chez les archaea, la forme majoritaire est l'enzyme de classe I comme chez *Methanococcus maripaludis* ou *Methanococcus jannaschii* (Ibba *et al*, 1997a; Ibba *et al*, 1997b).

Les caractérisations fonctionnelles et structurales ont montré que les LysRS de classe I et II sont fonctionnellement équivalentes mais structuralement différentes. Le fait que ces deux formes ne partagent pas la même séquence, elles peuvent néanmoins reconnaître les mêmes substrats, acide aminé et ARNt (Figure 27A.B). Elles représentent un exemple de convergence dans l'évolution (Terada *et al*, 2002). La LysRSII aborde l'hélice acceptrice de l'ARNt^{Lys} par le sillon opposé par rapport à la LysRSI.

2. La LysRS bactérienne

La LysRS bactérienne est essentiellement de classe II. Chez *E coli*, elle est codée par deux gènes distincts: *lysS* et *lysU*. Le gène *lysS* est constitutivement exprimé. Le gène *lysU* par contre, est surexprimé en conditions de stress physiologique de type choc thermique (Clark & Neidhardt, 1990). La LysRS bactérienne est composée de 504 acides aminés divisés en deux domaines, un domaine ABD N-terminal en tonneaux β et un domaine CAT C-terminal plus large portant les trois motifs signature caractéristiques de la classe II des synthétases (Figure 28). Les deux LysRS issues des deux gènes ont 88% d'identité de séquence, et ont des activités catalytiques similaires. Les éléments majeurs d'identité de la reconnaissance de l'ARNt^{Lys} sont les bases U₃₅U₃₆ de l'anticodon ainsi que la base A73 chez

E. coli (Commans *et al*, 1998). La structure 3D des deux LysRS bactériennes a été déterminée. La structure de la LysRS (LysS) a été résolue à 2.7 Å pour une forme libre de la synthétase ou en complexe avec son substrat, la lysine (Onesti *et al*, 2000). La comparaison des deux structures montre un changement conformationnel lors de la liaison de la lysine.

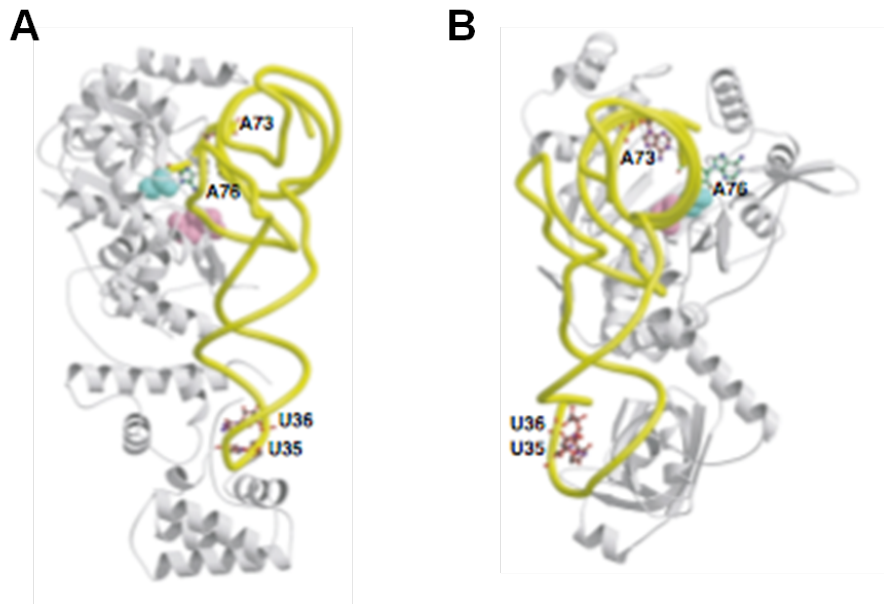


Figure 27. Convergence structurale de modules structurellement différents: (A) Modèle d'interaction avec l'ARNt de la LysRSI de *P. horikoshii*. (B) Modèle d'interaction avec l'ARNt de la LysRSII d'*E. coli*. Les LysRS sont en gris et l'ARNt en jaune. Les résidus mentionnés sont les déterminants d'identité de l'ARNt^{Lys}.

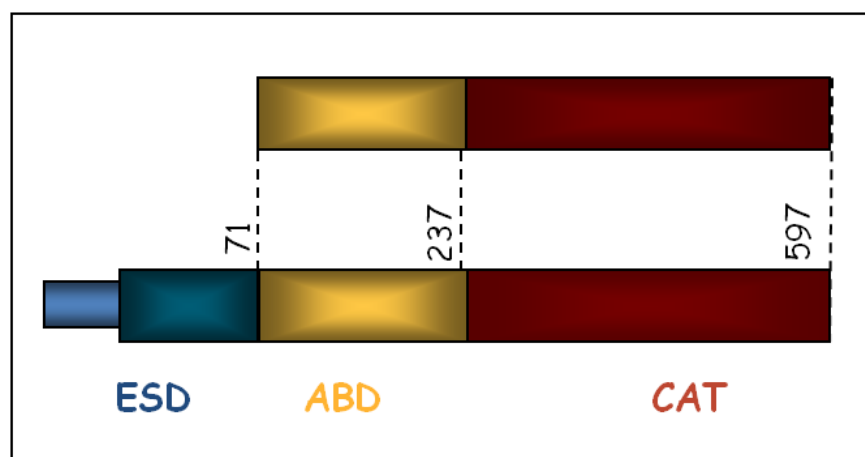


Figure 28. Les lysyl-ARNt synthétases bactérienne et eucaryotique: La forme eucaryotique possède en plus une extension de 70 aa en N-terminal par rapport à son homologue bactérien.

3. La LysRS humaine

a. La Fonction et la structure

Comme cité dans les paragraphes précédents, la LysRS eucaryotique aminoacyle trois isoformes d'ARNt^{Lys}: l'ARNt₁^{Lys}, l'ARNt₂^{Lys} et l'ARNt₃^{Lys}. Elle fait partie de la sous classe IIb des aminoacyl-ARNt synthétases qui regroupe l'AspRS et l'AsnRS. Elle a 43% d'identité de séquence avec la forme d'*E.coli*. La LysRS est l'une des neuf synthétases retrouvées dans le complexe MARS. Elle interagit directement avec la protéine p38 (Kaminska *et al*, 2009; Quevillon *et al*, 1999; Robinson *et al*, 2000).

Elle est composée du domaine catalytique CAT de 360 acides aminés, retrouvé en C-terminal et d'un domaine ABD de 167 acides aminés. La LysRS des eucaryotes possède une extension polypeptidique N-terminale, module supplémentaire retrouvé uniquement chez les eucaryotes et absent chez les LysRS procaryotiques. L'extension eucaryotique est un polypeptide de 71 acides aminés (Figure 28, 29). Ce domaine est appelé ESD "Eukaryotic Specific Domain", il est formé en majorité d'hélices α amphiphiles.

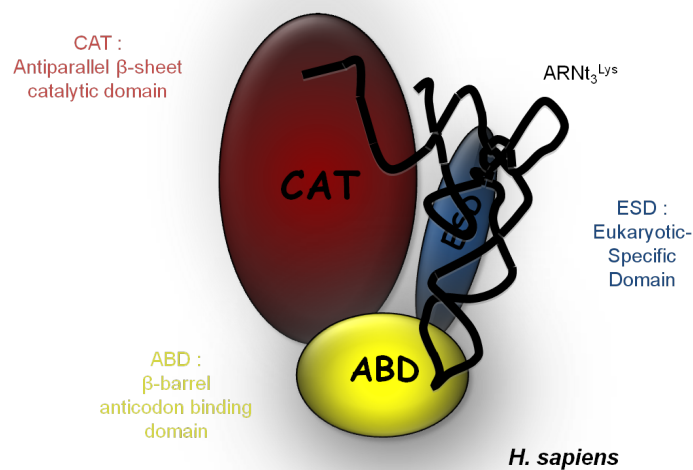


Figure 29. Modèle d'interaction de la LysRS humaine avec l'ARNt^{Lys}: La LysRS humaine est formée de trois modules; le domaine catalytique, le domaine de liaison de l'ARNt et l'extension N-terminale spécifique des eucaryotes.

b. Les propriétés de l'extension N-terminale de la LysRS humaine

Les affinités de liaison de l'ARNt₃^{Lys} des formes complètes et tronquées de la LysRS humaine ont été déterminées par des expériences de retard sur gel. L'interaction de la forme ΔN-LysRS à l'ARNt₃^{Lys} est 100 fois plus faible que celle de la forme native (Francin *et al*, 2002). Les constantes de dissociation apparentes sont de 60 nM et 6 μM pour la LysRS et la ΔN-LysRS respectivement.

Ces données combinées aux analyses de l'activité d'aminocyclation démontrent clairement que l'extension N-terminale est un nouveau domaine de liaison de l'ARNt (Figure 29). La délétion de cette extension ne change pas les valeurs de k_{cat} et de K_M pour la lysine et l'ATP dans la réaction d'activation de l'acide aminé, suggérant que le site actif de la LysRS n'est pas significativement affecté par cette délétion. Par contre, le K_M pour l'ARNt₃^{Lys} est 3.9 fois plus élevé pour la forme tronquée comparée à la forme sauvage. L'efficacité catalytique (k_{cat}/K_M) a été déterminée en utilisant de l'ARNt₃^{Lys} humain, transcrit et purifié *in vitro*. Elle est 3 fois plus importante pour la forme sauvage que celle obtenue pour la forme tronquée. En conclusion, ces données montrent que l'extrémité N-terminale additionnelle de la LysRS eucaryotique est un module fonctionnel de liaison de l'ARNt^{Lys} (Francin *et al*, 2002).

De part sa forme allongée, l'extension N-terminale de la LysRS optimise l'association entre la LysRS et l'ARNt^{Lys}. Des minihélices synthétiques mimant les domaines accepteur et de l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys} ont été utilisés pour des expériences de retard sur gel. Ces études montrent une association fonctionnelle entre l'AccLys et la LysRS. Cette association n'est pas observée dans le cas de la ΔN-LysRS. Cette dernière est incapable d'aminocycler la minihélice mimant le bras accepteur de l'ARNt, suggérant l'importance de l'acquisition au cours de l'évolution de l'extension eucaryotique. Elle va promouvoir le positionnement du CCA de l'extrémité 3' de l'ARNt dans le site actif de l'enzyme (Francin *et al*, 2002).

c. Le motif de liaison de l'ARNt

L'analyse des séquences de l'extension N-terminale de la LysRS montre qu'elle est riche en résidus lysine et arginine, ces derniers lui confère un caractère basique. Pour pouvoir identifier les résidus de l'extension N-terminale impliqués dans la liaison avec l'ARNt, des LysRS mutantes ont été construites par le remplacement des lysines et des arginines par des alanines. Un motif de liaison a été déterminé, il s'agit des résidus suivants [KxxxK(K/R)xxK]

(Figure 30). Ce motif lie non spécifiquement la tige boucle TΨC du domaine accepteur de l'ARNt et confère la capacité la liaison de l'ARNt à l'enzyme (Francin & Mirande, 2003).

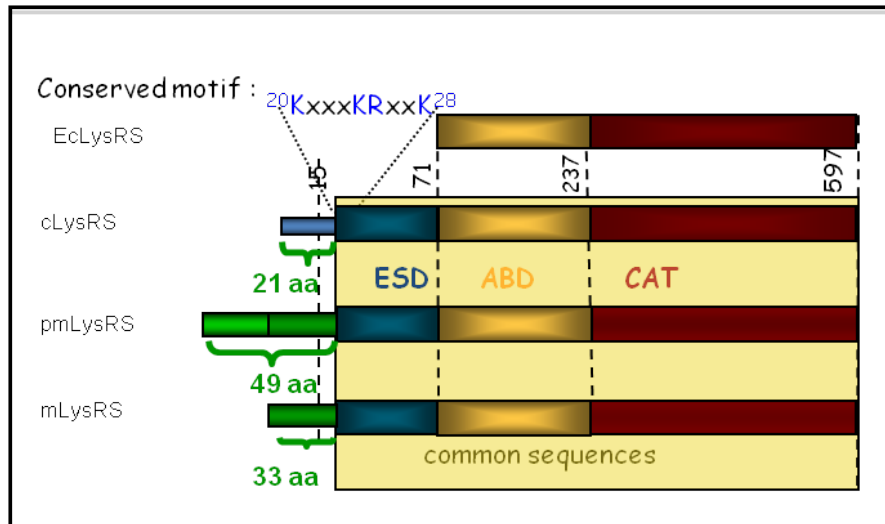


Figure 30. Les différentes formes de la lysyl-ARNt synthétase: trois formes de LysRS sont retrouvées chez l'homme. Un site potentiel de maturation de la forme prémitochondriale était prédit après le 16^{ème} résidu.

Ce motif peut être généralisé aux enzymes de la classe II. Des études sur l'AspRS cytoplasmique de levure (Frugier *et al*, 2000) ont démontré que l'extension N-terminale de l'AspRS participait à l'interaction avec l'ARNt. Une séquence de 11 résidus riche en lysine (29)LSKKALKKLQK(39) a été identifiée. Cette donnée a été généralisée à tous les membres de la sous classe IIb par une comparaison de séquences de ces trois synthétases eucaryotiques (AspRS, LysRS et AsnRS), et un consensus xSKxxLKKxxK a été dégagé pour ces synthétases de la classe IIb.

Des travaux beaucoup plus récents sur l'AsnRS (Crepin *et al*, 2011) ont déterminé la structure par RMN des 75 premiers résidus de l'extension N-terminale de l'AsnRS de *Brugia malayi*. Elle contient le motif "xSKxxLKKxxK" des synthétases de la classe IIb décrit précédemment. Ce domaine N-terminal contient une région structurée avec un nouveau dispositif de repliement, il est riche en lysines et il a été démontré par RMN comme interagissant avec le bras accepteur de l'ARNt. Ces données viennent compléter celles obtenues pour l'AspRS et la LysRS déterminant ainsi la structure de l'extrémité N terminale (Figure 31).

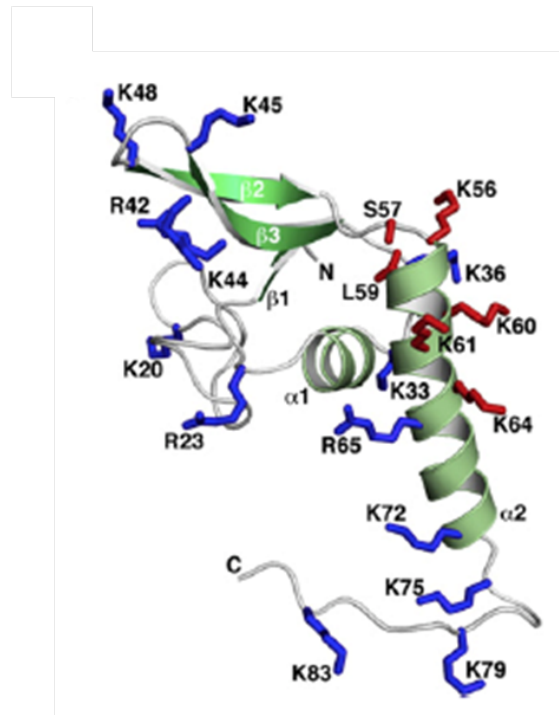


Figure 31. L'extension N-terminale de l'AsnRS: Le motif $^{55}\text{SKxxLKKxxK}^{64}$ est représenté en rouge.

4. La Lysyl-ARNt synthétase mitochondriale humaine

Le gène de la LysRS humaine est localisé sur le chromosome 16q23, sa taille est de 20 kpb (exons et introns). Il est composé de 15 exons, les deux premiers exons localisés dans la région amont du gène déterminent, par épissage alternatif du pré-messager, la synthèse de deux ARNm spécifiant la forme cytoplasmique ou mitochondriale de la LysRS. Elles sont appelées cLysRS ou pmLysRS, respectivement (Figure 32, 33A). La majeure partie de ces deux formes enzymatiques, à savoir les domaines CAT, ABD et la majeure partie de l'extension N-terminale est commune. Les extrémités N-terminales sont différentes par leurs tailles et leurs séquences (Figure 33,B).

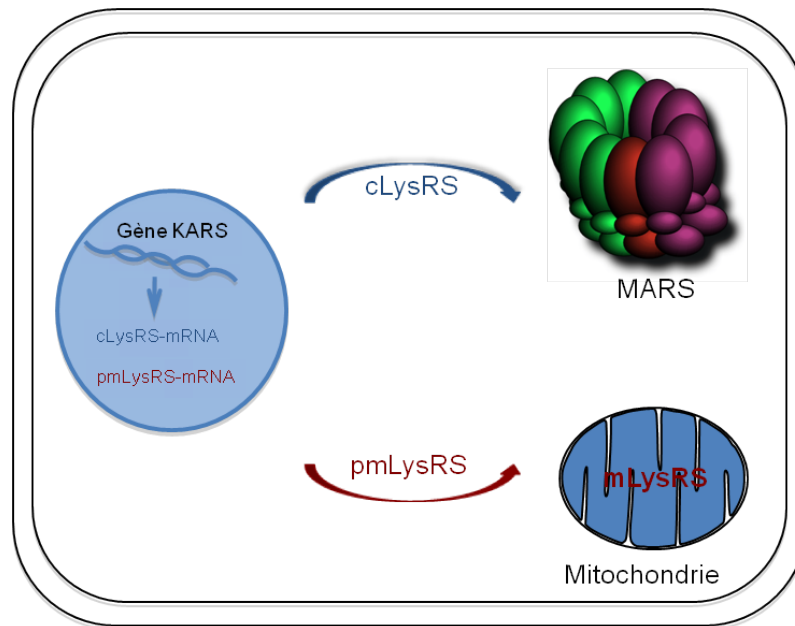
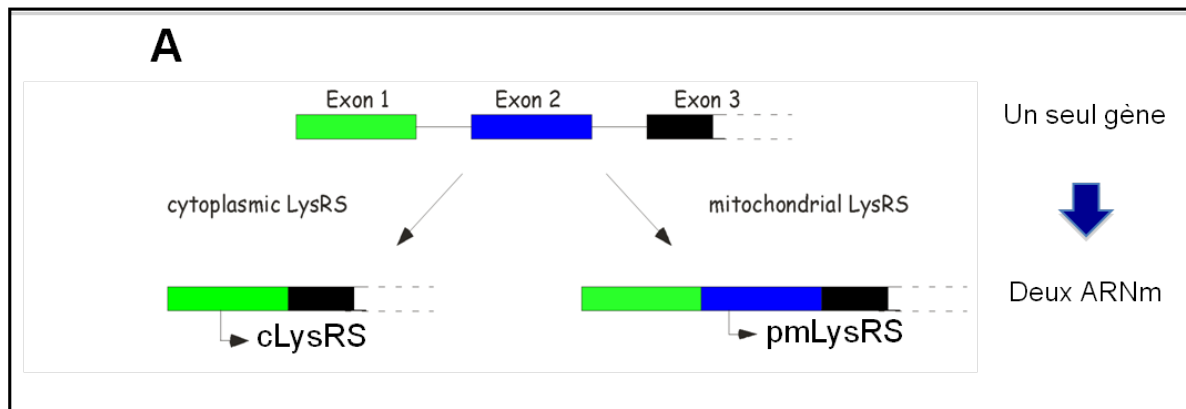


Figure 32. Gène KARS et la localisation subcellulaire des LysRS : L'épissage alternatif des ARNm issus du gène KARS donne les deux formes cLysRS et pmLysRS. La cLysRS rejoint le complexe MARS tandis que la pmLysRS sera dirigée vers la mitochondrie où elle sera maturée et donnera la forme mature mLysRS.



B

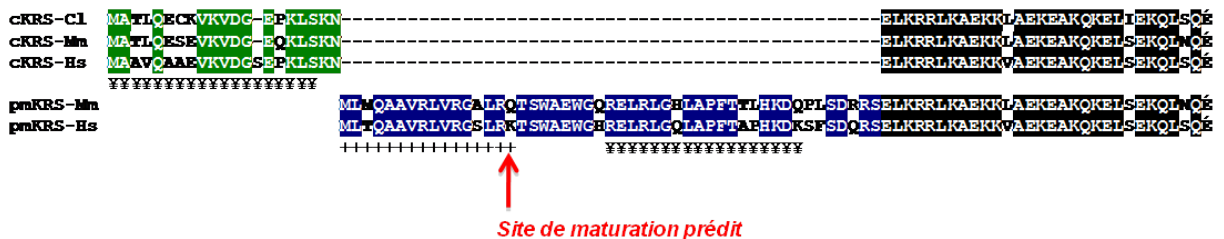


Figure 33. Les différentes formes de la lysyl-ARNt synthétase: (A) L'épissage alternatif des ARNm issus du gène KARS donnent les deux formes cLysRS et pmLysRS. (B) La composition en acides aminés des extrémités N terminales de chaque forme est montrée. Les régions qui ont servi à la synthèse des anticorps spécifiques de

chaque forme sont soulignés par des pointillés (Kaminska *et al*, 2007b). Le site putatif de maturation de la pmLysRS est également indiqué. Les séquences des LysRS de hamster (Cl), de souris (Mm) et de l'homme (Hs) sont indiquées.

Pour la forme cLysRS, les 21 acides aminés de l'extrémité N-terminale sont issus du démarrage de la traduction dans l'exon 1 lorsque l'exon 2 est enlevé par épissage alternatif. Pour le cas de la forme pmLysRS, composée de 49 acides aminés spécifiques en N-terminal, le démarrage de la traduction dans l'exon 1 est abortive, au niveau d'un codon stop localisé en 5' de l'exon 2, et un autre démarrage de la traduction localisé dans l'exon 2, est utilisé pour générer la forme prémitochondriale de l'enzyme. Un site potentiel de maturation de la pmLysRS après translocation dans la mitochondrie a été proposé (Figure 33,B), conduisant à la délétion des 16 résidus N-terminaux qui sont le peptide putatif d'adressage mitochondrial. La forme mitochondriale mature est appelée mLysRS (Kaminska *et al*, 2007a; Tolkunova *et al*, 2000) (Figure 30,33B). Le site exact de coupure et de maturation n'était pas déterminé, nous avons entrepris l'étude de la maturation de la pmKRS. Les résultats seront présentés dans le chapitre II de cette thèse.

B. Rôle de la LysRS dans l'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys} dans les particules du VIH-1

Comme indiqué dans la première partie de cette introduction, la LysRS humaine est requise pour le transport de l'ARNt₃^{Lys} dans les particules du VIH-1 sous forme de complexe LysRS-ARNt₃^{Lys}. Ce complexe est dévié de sa voie naturelle dans la cellule infectée et dirigé vers le site d'assemblage des virions. Il sera encapsidé en même temps que les composants viraux lors du bourgeonnement. Ce complexe serait associé à une ou plusieurs protéines virales permettant son acheminement dans les particules virales naissantes.

1. Le rôle du précurseur GagPol

La polyprotéine GagPol est requise pour l'encapsidation de l'ARNt^{Lys} dans les GagVLPs ou dans les particules virales du VIH-1 (Mak *et al*, 1994). Plus spécifiquement, le domaine structural thumb (TH) de la RT joue un rôle important dans l'interaction entre GagPol et l'ARNt^{Lys} (Khorchid *et al*, 2000). Les études antérieures suggéraient que bien que GagPol semble jouer un rôle dans l'incorporation de l'ARNt^{Lys}, la protéine Gag pourrait être suffisante pour l'incorporation des ARNt^{Lys} dans les GagVLPs. Cette sélection n'est pas directe, mais serait médiée par des interactions spécifiques avec la LysRS (Javanbakht *et al*, 2003). Gag a lui seul semble suffisant pour encapsider la LysRS dans les GagVLPs (Cen *et al*, 2001) et GagPol serait requis quant à lui pour l'incorporation des ARNt^{Lys} (Mak *et al*, 1994).

L'encapsidation des trois isoformes d'ARNt^{Lys} requiert l'interaction avec la LysRS (Cen *et al*, 2004) mais pas l'aminoylation de ces derniers (Javanbakht *et al*, 2002).

Les domaines d'interaction entre Gag et la LysRS ont été déterminés. Des données publiées suggéraient que le motif 1 de la LysRS et le domaine C-terminal de la protéine CA seraient responsables de cette interaction (Javanbakht *et al*, 2003). Ces régions sont impliquées dans l'homodimérisation de ces deux protéines. Des études ont démontré que la dissociation des homodimères LysRS et CA est nécessaire à l'interaction entre ces deux protéines (Kovaleski *et al*, 2006; Kovaleski *et al*, 2007), suggérant la possibilité de formation d'hétérodimères Gag/LysRS *in vivo*. Au vue de la stabilité des dimères de LysRS (Cirakoglu & Waller, 1985b; Robinson *et al*, 2000), ce modèle semblait peu probable. D'autre part, l'association CA:LysRS semblait être peu spécifique par rapport à CA:TrpRS pris comme couple contrôle dans ces expériences (Kovaleski *et al*, 2006).

2. La source de LysRS encapsidée dans les particules virales

Tous les résultats rapportés dans le paragraphe 1 ci-dessus ont porté sur la forme cytoplasmique de la LysRS, cLysRS, forme qui semblait être encapsidée dans le virus (Cen *et al*, 2001). Les anticorps utilisés pour identifier la LysRS dans les virus étaient dirigés contre la LysRS cytoplasmique. Ils reconnaissent les 576 acides aminés communs aux espèces cytoplasmique et mitochondriale de LysRS et ne permettent donc pas de discriminer ces deux formes.

D'autres expériences ont montré que la surexpression exogène de la cLysRS dans des cellules transfectées par le VIH-1 conduit à son encapsidation dans les virions (Gabor *et al*, 2002; Guo *et al*, 2003). Dans ces conditions d'expression ectopique, la cLysRS cellulaire n'est plus entièrement associée à MARS et pourrait devenir une cible pour l'une des protéines virales. En effet, aucune des protéines se trouvant avec la cLysRS au sein de MARS n'est retrouvée dans les particules virales.

Au laboratoire, il a été démontré que c'est la forme mitochondriale de LysRS qui est la source de la LysRS virale (Kaminska *et al*, 2007a; Kaminska *et al*, 2007b). Des anticorps dirigés contre les extensions N-terminales spécifiques de chaque forme cLysRS et mLysRS montrent que, dans les virions du VIH-1, seule la forme mitochondriale est détectée.

Nous avons donc ré-analysé les interactions potentielles entre les deux formes de LysRS et la protéine GagPol pour déterminer si cette association est sélective de l'une de ces deux formes. Ces résultats seront décrits dans le chapitre I. Ils montrent que la région Pol du précurseur GagPol forme une pince moléculaire, les domaines TF et IN interagissant avec le domaine catalytique de la LysRS. Dans le chapitre III, nous avons mis en jeu l'ensemble des protéines virales du VIH-1 pour identifier d'autres partenaires potentiels de la LysRS.

CHAPITRE I

**Etude de l'association entre la LysRS mitochondriale
humaine et le précurseur GagPol du VIH-1**

CHAPITRE I : ETUDE DE L'ASSOCIATION ENTRE LA LysRS MITOCHONDRIALE HUMAINE ET LE PRECURSEUR GagPol DU VIH-1

Comme décrit dans l'introduction, l'ARNt₃^{Lys} sert d'amorce à la transcription inverse du génome du VIH-1. L'initiation de cette étape débute dans les particules virales avant infection de nouvelles cellules d'où la nécessité d'encapsider l'amorce cellulaire. Les travaux de l'équipe de Kleiman avaient montré que l'ARNt₃^{Lys} était encapsidé en même temps qu'une forme de LysRS qui avait été attribuée à la LysRS cytoplasmique (Cen *et al*, 2001). Ces études avaient suggéré que l'encapsidation de la LysRS se faisait via la formation d'un complexe entre la LysRS et les précurseurs Gag et GagPol via la région C-terminale du domaine CA de Gag (Javanbakht *et al*, 2003).

Compte tenu des données actuelles montrant que la forme de LysRS encapsidée dans les virions est la forme mitochondriale de l'enzyme (Kaminska *et al*, 2007a), nous avons re-analysé *in vitro* les associations possibles entre les différentes espèces de LysRS et la polyprotéine GagPol et ses domaines.

I. Description des protéines utilisées dans cette étude

A. Les précurseurs Gag et GagPol

1. Le décalage du cadre de lecture -1 et la traduction de GagPol

Comme décrit précédemment, les régions codantes *gag* et *pol* du génome du VIH-1 sont codées par un même gène. La région *pol* n'est pas exprimée en tant que telle, mais sous forme de fusion avec *gag*. La traduction de l'ARNm spécifiant la protéine Gag s'arrête normalement après la protéine p6. Pour qu'il y ait traduction de Pol, il faut qu'il y ait un événement de glissement du cadre de lecture de -1 qui s'opère avant la traduction de p6. La polyprotéine Pol n'est synthétisée que sous forme d'une protéine de fusion GagPol et fait appel à un phénomène de glissement du ribosome appelé décalage du cadre de lecture ou "frameshift" (Figure 34A). La traduction de cette autre cadre de lecture donne naissance à la protéine p6* (ou transframe) correspondant au polypeptide alternatif à p6.

Seule une petite portion des ribosomes effectue le frameshift en -1 pour l'expression de Pol (Ratner *et al*, 1985; Wain-Hobson *et al*, 1985). Le frameshift s'opère à un niveau de 5-10% de la synthèse de Gag (Jacks *et al*, 1988) assurant le maintien d'un ratio de 20 molécules de Gag pour une molécule de GagPol. Ce ratio 20:1 est critique pour la dimérisation de l'ARN génomique, l'assemblage viral, la réplication et l'infectiosité du virus (Park & Morrow, 1991). Le frameshift s'opère au niveau de deux séquences agissant en cis. Il s'agit de la séquence heptamérique UUU UUU A qui est hautement conservée, et une séquence en tige boucle de 12 pb. Les deux séquences sont séparées par 8 nucléotides (Biswas *et al*, 2004) (Figure 34B). Bien que le mécanisme exact du frameshift ne soit pas complètement compris, la fonction la plus probable de la structure secondaire est le ralentissement de la progression du ribosome et sa pause sur cette séquence pour qu'il puisse entamer la traduction de Pol.

1. L'encapsidation des précurseurs Gag et GagPol

Gag et GagPol sont synthétisés dans le cytoplasme de la cellule hôte, myristylés, puis transportés à la membrane plasmique où les particules virales seront formées. Gag est responsable du transport et de l'encapsidation de GagPol. Des études ont montré que Gag et GagPol non myristylés peuvent être encapsidés dans les virions si elles sont co-exprimées avec un Gag myristylé (Chen *et al*, 1997; Park & Morrow, 1991). Des analyses suggèrent que les polyprotéines Gag forment de petits multimères dans le cytoplasme et sont assemblées dans des complexes plus grands à la membrane cytoplasmique, incluant GagPol.

Gag contient plusieurs interfaces protéine:protéine qui promeuvent des interactions Gag:Gag. L'incorporation de GagPol lors de l'assemblage requiert des interactions avec les domaines CA de Gag et GagPol (Wills & Craven, 1991). Une incorporation efficace spécifique de GagPol se fait grâce au domaine "MHR" (Major Homology Region) de CA et à ses séquences adjacentes en C-terminal (Huang & Martin, 1997). Dans Pol, des séquences sont également importantes pour l'encapsidation de GagPol, elles sont situées dans le domaine N-terminal de RT (Bukovsky & Göttinger, 1996).

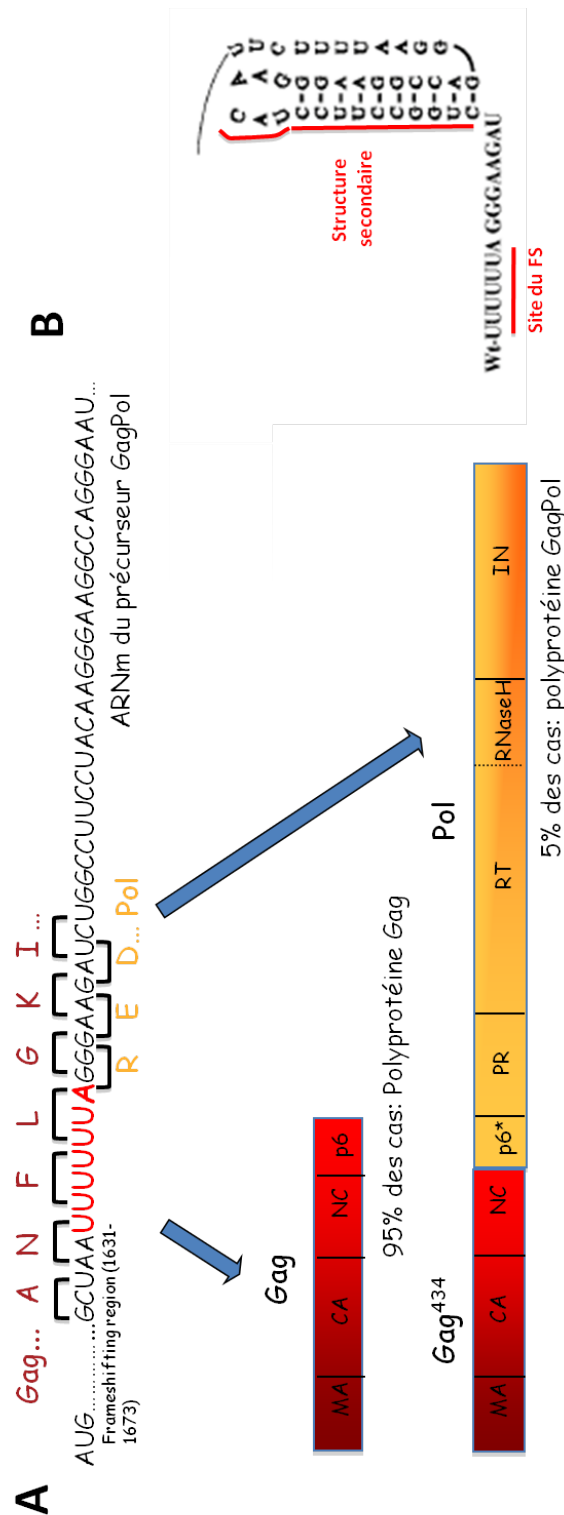


Figure 34. Traduction de la polyprotéine GagPol: (A): La polyprotéine GagPol est traduite grâce à un phénomène de décalage de cadre de lecture de type -1 et uniquement sous forme de protéine de fusion avec la partie Gag⁴³⁴ de Gag (correspond aux premiers 434 résidus de Gag) selon ce schéma. (B): La séquence où s'opère le frameshift est la séquence UUUUUUA. Elle est séparée de la tige boucle (seconde séquence du FS) par 8 nucléotides.

La polyprotéine Pol peut être encapsidée dans les particules virales à elle seule lorsqu'elle est exprimée hors du contexte de la protéine de fusion GagPol (Cen *et al*, 2004b). PR et IN ont été démontrés comme indispensables pour l'encapsulation de Pol tronquée dans les Gag-VLPs (Cen *et al*, 2004b). L'assemblage de Pol se fait à 70% par rapport au niveau d'assemblage de GagPol. C'est également le cas de Pol du virus de la leucémie murine de Moloney qui peut être encapsidée en dehors du contexte de GagPol. Ceci dit, l'activité de la RT y est diminuée dans les virions suggérant une déficience dans l'encapsulation de Pol (Buchsacher *et al*, 1999).

B. Les différentes LysRS et leurs domaines

Les différentes formes de la LysRS humaine partagent plusieurs domaines; le domaine catalytique (CAT) en C-terminal, le domaine de liaison de l'ARNt (ABD) et l'extension N-terminale spécifique des eucaryotes (ESD). Ces trois domaines sont composés de 576 acides aminés. De plus, la forme cLysRS possède une extrémité N-terminale spécifique composée des 21 acides aminés suivants: N-MAAVQAAEVKVDGSEPKLSKN (Figure 35). L'extension N-terminale spécifique de la forme pmLysRS est composée des 49 résidus N-terminaux spécifiques de cette forme:

N-MLTQAAVRLVRGSLRKTSWAEWGHRELRLGQLAPFTAPHKDKSFSDQRS.
L'ESD de la cLysRS contient le motif $^{20}\text{KxxxKRxxK}^{28}$ qui lui confère des propriétés de rétention de l'ARNt (Francin *et al*, 2002). La première lysine de ce motif est codée par le peptide N-terminal spécifique. La forme pmLysRS possède également ce motif sauf que la première lysine est remplacée par une arginine $^{48}\text{RxxxKRxxK}^{56}$. Le rôle potentiel des résidus spécifiques de l'extension de pmLysRS sur la fixation des ARNt n'était pas connu. La forme pmLysRS est maturée lors de sa translocation mitochondriale pour donner la forme mLysRS mature. Le site de maturation protéolytique de mLysRS n'était pas déterminé et sera analysé dans ce chapitre.

C. L'interaction entre cLysRS et p38 dans le complexe MARS

Il a été montré que dans le complexe MARS, la protéine p38 interagissait avec la LysRS mais aussi avec les GluProRS, GlnRS, ArgRS, AspRS et p43 (Quevillon *et al*, 1999). Les interactions qui impliquent p38 en tant que protéine d'échafaudage sont considérées comme des interactions centrales, en opposition aux interactions latérales entre les enzymes périphériques dans le complexe (Figure 36A). Les paramètres cinétiques de certaines de ces interactions ont été déterminés. La LysRS a une forte affinité pour p38, la constante de

dissociation K_d étant de l'ordre de 0.3 nM. Sa faible vitesse d'association (k_{on} de $90 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) est contrebalancée par une dissociation lente (k_{off} de $30 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$) (Robinson *et al*, 2000).

cKRS-Hs MAAVQAAEVKVDGSEPKLSKNELKRRLKAEKKVAEKEAKQKELSEKQLSQ...

pmKRS-Hs MLTQAAVRLVRGSLRKTSWAEWGHRELRLGQLAPFTAPHKDKSFSDQRSELKRRLKAEKKVAEKEAKQKELSEKQLSQ...

Figure 35. Les extrémités N-terminales des LysRS: Les séquences des extrémités N-terminales des cLysRS-Hs et pmLysRS-Hs sont représentées sur la figure. Les acides aminés en vert représentent les résidus spécifiques de la forme cytoplasmique tandis que ceux qui sont en bleu sont spécifiques de la forme prémitochondriale. En rouge est représenté le motif $^{20}\text{KxxxKRxxK}^{28}$ retrouvé dans la cLysRS. Pour la pmLysRS le résidu K à la position 20 est remplacé par une R. Les autres acides aminés en violet représentent les résidus basiques de l'extension N-terminale de la pmLysRS.

La relativement faible vitesse d'association observée pourrait être due à un besoin de changement de conformation du site de fixation de la LysRS à p38 induit après son interaction à p38 (Robinson *et al*, 2000). Il a également été démontré que la délétion de l'extension polypeptidique de la LysRS n'avait aucune conséquence sur son association à p38.

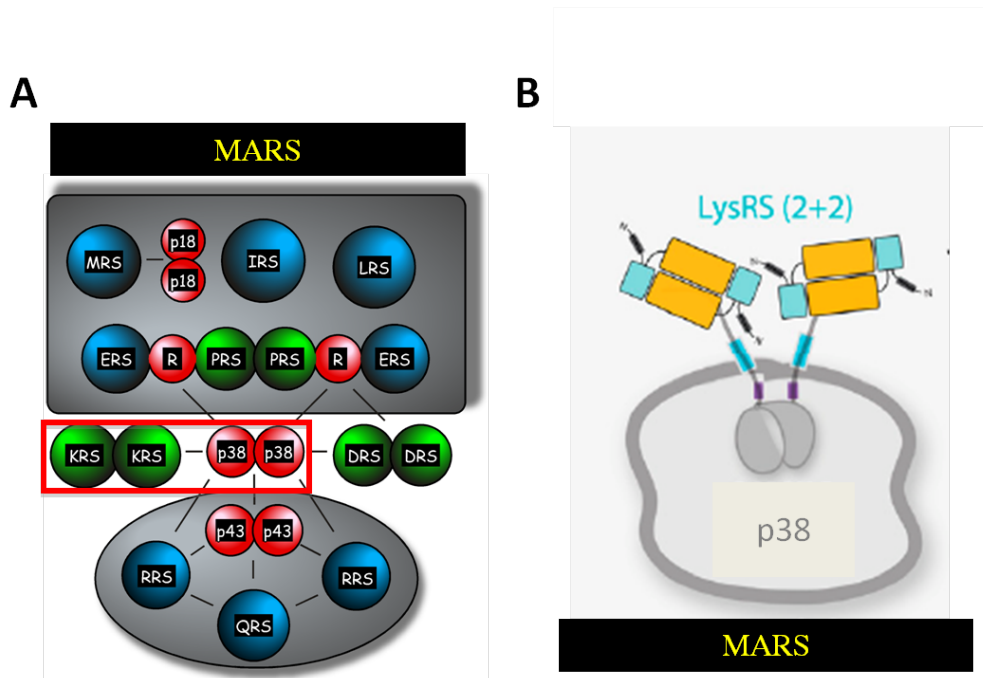


Figure 36. Interaction entre la LysRS et la protéine p38: (A): L'association de cLysRS au sein de MARS se fait grâce à des interactions avec p38. (B): La protéine p38 est dimérique. Chaque monomère de p38 s'associerait à un dimère de LysRS (Feng *et al*, 2011).

Basée sur ces résultats, une étude plus récente propose un modèle d'architecture du complexe LysRS-p38 au sein de MARS. Ce complexe serait sous forme $\alpha_2\beta_1:\alpha_2\beta_1$. Deux dimères de LysRS (α_2)₂ seraient juxtaposés et retenus dans une configuration parallèle. Chaque peptide N-terminal d'un monomère de p38 se lierait à un dimère de LysRS (Fang *et al*, 2011).

D. Parenté structurale entre la LysRS et l'AspRS

Les AspRS et LysRS font partie de la même sous classe IIb des aminoacyl-ARNt synthétases et ont évolué à partir d'un ancêtre commun. Des similitudes entre ces deux protéines ont été observées par alignement de leurs séquences (Eriani *et al*, 1990). Cet alignement montre une forte similarité de séquence tout particulièrement dans l'extrémité C-terminale correspondant au domaine catalytique des deux enzymes (Figure 37A). Sur la figure 37 sont représentées les structures cristallographiques d'un monomère de la LysRS humaine (Guo *et al*, 2008) (Figure 37B) ainsi que d'un monomère de l'AspRS de levure (Ruff *et al*, 1991) (Figure 37C), révélant une très forte parenté structurale.

L'AspRS humaine étant la synthétase la plus proche possible de la LysRS, elle sera prise comme témoin de spécificité des interactions entre LysRS et protéines virales.

II. Etude du complexe d'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys}

A. L'importance de la LysRS et de l'espèce encapsidée dans les virions

Javanbakht et collaborateurs avaient montré que l'anticodon de l'ARNt₃^{Lys}, qui est aussi le principal déterminant de la reconnaissance des ARNt^{Lys} par la LysRS, est un déterminant crucial pour son encapsidation dans le VIH-1 (Javanbakht *et al*, 2002). Cet ARNt est retrouvé sous forme aminoacylée dans les particules virales. De plus, les taux de LysRS et d'ARNt₃^{Lys} dans les virions sont similaires: 20 molécules de chacun d'entre eux par virion. Ces données supportent un rôle important de la LysRS dans l'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys} (Javanbakht *et al*, 2002). Gabor et collaborateurs, ont également démontré que la LysRS était un facteur limitant dans l'incorporation de l'ARNt₃^{Lys} (Gabor *et al*, 2002). La surexpression de la LysRS amène à une incorporation deux fois plus grande des 3 isoformes d'ARNt^{Lys} dans les particules virales.

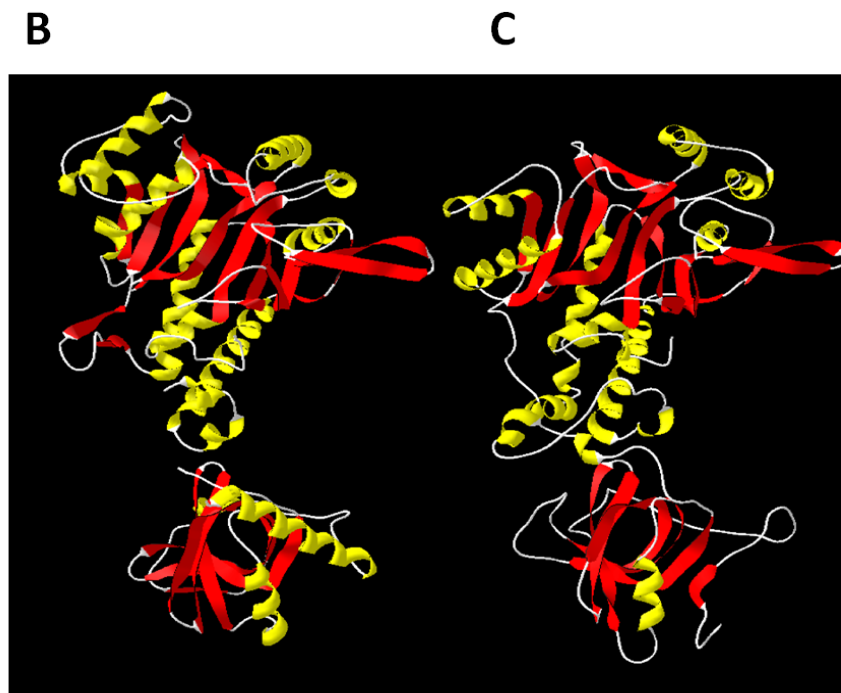
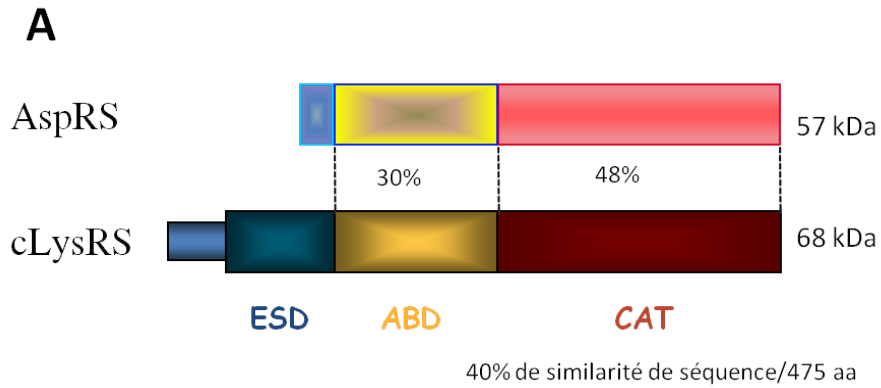


Figure 37. Comparaison entre les LysRS et AspRS: (A): Schéma mettant en évidence les formes complètes des deux enzymes cytoplasmiques chez l'homme. Les pourcentages indiquent les similarités de séquences au niveau des domaines catalytiques et de liaison à l'ARNt de ces enzymes. Les structures tridimensionnelles des (B) Hs-LysRS (Guo *et al*, 2008) et (C) Sc-AspRS (Ruff *et al*, 1991) sont indiquées.

C'est la présence du module N-terminal ESD qui renforce l'association "enzyme:ARNt" et qui permet à la LysRS de jouer le rôle de transporteur de l'un de ses substrats. En règle générale, une aminoacyl-ARNt synthétase a une activité moléculaire de l'ordre de 1 à 5, elle peut catalyser l'aminocyclation de 1 à 5 molécules d'ARNt par seconde. Deux situations peuvent à priori faciliter la fonction d'un enzyme dans le transport de l'un de ses substrats: lorsque la dissociation du produit de la réaction est l'étape limitante de la réaction catalytique; lorsque l'interaction avec un autre partenaire bloque l'étape de

dissociation du produit de la réaction. La séquence $^{20}\text{KxxxKRxxK}^{28}$ de cLysRS constitue un motif d'interaction protéine-ARNt qui procure un nouveau point d'encrage de l'ARNt sur l'enzyme et confère à l'enzyme une très forte affinité pour l'ARNt ($K_d = 60$ nM, contre plus de 1 μM pour la forme tronquée) (Francin & Mirande, 2003). La capacité d'encapsulation de l'ARNt₃^{Lys} dans les particules du VIH-1 par la LysRS met en jeu la faculté à former un complexe stable avec l'ARNt. En effet, une forme ΔN -LysRS dont le domaine N-terminal est tronqué et qui ne peut former qu'un complexe très transitoire avec l'ARNt (Francin et al, 2002; Francin & Mirande, 2003), n'est plus capable d'encapsider efficacement l'ARNt^{Lys} (Cen *et al*, 2004a). D'autre part si l'interaction LysRS:ARNt est déstabilisée par mutation des résidus U35 ou U36 de l'ARNt, le complexe ne se forme pas il n'y a pas d'encapsulation de ces ARNt mutants (Javanbakht *et al*, 2002). Par contre, une LysRS ayant perdu sa capacité à aminoacyler l'ARNt^{Lys} peut encore former un complexe stable si son extension N-terminale est présente, et conserve sa capacité d'encapsulation (Cen *et al*, 2004a).

Toutes les données qui avaient été obtenues jusqu'à présent sur l'encapsulation de l'ARNt₃^{Lys}, ne prenaient en compte que la cLysRS comme source de LysRS encapsidée. C'est le groupe de Kleiman qui, par un test immunochimique à l'aide d'anticorps contre la forme cytoplasmique, a démontré en premier la présence de LysRS dans les virions. Or, les anticorps polyclonaux dirigés contre la forme cytoplasmique reconnaissent la forme mitochondriale avec une efficacité similaire (Kaminska *et al*, 2007b) et dans les particules du VIH-1 aucune autre aaRS (IleRS, ProRS, TrpRS, ArgRS, GlnRS et la TyrRS) n'a été détectée (Javanbakht *et al*, 2003). Les expériences du groupe de Kleiman ne pouvaient pas distinguer entre les deux formes de LysRS retrouvées dans les particules virales et ce n'est que dans notre groupe, que Kaminska et collaborateurs ont pu démontrer la présence exclusive de la LysRS mitochondriale dans les particules virales en utilisant des anticorps monospécifiques (Kaminska *et al*, 2007b).

B. Gag n'est pas suffisant à l'encapsulation de l'ARNt₃^{Lys}

Les premières données indiquaient que le précurseur Gag était capable d'interagir avec la LysRS et le précurseur GagPol pouvait interagir avec l'ARNt₃^{Lys} (Gabor *et al*, 2002; Mak *et al*, 1994). Il a également été proposé que des interactions protéine-protéine entre Gag ou GagPol et la LysRS étaient requises pour l'encapsulation de l'ARNt₃^{Lys}. La surexpression de cLysRS dans une cellule humaine infectée par le VIH-1 suggérait qu'elle était capable d'interagir avec Gag et qu'elle était incorporée dans les particules virales (Cen *et al*, 2002;

Javanbakht *et al*, 2002). La constante de dissociation déterminée pour l'interaction de cLysRS avec Gag ($K_d \sim 300$ nM) suggère toutefois que cette association n'est pas hautement spécifique (Kovaleski *et al*, 2006). Ces données mettent en doute la participation de Gag dans l'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys} dans les particules virales.

III. Analyse du complexe d'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys}

Les expériences précédentes posent un grand nombre de questions concernant les mécanismes possibles de l'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys}. Les modèles actuels suggèrent que ce processus pourrait utiliser une ou plusieurs protéines virales comme transporteur, et la mLysRS comme co-transporteur. Pour mieux comprendre les modalités d'encapsidation de la LysRS dans les particules virales et la façon dont cette dernière est détournée de sa voie cellulaire, piégée puis transportée dans les virions, nous avons étudié son interaction avec les précurseurs Gag et GagPol. En effet, nous avons voulu savoir comment le complexe LysRS-ARNt₃^{Lys} est transporté dans le virus ? Nous avons voulu caractériser les interactions entre la LysRS et les protéines virales.

En premier lieu, nous nous sommes intéressés à Gag et GagPol car comme cité dans l'introduction, c'est Gag qui est directement impliqué dans le rassemblement des composantes virales à la membrane plasmique de la cellule lors de l'assemblage des nouveaux virions. Dans le but d'analyser les interactions potentielles entre les polyprotéines Gag, Pol ou GagPol et les différentes formes de LysRS, ainsi que de déterminer les domaines des deux partenaires mis en jeu, nous avons utilisé le système double hybride puis vérifié les interactions positives par immunoprécipitation.

A. L'approche du double hybride

Le système du double hybride dans la levure *S. cerevisiae* que nous avons utilisé a été développé par R. Brent et collaborateurs (Gyuris *et al*, 1993). Nous avons introduit les séquences codant pour les différentes protéines virales fusionnées au domaine de liaison à l'ADN LexA (DNA Binding Domain) dans le vecteur de levure pEG202 et exprimé les protéines LysRS et leurs domaines fusionnés au domaine activateur B42 (Activator Domain) dans le vecteur pJG4-5. Les gènes rapporteurs (LEU2 ou LacZ) qui contiennent les sites de liaison de LexA ont été introduits dans la souche de levure EGY48.

1. Description du système

Le gène *LEU2* du génome de EGY48 est utilisé comme gène rapporteur. En amont de *LEU2*, ont été introduit les séquences correspondant au site de liaison de l'opérateur LexA (LexAop) se trouvant à la place de la séquence activatrice naturelle. Le gène *LexAop-LEU2* n'est pas exprimé quand l'activateur de la transcription LexA-B42 n'est pas reconstitué (EGY48 est auxotrophe pour la leucine). Le plasmide pEG202 porte le gène de sélection *HIS3*. L'expression des protéines de fusion dans le plasmide pJG4-5, contenant aussi une séquence de localisation nucléaire et un épitope HA en plus du domaine activateur B42, est placé sous le contrôle du promoteur *GALI1*, il requière un milieu avec galactose pour être activé. Il porte également le gène de sélection *TRP1*. La souche de levure EGY48 a été transformée par les deux plasmides successivement. Nous avons utilisé le milieu minimum YNB avec galactose (YNB-Gal) pour initier l'expression des protéines de fusion, les protéines virales ProtVir-LexA et les LysRS-B42. Si les deux protéines interagissent cela va reconstituer le complexe ProtVir-LexA:LysRS-B42 qui va activer la transcription du gène rapporteur *LEU2*. Les cellules sont alors capables de pousser sur un milieu galactose sans leucine (Figure 38).

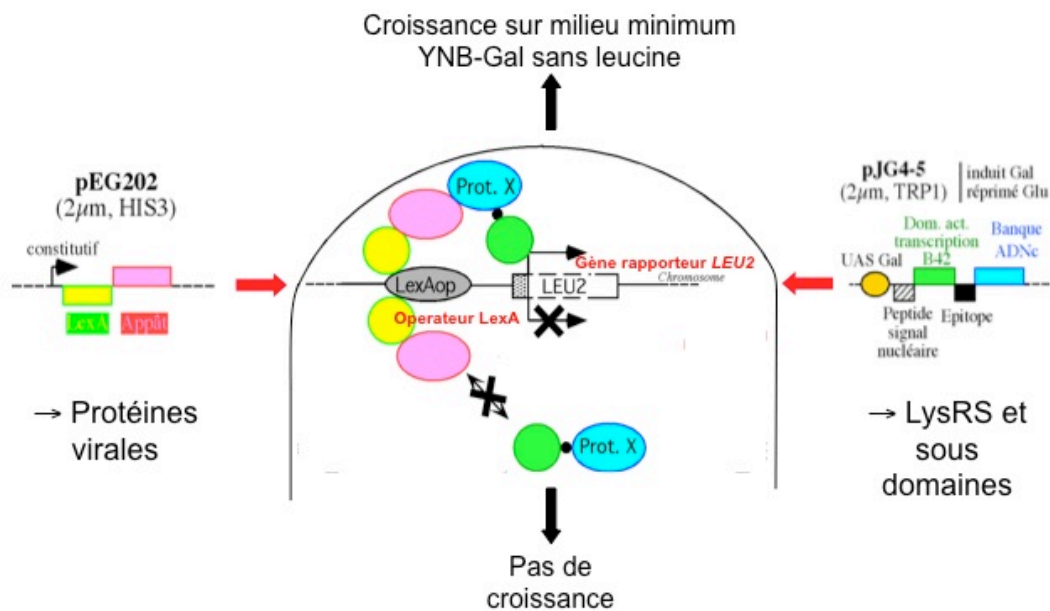


Figure 38. Principe du double hybride.

2. Nos résultats

Nous avons introduit les séquences codantes des protéines virales dans le pEG202, pour obtenir pEG202/Gag, pEG202/Gag⁴³⁴, pEG202/Pol, pEG202/IN, pEG202/RT, pEG202/PR, pEG202/p6*. Les séquences codantes des cLysRS, pmLysRS et mLysRS ainsi que les domaines communs des LysRS à savoir le domaine catalytique "CAT", de liaison de l'ARNt "ABD" et des domaines spécifiques de chaque forme cESD, pmESD et mESD sont insérés dans le pJG4-5. Nous avons sélectionné les transformants qui poussent sur milieu YNB-Gal en absence de leucine. Le galactose active la transcription des protéines de fusion codées par le pJG4-5.

En absence de leucine, dans un milieu YNB-Gal, nous avons observé que les cLysRS, mLysRS et pmLysRS n'interagissaient pas avec Gag ou Gag⁴³⁴. Cette donnée nous montre que la protéine Gag n'est pas essentielle à l'incorporation de la LysRS dans les particules virales. Par contre, les levures ont poussé en présence des LysRS et de Pol montrant que les trois formes de LysRS interagissent avec Pol. Ces résultats prouvent que Pol est un composant important et essentiel du VIH-1 pour le recrutement de la LysRS. GagPol en entier n'a pas pu être testé de par sa grande taille, il ne pouvait pas rentrer dans le noyau.

Seule la protéine Pol interagit avec les LysRS, nous avons voulu connaître par la suite quels étaient les domaines de Pol impliqués dans cette interaction. Nous avons trouvé que les sous domaines p6* et IN interagissaient avec les trois formes de LysRS. Cette association pourrait donc impliquer un domaine commun à ces trois formes.

Pour déterminer le domaine des LysRS mis en jeu dans l'association à Pol, nous avons également testé les interactions entre les domaines des LysRS contre Pol et ses domaines. Nous avons observé que c'est le domaine catalytique "CAT" des LysRS qui est impliqué dans l'interaction avec Pol par les domaines p6* et IN. Le domaine CAT est commun aux trois formes ce qui explique l'interaction possible des trois formes de LysRS *in vitro* avec Pol.

3. Les tests contrôles

Pour estimer la spécificité d'interaction des LysRS aux protéines virales, nous avons choisi d'étudier l'interaction entre l'AspRS et les polyprotéines Gag et GagPol. Aucune interaction n'a été observée entre l'AspRS et Pol, p6* ou IN, prouvant ainsi que l'interaction de Pol avec le domaine catalytique des LysRS est hautement spécifique.

Nous avons également testé l'interaction des LysRS avec la protéine p38. Cette interaction a été étudiée pour comprendre comment se faisait la liaison de la cLysRS à p38 dans MARS et de ce fait s'il existait une compétition entre la fixation de la protéine p38 et la polyprotéine Pol. Tout comme Pol, p38 interagit avec les trois LysRS par leur domaine catalytique, mais l'association entre cLysRS et p38 semble être la plus robuste. *In vivo*, seule la cLysRS est retrouvée dans MARS et seule la mLysRS est encapsidée dans les virions du VIH-1, montrant ainsi une compétition possible entre p38 et Pol pour l'encapsidation de la cLysRS et pour le routage de ces enzymes dans le cytoplasme de ces cellules.

B. L'immunoprécipitation

La deuxième méthode que nous avons utilisé au laboratoire pour confirmer nos résultats a été l'immunoprécipitation. Les séquences codant pour les protéines virales Pol, IN et p6* fusionnées à un peptide FLAG ont été insérées dans le plasmide de levure pRS315-PGK (*CEN/ARS, LEU2*). Elles ont été exprimées dans la levure W303-1B α puis exposées à la résine ANTI-FLAG agarose et incubées en présence des protéines LysRS purifiées (Figure 39).

L'immunoprécipitation confirme l'interaction entre les LysRS et Pol. Cette interaction est robuste et tout comme par double hybride les trois formes de LysRS interagissent avec Pol. L'interaction entre les LysRS et les p6* et IN est, quant à elle, plus labile. Effectivement, les deux domaines pris séparément semblent interagir moins bien que Pol avec les LysRS. Il existe donc une synergie d'interaction entre les deux domaines de Pol et la LysRS.

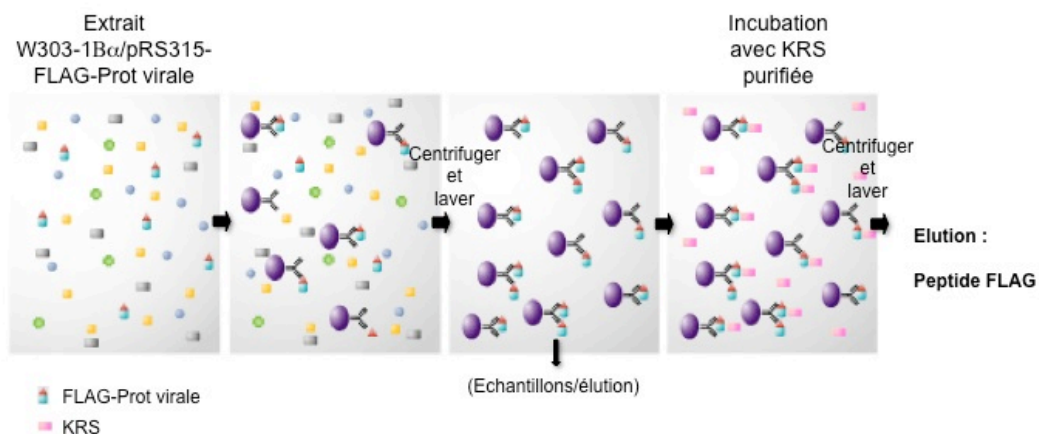


Figure 39. Principe de l'immunoprécipitation.

C. Les conclusions et perspectives

À partir de toutes les données recueillies, un modèle de l'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys} a été proposé. C'est la région Pol et, plus précisément, IN et p6* du précurseur GagPol qui interagissent avec le domaine catalytique "CAT" de la LysRS mitochondriale lors de l'assemblage de nouveaux virions. C'est la synergie entre IN et p6* qui permet à Pol de jouer le rôle de pince moléculaire pour la capture de l'ARNt₃^{Lys}. Dans ce modèle, on peut rajouter que le domaine RT de Pol, de par son affinité pour les acides nucléiques, pourrait avoir un rôle potentiel dans la stabilisation du complexe avec l'ARNt₃^{Lys}.

Plusieurs modèles doivent être pris en compte pour une meilleure compréhension de l'encapsidation de la LysRS dans les particules virales. En effet, nous savons que c'est uniquement l'espèce mitochondriale qui est retrouvée encapsidée dans les virions même si les trois formes ont la capacité intrinsèque d'interagir *in vitro* avec Pol. Il existe donc une compartimentalisation cellulaire qui fait que Pol ne voit pas la cLysRS avant son interaction avec p38 ou qu'il existe une compétition entre Pol et p38 pour l'interaction avec la cLysRS. Une question qui n'est pas résolue par ces données concerne la forme de LysRS mitochondriale qui s'associe à Pol. Soit c'est la forme pmLysRS qui s'associerait à l'ARNt₃^{Lys} et à Pol avant son transfert dans la mitochondrie, soit c'est la forme mitochondriale maturée mLysRS qui, après importation mitochondriale et clivage de son peptide signal, s'associerait à l'ARNt₃^{Lys} et à Pol et transporterait cet ARNt au virion. Dans les deux cas, l'infection par le VIH-1 modifie les propriétés de la membrane mitochondriale via l'action de Vpr et pourrait avoir un impact négatif sur la translocation de la pmLysRS vers la mitochondrie ou faciliterait le relargage de mLysRS du compartiment mitochondrial.

Pour essayer de déterminer directement quelle forme mitochondriale de LysRS est retrouvée dans les virions, nous avons dirigé des anticorps contre un peptide spécifique de la forme prémitochondriale, anticorps qui ne reconnaît donc qu'un épitope retrouvé dans le peptide signal. Il pourrait ainsi discriminer la forme pmLysRS de la forme mLysRS. Malheureusement, après plusieurs tentatives de reconnaissance des protéines pmLysRS ou mLysRS purifiées, la faible antigénicité du peptide utilisé n'a pas permis de reconnaître la forme pmLysRS.

Dans le chapitre suivant, nous avons déterminé le site de maturation de pmLysRS en mLysRS, et nous avons isolé et caractérisé les propriétés catalytiques des pmLysRS et mLysRS. Ces données ont permis de conclure que c'est la forme mLysRS maturée qui est encapsidée dans les virions.

ARTICLE 1

Association of Mitochondrial Lysyl-tRNA Synthetase with HIV-1 GagPol Involves Catalytic Domain of the Synthetase and Transframe and Integrase Domains of Pol

Lydia KOBBI, Guillaume OCTOBRE, José DIAS, Martine
COMISSO and Marc MIRANDE

J Mol Biol, Vol. 410, pp. 875-886 (2011)



Association of Mitochondrial Lysyl-tRNA Synthetase with HIV-1 GagPol Involves Catalytic Domain of the Synthetase and Transframe and Integrase Domains of Pol

Lydia Kobbi†, Guillaume Octobre†, José Dias, Martine Comisso and Marc Mirande*

Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, Centre de Recherche de Gif, CNRS, 1 Avenue de la Terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette, France

Received 19 January 2011;
received in revised form
18 February 2011;
accepted 2 March 2011

Edited by M. F. Summers

Keywords:

HIV-1;
tRNA packaging;
lysyl-tRNA synthetase;
cellular routing

Cytosolic and mitochondrial lysyl-tRNA synthetases (LysRS) are encoded by a single gene and can be distinguished only according to their very N-terminal sequences. It was believed that cytosolic LysRS is packaged into HIV-1 virions via its association with Gag. Using monospecific antibodies, it was later shown that only the mitochondrial LysRS is taken up in viral particles along with tRNA₃^{Lys}, the primer for reverse transcription of the HIV-1 genome. In this work, we re-analyzed the interaction between LysRS and GagPol to determine whether the particular N-terminal sequence of mitochondrial LysRS triggers a specific recognition with GagPol, or if differential routing of the two LysRS species *in vivo* could explain specific and exclusive packaging of the mitochondrial species. Here, we show that LysRS associates with the Pol domain of GagPol. More specifically, the transframe (TF or p6*) and integrase (IN) domain proteins of Pol interact with the catalytic domain of LysRS. A model of the assembly of the LysRS–tRNA₃^{Lys}–GagPol packaging complex is proposed, which is consistent with the release of its different components after maturation of GagPol in the virions. The cytoplasmic and mitochondrial LysRS species share an identical catalytic domain. Accordingly, we found that both enzymes have the intrinsic capacity to bind to GagPol *in vitro*. In addition, both enzymes interact with p38 *in vitro*, the scaffold protein of the cytoplasmic multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex, even though only the cytoplasmic species of LysRS is a *bona fide* component of this complex. These results suggest that the different LysRS species are strictly targeted *in vivo*, and open new perspectives for the search of a new class of inhibitors of the HIV-1 development cycle that would block the packaging of tRNA₃^{Lys} into viral particles.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Corresponding author. E-mail address: Marc.Mirande@lebs.cnrs-gif.fr.

† Contributed equally to this work.

Abbreviations used: PBS, primer-binding site; LysRS, Lysyl-tRNA synthetase; tRBD, tRNA-binding domain; c-, cytoplasmic; m-, mitochondrial; pm-, premitochondrial; MARS, multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex; MA, matrix; CA, capsid; NC, nucleocapsid; CAT, C-terminal catalytic domain of LysRS; ABD, tRNA anticodon-binding domain of LysRS; ESD, N-terminal eukaryote-specific domain of LysRS; RT, reverse transcriptase.

Introduction

Reverse transcription of the RNA genome of HIV-1, the human immunodeficiency virus type 1, into a DNA copy that integrates into the genome of the host cell is an essential step in its life cycle. Initiation of reverse transcription, which requires primer tRNA₃^{Lys} from the host cell, starts soon after budding of new viral particles, and many aspects of this process are known.¹ The primer RNA for reverse transcription, and tRNA₁^{Lys} and tRNA₂^{Lys}, which do not carry a 3'-extremity complementary to the primer binding site (PBS), are packaged during viral assembly.² Thus, specific pairing of tRNA with a sequence on viral RNA complementary to the primer RNA is not a prerequisite for tRNA packaging. Accordingly, the PBS region of viral RNA has been shown to be dispensable for tRNA packaging, and viral particles containing unprocessed GagPol, but not those that expressed only Gag, have been shown to selectively incorporate tRNA^{Lys}.³ Lysyl-tRNA synthetase (LysRS), the enzyme of the host cell that specifically recognizes and aminoacylates the different tRNA^{Lys} species to give the aminoacyl-tRNA used for protein synthesis, is also packaged into HIV-1 particles.⁴

Human LysRS is a potent tRNA-binding protein. In eukaryotic cells, cytosolic LysRS possesses an N-terminal polypeptide extension made of 73 amino acid residues, as compared to the bacterial enzyme.⁵ This appended domain is a functional tRNA-binding domain (tRBD)⁶ that contributes to the processivity of translation in the eukaryote cell.⁷ When its tRBD is removed, the affinity of LysRS for its tRNA is lowered by two orders of magnitude,⁵ and tRNA^{Lys} packaging into viruses is defective.⁸ Thus, the efficiency of tRNA-binding correlates with that of tRNA packaging, suggesting that the two processes are linked.

Because antibodies directed to the cytosolic enzyme revealed a cross-reacting LysRS species in viral particles, it was thought that the cytosolic enzyme is the source of LysRS packaged into the virions.⁴ However, the KARS gene, which encodes LysRS, together with the GARS gene, which encodes GlyRS, comprise one of the two exceptions to the rule that distinct genes encode the cytoplasmic and mitochondrial species of an aminoacyl-tRNA synthetase in human cells. Indeed, two mRNAs are produced by alternative splicing of exon 2 of the KARS gene.⁹ As a consequence, the cytoplasmic (cLysRS) and premitochondrial (pmLysRS) LysRS, the mitochondrial species produced in the cytoplasm before maturation during mitochondrial transport, share 576 amino acid residues and display a cross immunological response.¹⁰ The pmLysRS and cLysRS species have specific N-terminal polypeptide extensions of 49 and 21 amino acid residues,

respectively. When monospecific antibodies directed to these specific sequences were used to identify the LysRS species packaged into the HIV-1 virions, only the mitochondrial enzyme was detected.¹⁰

In human cells, cLysRS is one of the components of the multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex (MARS).¹¹ By contrast, in the mitochondria, mLysRS does not associate into MARS because other components of this complex are strictly cytosolic proteins. The other aminoacyl-tRNA synthetases associated with cLysRS into MARS are encoded by two distinct genes, one for the cytosolic and one for the mitochondrial enzyme. Owing to the endosymbiotic origin of mitochondria, mitochondrial synthetases are more similar to their prokaryotic than to their eukaryotic counterparts. The fact that cLysRS is a member of a huge macromolecular complex could explain the selection of mLysRS as a carrier of tRNA^{Lys} during the packaging process. However, the presence of cLysRS and an increase in tRNA^{Lys} packaging was observed following over-expression of cLysRS in human cells.¹² The Gag and Pol polyproteins are involved in the process of cLysRS-tRNA^{Lys} packaging.^{13,14} Dissociation of the dimeric LysRS into monomers appears to be a prerequisite for assembly.¹⁵

Interestingly, over-expression of cLysRS in human cells generates a free enzyme.¹⁶ The subcellular mobility of this enzyme, in excess as compared to its partners within MARS, is increased, suggesting that its cellular compartmentalization is affected. These findings suggest that even if free cLysRS has the intrinsic ability to serve as a carrier of tRNA^{Lys}, its cellular association with MARS prevents its interaction with a viral protein during the packaging process. In support of this hypothesis, and to assess the role of cellular compartmentalization in the process of protein-protein interaction *in vivo*, we analyzed *in vitro* association between the different LysRS species and the components of the GagPol polyprotein.

Results

Lysyl-tRNA synthetase associates specifically with the Pol domain of GagPol

Association of the mitochondrial species of human LysRS with the Gag or GagPol polyprotein precursors was examined by the yeast two-hybrid method (Fig. 1). Because a single gene encodes the cytoplasmic and mitochondrial species of LysRS in human,⁹ we wanted to determine if the mitochondrial-specific sequences enable Gag or GagPol to discriminate between the different LysRS species. The single KARS gene encodes by means of alternative splicing the cLysRS and premitochondrial pmLysRS species of LysRS, and thus these two

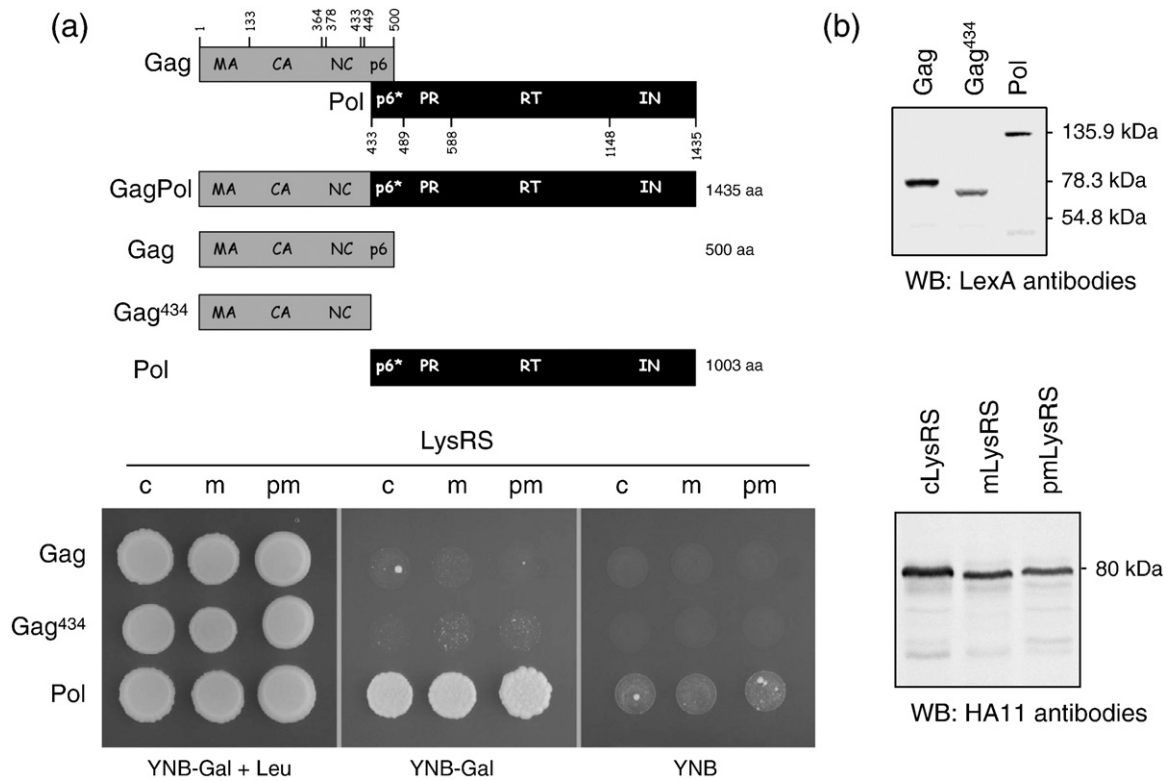


Fig. 1. Two-hybrid analysis of LysRS–GagPol interaction. (a) Top: the polyproteins Gag and GagPol are translated from the same mRNA. To express GagPol in the yeast two-hybrid system, a deletion was introduced to circumvent the requirement for a -1 frameshifting event. The polyproteins Gag, Gag⁴³⁴ (corresponding to the Gag sequences of GagPol) and Pol (corresponding the Pol sequence of GagPol) were expressed fused to LexA in pEG202. The three LysRS species for the cytoplasmic (cLysRS), mitochondrial (mLysRS), and premitochondrial (pmLysRS) enzymes were expressed fused to the B42 transcription activator, under the control of a galactose-inducible promoter in pJG4-5. Bottom: the two-hybrid protein–protein interaction assay between Gag, Gag⁴³⁴ or Pol, and cLysRS, mLysRS or pmLysRS was conducted in EGY48 strain plated on YNB-Gal. A protein–protein interaction resulted in the expression of the LEU2 gene, as observed following co-expression of any of the three LysRS with Pol. As controls, all the strains grew on a galactose medium in the presence of leucine (YNB-Gal + Leu) and none grew on a glucose medium (YNB) in the absence of galactose and leucine (all the strains grew on YNB in the presence of leucine; data not shown). (b) Expression and stability of the fusion proteins produced in yeast from the pEG202 plasmid. The Gag (78.3 kDa), Gag⁴³⁴ and Pol (135.9 kDa) domains of GagPol were expressed fused to the LexA DNA-binding domain. Bottom: western blot analysis of the fusion proteins expressed in yeast from the pJG4-5 plasmid. The cLysRS, mLysRS or pmLysRS species (80 kDa) were expressed fused to the B42 transcription activator and to the HA11 hemagglutinin epitope.

enzymes share 576 amino acid residues. The human cLysRS and pmLysRS have distinct N-terminal sequences, consisting of 21 and 49 amino acid residues, respectively. The putative maturation site of pmLysRS that gives the mitochondrial LysRS species (mLysRS) after transfer into the mitochondria corresponds to a cleavage of the mitochondria-targeting sequence between Lys16 and Thr17.⁹ The different LysRS species, cLysRS, mLysRS and pmLysRS, were expressed in yeast fused with the B42 transcription activation domain. These constructs also contain an HA11 hemagglutinin epitope that allows identification of the fusion proteins expressed in yeast (Fig. 1b). The viral Gag and GagPol sequences were expressed fused with the LexA DNA-binding domain (Fig. 1b). The complete

GagPol polyprotein precursor, consisting of 1435 amino acid residues, was expressed in yeast but could not pass the nuclear barrier, as assessed by the repression assay developed by Brent (data not shown).¹⁷ Thus, only the fusion proteins with Gag, with the first 434 amino acid residues of Gag found in the GagPol polyprotein before -1 frameshifting occurs, and with the Pol region of GagPol were analyzed (Fig. 1a). All these constructs were scored positive by the repression assay, and thus entered the nucleus. Neither Gag⁴³⁴ containing the matrix (MA), capsid (CA) and nucleocapsid (NC) domains, nor Gag, containing the additional p6 protein, displayed interaction with any of the three forms of LysRS, by the two-hybrid system. By contrast, expression of Pol and of any of the three LysRS

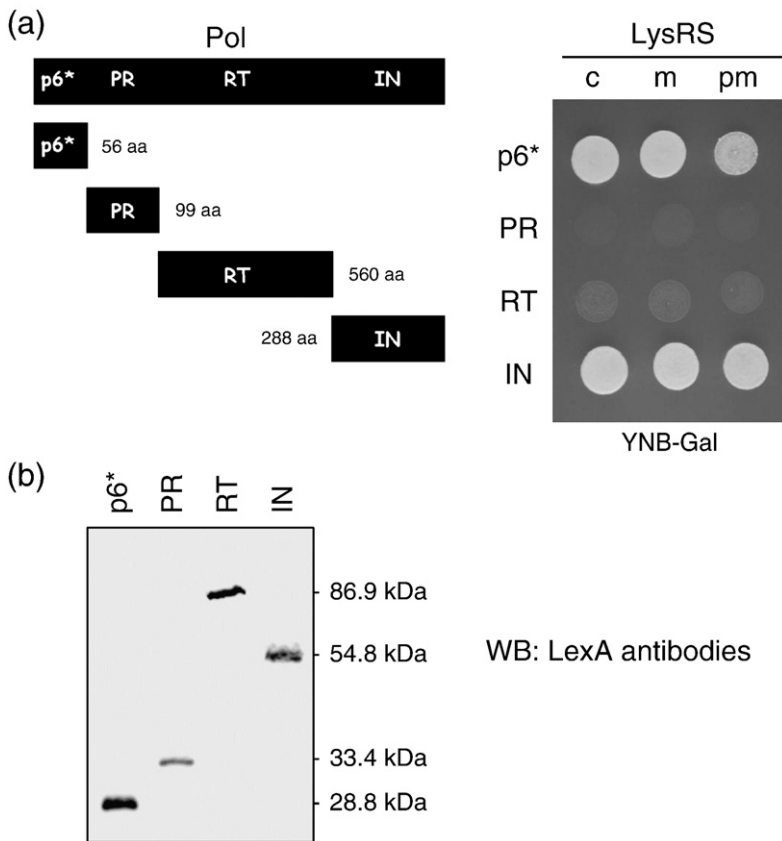


Fig. 2. (a) Yeast two-hybrid analysis of interaction of the p6*, PR, RT or IN domains of Pol with cLysRS, mLysRS or pmLysRS. For the seek of clarity, only the YNB-Gal selection plate is presented, showing that the p6* and IN domains interact with the three LysRS species. No growth was observed on YNB plates. Figure 3 also shows that p6* and IN do not activate transcription when the catalytic domain of LysRS is not expressed in yeast. (b) Western blot analysis of the fusion proteins expressed in yeast from the pEG202 plasmid. The p6* (28.8 kDa), PR (33.4 kDa), RT (86.9 kDa) or IN (54.8 kDa) domains of GagPol were expressed fused to the LexA DNA-binding domain.

species allowed the yeast to grow, suggesting that a domain common to all LysRS species was involved in the association.

To identify the protein domains of the Pol polyprotein precursor involved in this interaction, the four domains of Pol, the transframe protein p6*, the viral protease PR, reverse transcriptase RT and integrase IN (Fig. 2a) were independently expressed fused to LexA (Fig. 2b). Expression of the p6* or of the IN domain of Pol with any of the three LysRS species revealed a protein–protein interaction by the two-hybrid assay (Fig. 2a).

To delineate the protein domains of LysRS required for association with Pol or with its p6* or IN domains, the structural domains of LysRS (Fig. 3a) were independently expressed fused to B42 (Fig. 3a). This includes the C-terminal catalytic domain of LysRS (CAT), its tRNA anticodon-binding domain (ABD), and its N-terminal eukaryote-specific sequences (ESD) that promotes the formation of a stable complex between tRNA^{Lys} and LysRS in humans.⁵ The cESD, mESD and pMESD domains also contain the cytoplasmic-, mitochondrial- and premitochondrial-specific sequences, respectively. Expression of CAT, but of none of the other cESD, mESD, pMESD, or ABD domains, with Pol, p6* or IN, revealed a protein–protein interaction (Fig. 3b). No interaction was detected with Gag.

To test for the specificity of the association of LysRS with Pol and with its p6* or IN domains in the yeast two-hybrid system, human aspartyl-tRNA synthetase was fused to B42 and used as a control. LysRS and AspRS, two aminoacyl-tRNA synthetases from the class IIB enzymes, evolved from a common ancestor and thus display a high level of sequence and 3D-structure similarity. Among 476 amino acid residues that could be aligned, 196 are similar (109 are identical). This 41% similarity is even higher when only the catalytic domains are compared, reaching a level of 48% (81 identical amino acid residues among 297). AspRS is the synthetase that is the most closely related to LysRS, and thus could be the most difficult to discriminate by Pol, p6* and IN. Even if the expression level of the HA11-AspRS fusion protein in yeast is similar or even slightly higher than that of HA11-LysRS (Fig. 4), co-expression of AspRS with Pol, p6* or IN (as well as with Gag, Gag⁴³⁴, PR or RT) in the yeast two-hybrid system did not reveal any interaction between these proteins (Fig. 4).

The p6* and IN domains act synergistically to build a stable anchoring platform for LysRS on Pol

Association of LysRS with Pol was confirmed by immunoprecipitation of LysRS with FLAG-tagged

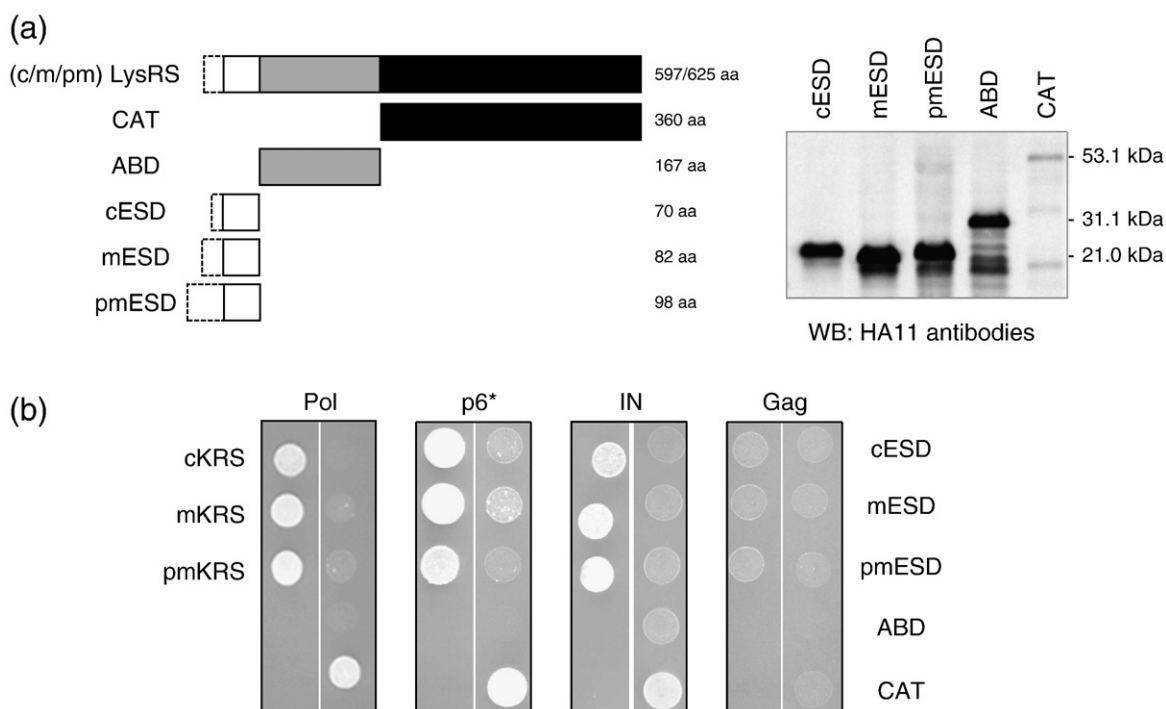


Fig. 3. Two-hybrid analysis of the LysRS domains interacting with Pol. (a) The cytoplasmic (cLysRS), mitochondrial (mLysRS) and premitochondrial (pmLysRS) species of LysRS as well as the cytoplasmic- (cESD), mitochondrial- (mESD) or premitochondrial- (pmESD) eukaryote-specific domains, the anticodon-binding domain (ABD), and the catalytic domain (CAT) of LysRS were expressed fused to the B42 transcription activator, under the control of a galactose-inducible promoter in pJG4-5. Expression of the fusion proteins in yeast was analyzed by western blot. The cESD, mESD, pmESD (21 kDa), ABD (31.1 kDa) or CAT (53.1 kDa) domains of LysRS were expressed fused to the B42 transcription activator and to the HA11 hemagglutinin epitope. Note that the CAT domain is expressed much less than the other LysRS domains. (b) The two-hybrid protein–protein interaction assay between the LysRS constructs and Pol, p6*, IN and Gag expressed fused to LexA in pEG202, was done in the EGY48 strain. Expression of the CAT domain alone was as efficient as expression of the three full-length LysRS species to restore growth in the presence of Pol, p6* or IN. No growth was observed on YNB plates. As a control, none of the LysRS or LysRS domains revealed a protein–protein interaction with Gag in the yeast two-hybrid assay. These data show also that none of the HA-LysRS fusions activates transcription of the reporter gene in the absence of a suitable B42-fusion protein. For clarity, only the YNB-Gal selection plate is shown.

Pol produced in yeast. We set up an immunoprecipitation assay allowing the recovery of interacting proteins with a specific elution step because we observed that full-length LysRS species have the tendency to be adsorbed non-specifically on agarose beads. The Pol domain of GagPol was expressed in yeast with a FLAG-tag appended to its N-terminus, and purified by adsorption on an anti-FLAG agarose. The resulting FLAG-Pol bound to the anti-FLAG agarose was incubated in the presence of purified cLysRS, mLysRS or pmLysRS (Fig. 5). In parallel, a sample of anti-FLAG agarose saturated with FLAG peptide was incubated with the different LysRS species. After washing the agarose beads, specific elution of interacting proteins was accomplished by adding an excess of FLAG peptide that released FLAG-Pol from the agarose matrix by competition. The three forms of LysRS were recovered after interaction with FLAG-Pol, but only trace amounts were recovered from the matrix saturated with FLAG (Fig. 5a). Thus, interaction

detected by the two-hybrid analysis was verified by an immunoprecipitation assay. This suggests that the three LysRS species interact directly with Pol. As a control, LysRS was replaced by purified AspRS in this assay. As shown in Fig. 5b, AspRS did not bind to FLAG or to FLAG-Pol. Thus, the LysRS–Pol association detected by two-hybrid and immunoprecipitation analyses is specific.

Association of LysRS to the p6* and IN domains of Pol was assessed by this immunoprecipitation assay, under exactly the same experimental conditions used for Pol. The two constructs FLAG-p6* and FLAG-IN were isolated on anti-FLAG agarose beads and incubated with mLysRS. After two washes with 50 mM NaCl, mLysRS was eluted by increasing the concentration of NaCl to 250 mM or after an additional wash with 50 mM NaCl, by adding FLAG peptide to elute the FLAG-tagged proteins (Fig. 6). When incubated on FLAG-Pol, pmLysRS was eluted by FLAG peptide, but its interaction with FLAG-Pol was not disrupted by

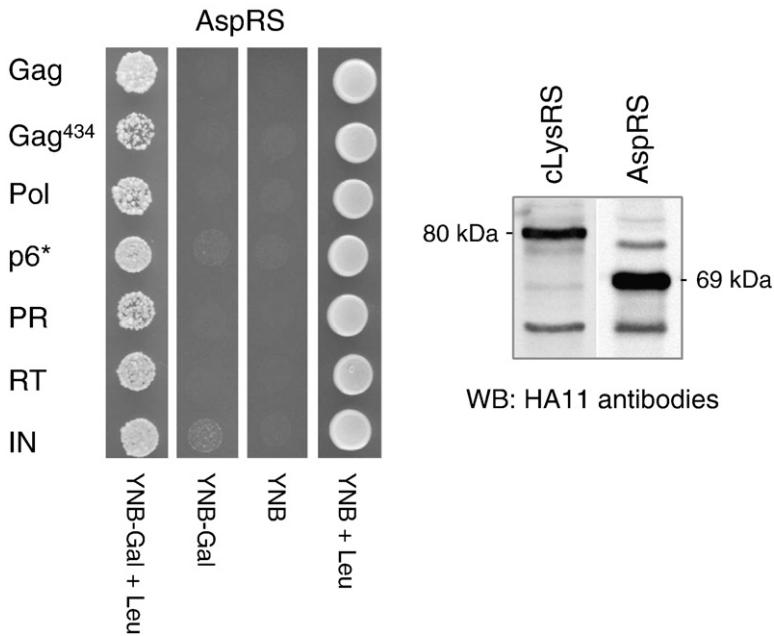


Fig. 4. Two-hybrid analysis of AspRS-GagPol interaction. Aspartyl-tRNA synthetase (AspRS) was expressed fused to the B42 transcription activator, under the control of a galactose-inducible promoter in pJG4-5. The two-hybrid protein-protein interaction assay between AspRS and the Gag⁴³⁴, Gag, Pol, p6*, PR, RT or IN domains of GagPol expressed fused to LexA in pEG202, was done in the EGY48 strain. On the YNB-Gal selection plate, none of the GagPol domains revealed a protein-protein interaction with AspRS in the yeast two-hybrid assay. As controls, all the strains grew on galactose medium in the presence of leucine (YNB-Gal + Leu), all the strains grew on glucose medium in the presence of leucine (YNB + Leu) and none grew

on glucose medium in the absence of leucine (YNB). The relative expression level of the B42-LysRS and B42-AspRS fusion proteins in the EGY48 strains, as assessed by western blot analysis with anti-HA11 antibodies, is shown at the right.

incubation with 250 mM NaCl. By contrast, interaction of pmLysRS with FLAG-IN was completely dissociated in the presence of 250 mM NaCl, and its interaction with FLAG-p6* was too weak to be visualized by this approach. Thus, association of LysRS with p6* or IN is much weaker than that between pmLysRS and Pol, suggesting that these two domains of Pol act synergistically to build a strong and stable anchoring platform for LysRS with the Pol domain of GagPol.

Do p38 and Pol compete for association with LysRS?

The cytoplasmic form of LysRS is a member of the MARS complex.¹⁸ It binds to the p38 scaffold protein of the complex with high affinity ($K_D \sim 0.3$ nM).¹⁹ No trace of mitochondrial LysRS was recovered from the purified MARS fraction. The association of LysRS with p38 was analyzed in more detail. A yeast two-hybrid analysis showed that p38 is able to associate with cLysRS or with itself (p38 is a dimer), as reported,²⁰ and with mLysRS or pmLysRS (Fig. 7a). Association of p38 with LysRS was revealed when analyzing its interaction with the catalytic domain alone, but was not observed with the cESD, mESD, pmESD or ABD domains (Fig. 7a).

By contrast, because the conserved catalytic domain of LysRS is also involved in the association of LysRS with Pol (Fig. 3), cLysRS and pmLysRS interact with Pol as found by the two-hybrid and immunoprecipitation assays (Figs. 1 and 5). However, the mitochondrial species of LysRS is the only species recovered in HIV-1 virions.¹⁰

We tried to evaluate the relative strength of association of cLysRS, pmLysRS and its CAT domain with p38, Pol, p6* or IN (Fig. 7b) by introducing the *lacZ* reporter gene into the two-hybrid assay. We observed earlier that activation of the two reporter genes *lacZ* and *LEU2* in this yeast two-hybrid assay²⁰ is correlated with a high affinity of interaction between the two proteins tested ($K_D \leq 50$ nM),¹⁹ whereas only the *LEU2* gene is activated with proteins interacting more weakly. Co-expression of cLysRS and p38 resulted in very strong activation (deep indigo color) of the two reporter genes (Fig. 7b) as reported.²⁰ By contrast, a weak activation (light blue color) of the *lacZ* gene was observed when CAT and p38 or pmLysRS and p38 were co-expressed. No expression of β -galactosidase was detected in strains co-expressing cLysRS, pmLysRS or CAT with Pol, p6* or IN (Fig. 7b). Interestingly, sequences located in the cESD domain of cLysRS stabilize association of the CAT domain with the p38 scaffold protein of the cytoplasmic MARS complex. By contrast, the sequences located in the pmESD domain of pmLysRS (or in the mESD domain of mLysRS, not shown), do not appear to contribute to stabilize the association of pmLysRS with Pol, p6* or IN (Fig. 7b).

Thus, the same domain of LysRS, its catalytic domain, is involved in the interaction of pmLysRS with Pol and in the interaction of cLysRS with p38 *in vivo*. To test for a possible overlap between the two binding sites, immunoprecipitation of cLysRS by FLAG-Pol was conducted as described above (Fig. 5a), in the absence or in the presence of an excess of p38 (Fig. 8). Addition of p38 to excess did not impair association of cLysRS with FLAG-Pol. After

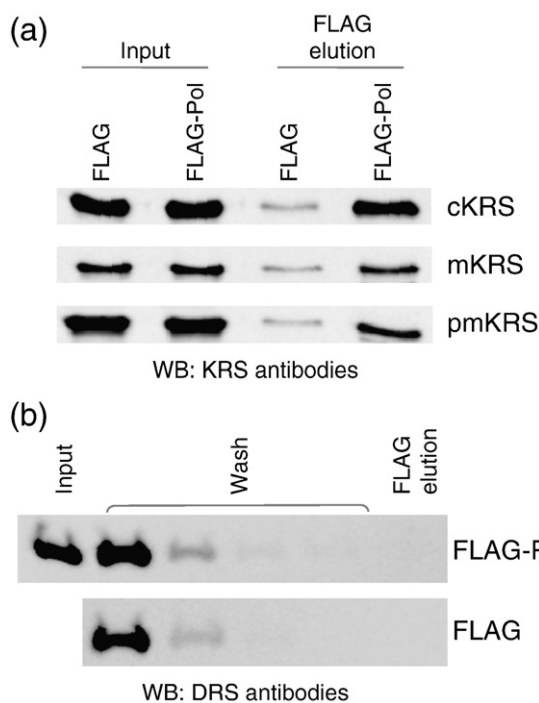


Fig. 5. Co-immunoprecipitation of LysRS with Pol. (a) Anti-FLAG agarose beads carrying the FLAG peptide (FLAG) or the FLAG-Pol fusion protein (FLAG-Pol) were incubated with the cytoplasmic (cKRS), mitochondrial (mKRS) or premitochondrial (pmKRS) forms of LysRS (Input). After several washes, beads were incubated with excess FLAG peptide and the eluted fraction was recovered (FLAG elution). LysRS present in these fractions was analyzed by western blotting with anti-KRS antibodies. (b) Anti-FLAG agarose beads carrying the FLAG peptide (FLAG) or the FLAG-Pol fusion protein (FLAG-Pol) were incubated with AspRS (Input). After several washes, beads were incubated with excess FLAG peptide and the eluted fraction was recovered (FLAG elution). AspRS present in these fractions was analyzed by western blotting with anti-DRS antibodies.

incubation of cLysRS with p38, both proteins were recovered associated with FLAG-Pol (p38 alone did not bind to FLAG-Pol; data not shown). This result shows that the p38- and Pol-binding sites on LysRS are distinct and can be occupied simultaneously on the protein.

Discussion

The detailed knowledge of protein-protein interactions between the cellular and viral proteins involved in the assembly of the tRNA₃^{Lys} packaging complex is a prerequisite to search for molecules that could inhibit this step of the HIV-1 life cycle. Our finding that the mitochondrial LysRS species is the only cellular LysRS recovered in HIV-1 particles under physiological

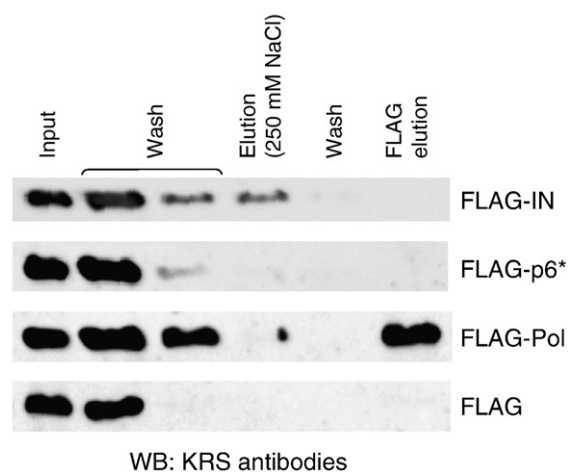


Fig. 6. Co-immunoprecipitation assay of LysRS with the p6* and IN domains of Pol. Anti-FLAG agarose beads carrying the FLAG-IN fusion protein (FLAG-IN), the FLAG-p6* fusion protein (FLAG-p6*), the FLAG-Pol fusion protein (FLAG-Pol) or the FLAG peptide (FLAG) were incubated with the mitochondrial form (mKRS) of LysRS (Input). After several washes with a buffer containing 50 mM NaCl (Wash), beads were incubated with the same buffer containing 250 mM NaCl (Elution 250 mM NaCl), washed again with 50 mM NaCl (Wash) before the addition of excess FLAG peptide (FLAG elution). LysRS present in these fractions was analyzed by western blotting with anti-KRS antibodies.

conditions;¹⁰ that is, when no LysRS species is over-expressed in the host cell and when wild type viruses are produced, as opposed to Gag viral-like particles (VLPs), prompted us to re-investigate the role of GagPol and of its individual components in this process. Our results are consistent with the following model of LysRS-tRNA^{Lys}-GagPol association (Fig. 9).

The N-terminal, eukaryote-specific, tRNA-binding domain (tRBD) of LysRS, is required to provide a strong tRNA-anchoring platform on LysRS⁵ and to package tRNA into HIV-1 particles.⁸ This stable LysRS-tRNA^{Lys} complex is hijacked into virions after interaction of the catalytic domain of LysRS (CAT) with the p6* and IN domains of unprocessed polyprotein GagPol. The reverse transcriptase (RT) domain of Pol, which appears to have a limited specificity for tRNA-binding²¹ but to be required for efficient packaging of tRNA into HIV-1 particles,³ could provide an additional tRNA-binding site to stabilize association of tRNA within the LysRS-tRNA^{Lys}-GagPol ternary complex. This model is consistent with the finding that unprocessed GagPol is required for selective packaging of tRNA^{Lys} because the p6* and IN domains of Pol act synergistically to contribute a stable anchoring platform to LysRS. Deletion of reverse transcriptase and integrase sequences is accompanied by an eightfold decrease in tRNA₃^{Lys} packaging.³ It is noteworthy that a mutation

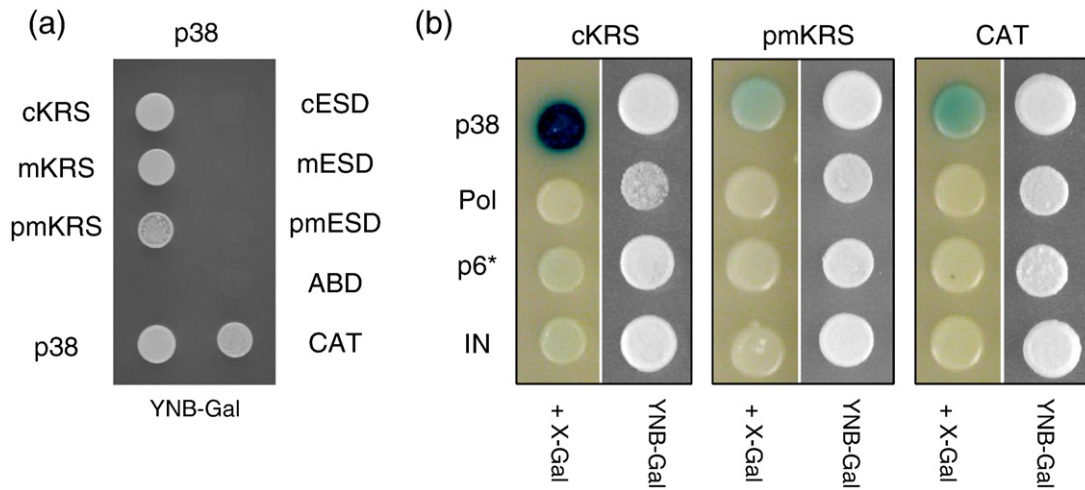


Fig. 7. Two-hybrid analysis of the association of LysRS with MARS or with GagPol. (a) The cytoplasmic (cLysRS), mitochondrial (mLysRS) and premitochondrial (pmLysRS) species of LysRS, the p38 component of the cytoplasmic MARS complex (p38) as well as the cytoplasmic- (cESD), mitochondrial- (mESD) or premitochondrial- (pmESD) eukaryote-specific domains, the anticodon-binding domain (ABD) and the catalytic domain (CAT) of LysRS were expressed fused to the B42 transcription activator, under the control of a galactose-inducible promoter in pJG4-5. The two-hybrid protein-protein interaction assay between these constructs and p38 expressed fused to LexA in pEG202, was conducted in strain EGY48. Only the YNB-Gal selection plate is shown. (b) The robustness of interaction between cKRS, pmKRS or the CAT domain of KRS fused to B42 and the p38, Pol, p6* or IN proteins fused to LexA in the two-hybrid assay was assessed by monitoring activation of the *LEU2* gene (YNB-Gal) or of the *lacZ* gene (+ X-Gal). Note the strong indigo color when the cKRS and p38 fusion proteins are co-expressed.

C130S in IN that does not affect the enzyme activity of IN *in vitro* has been reported to abolish the ability of the virus to initiate reverse transcription.²² These data indicated that IN plays an important, but undefined, role during reverse transcription. Our results suggest that disruption of LysRS-IN interaction could be one of the defects caused by the C130S substitution in IN. In addition, the finding that Pol binds LysRS in a pincers-like manner between its two p6* and IN branches also suggests a mechanism of release of LysRS-GagPol association. Indeed, after maturation of GagPol in the virions, which dismantles the pincers

and annihilates the synergy effect, the weak association of LysRS with the two individual proteins p6* and IN should lead to their dissociation.

These results are not in accord with earlier reports suggesting that LysRS interacts with the Gag domain of GagPol, and more specifically with the C-terminal region of the CA domain of Gag.^{13,15} Despite several attempts, we could not detect an interaction between any of the LysRS used in this study and Gag.

The experiments reported here provide some indication on possible sources of the discrepancies. Perhaps crucially, the ability of LysRS to be

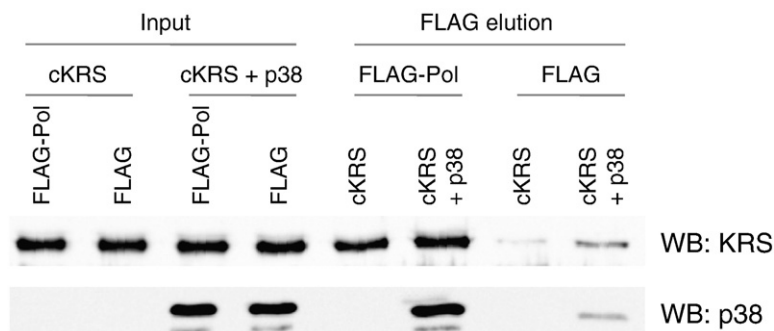


Fig. 8. Co-immunoprecipitation of LysRS with Pol in the presence of p38. Anti-FLAG agarose beads were loaded with FLAG-Pol fusion protein (FLAG-Pol) or with FLAG peptide (FLAG) and incubated with the cytoplasmic form of LysRS in the absence (cKRS) or in the presence of p38 (cKRS+p38) (Input). After several washes, beads were incubated with excess FLAG peptide (FLAG elution). LysRS and p38 present in these fractions was analyzed by western blotting with anti-KRS or anti-p38 antibodies.

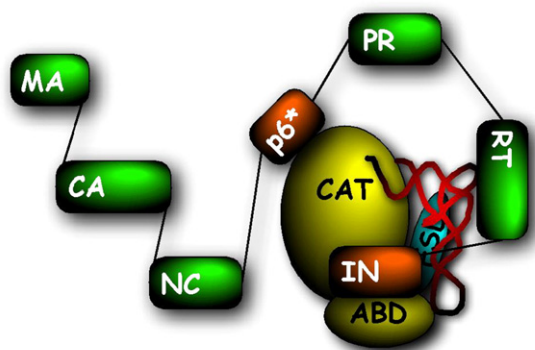


Fig. 9. Model of the tRNA^{Lys} packaging complex. The major protein domains of Pr160GagPol polyprotein, MA, CA, NC, p6*, PR, RT and IN are indicated. The catalytic (CAT) and anticodon-binding (ABD) domains of mitochondrial LysRS are indicated in yellow (large and small domain, respectively) and the ESD domain in blue. The p6* and IN domains of GagPol (in orange) interact with the catalytic domain of LysRS. Association of tRNA^{Lys} with LysRS could be stabilized by an additional interaction with the RT domain of GagPol.

packaged into virions was determined after over-expression of cytoplasmic LysRS and LysRS variants into the host cell and analysis of its incorporation into GagVLPs. Over-expression of cLysRS in human cells produces a free enzyme that is not associated within MARS.¹⁶ This ectopic enzyme could then be packaged into virions as efficiently as the natural mitochondrial LysRS (our unpublished results). Analysis of the packaging process into GagVLPs appears to lack the specificity of wild type HIV-1. A recent re-evaluation of tRNAs packaged into HIV-1 particles using a microarray analysis showed that tRNA packaging is reduced by 80% in GagVLPs compared to wild-type HIV-1.²³ In this study, authors assume that tRNAs recovered in GagVLPs represent nonselective packaging.

In our immunoprecipitation analysis, specific elution of the LysRS–Pol complexes from the anti-FLAG matrix by competition between the FLAG sequences appended to Pol and a FLAG peptide added in excess was a key factor to eliminate the nonspecific interactions we observed between LysRS and the matrix. The interaction between LysRS and Pol reported here proved to be specific, when compared with experiments performed with AspRS, another class IIb aminoacyl-tRNA synthetase that is closely related to LysRS in evolution.²⁴ By contrast, the equilibrium binding constant reported for the LysRS–Gag interaction (310 nM) was only fivefold lower than that determined for association of Gag with TrpRS (1550 nM), a class I aminoacyl-tRNA synthetase completely unrelated to LysRS.¹⁵ The LysRS–Gag interaction reported in

that study is also very weak when compared to the dissociation constant of 0.3 nM determined for the LysRS–p38 interaction,¹⁹ which questions the specificity of the LysRS–Gag interaction reported earlier. In their model, the LysRS–Gag interaction involves the hydrophobic, dimeric interface of LysRS.¹⁵ Because LysRS is a very stable dimer that requires incubation with chaotropic salts to be dissociated into monomers,^{19,25} the weak association of LysRS with Gag makes it unlikely that LysRS will spontaneously dissociate into monomers in the presence of Gag *in vivo*.

Our data also show that cLysRS interacts more strongly than mLysRS or pmLysRS with the p38 scaffold protein of the MARS complex. This result suggests that association of cLysRS within MARS is a clearly favored pathway *in vivo*, as compared to pmLysRS. Because our data show that all LysRS species have the intrinsic property to associate within MARS or to bind to GagPol, they suggest that cellular compartmentalization is a key mechanism for the selective targeting of mitochondrial LysRS to HIV-1 virions.

These results have strong implications on compartmentalization of proteins in the cytoplasm of human cells. The data available are consistent with a model according to which, after translation in the cytoplasm, cLysRS, which does not contain the N-terminal mitochondrial targeting sequence of pmLysRS, is targeted to MARS and pmLysRS is targeted to the mitochondria (Fig. 10). Despite its ability to bind to p38 (Fig. 7), pmLysRS was never detected within the cytoplasmic MARS complex using monospecific antibodies directed to its N-terminal specific peptide.¹⁰ Following HIV-1 infection, the GagPol polyprotein is produced and selects a LysRS–tRNA^{Lys} species for packaging into virions. The cLysRS and pmLysRS species have the intrinsic capacity to bind GagPol, but cLysRS is not recovered into the virions,¹⁰ suggesting that its interaction with p38 and its routing to MARS prevents its ability to be sequestered by GagPol and to be packaged. The other components of MARS have not been found in viral particles (our unpublished results).⁴ The mitochondrial species of LysRS, the only free LysRS species present in the cell, could interact with GagPol for packaging. Hijacking of the mitochondrial but not of the cytoplasmic LysRS species could also be functionally advantageous for the virus. Production of a large amount of virus from each infected cell requires an active translation machinery in the host cell. The cytoplasmic enzyme, which is not recruited by GagPol, would retain its translational capacity.

The finding that within the host cell the catalytic domain of mitochondrial LysRS interacts specifically with the p6* and IN domains of GagPol for its packaging into HIV-1 particles opens new perspectives toward the search of inhibitors of this specific step in the HIV-1 life cycle.

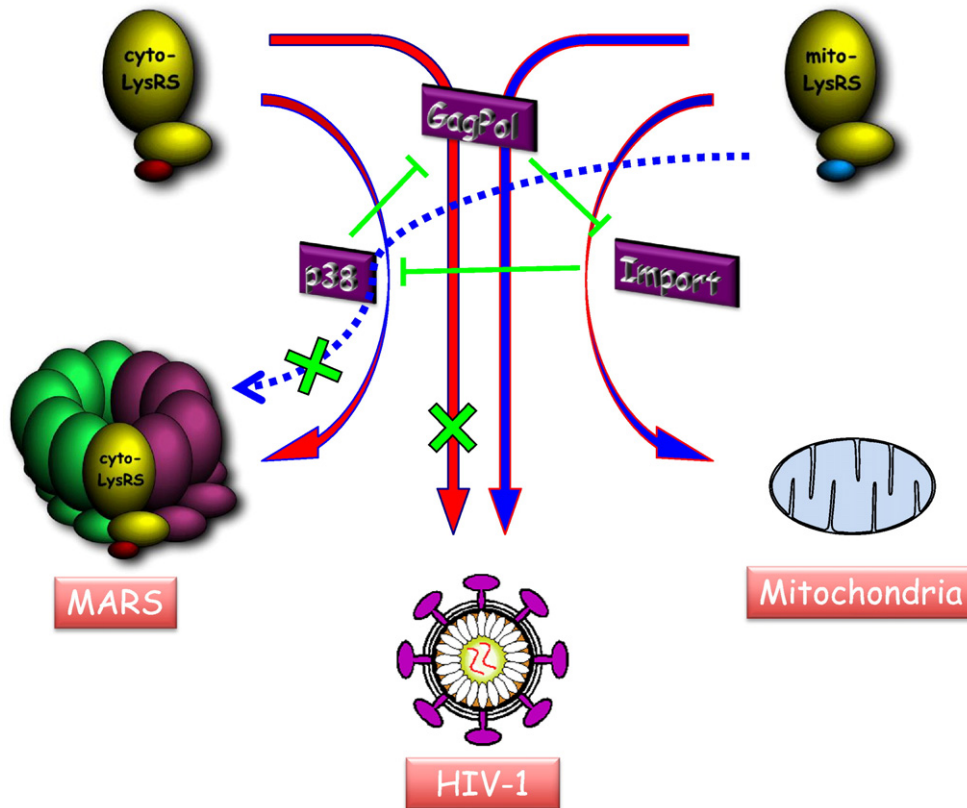


Fig. 10. The cellular routes of LysRS. The cytoplasmic and mitochondrial species of LysRS, translated in the cytoplasm, would be strictly targeted to MARS when cyto-LysRS interacts with p38 or to mitochondria via interaction with components of the import machinery. Even if mito-LysRS has the intrinsic capacity to bind to p38, mito-LysRS is never routed to MARS *in vivo*. Even if cyto-LysRS has the intrinsic capacity to bind to GagPol, its routing to MARS prevents its routing to HIV-1 particles.

Materials and Methods

Yeast two-hybrid analysis

We used the yeast two-hybrid system developed by Brent *et al.*¹⁷ The cDNAs encoding the human cytoplasmic, premitochondrial and mitochondrial forms of LysRS, the catalytic (CAT, Asp238 – Val597), anticodon-binding (ABD, Val71 – Asn237) or eukaryotic-specific (cESD, mESD, pmESD, from the N-terminus to Ser70) domains of LysRS, human cytoplasmic AspRS or p38, were introduced between the EcoRI and XhoI sites of pJG4-5. The B42 activation domain-fused proteins in pJG4-5 also carry a hemagglutinin epitope tag, and are expressed under the control of a galactose-inducible promoter. The GagPol, Gag, Gag⁴³⁴ and Pol polyproteins, the p6*, PR, RT and IN domains of Pol, and human p38 were introduced between the EcoRI and XhoI sites of pEG202. For frameshifting-independent expression of GagPol, a 5T-deletion (nucleotides 2086 – 2090 in pNL4-3) was introduced into the coding sequence. For expression of GagPol, Pol and PR, a GAT (Asp) to CGT (Arg) double mutation was introduced at positions 2325-2326 to inactivate viral protease. The LexA DBD-fused proteins in pEG202 are expressed under the control of a constitutive

promoter. The repression assay with the pJK101 reporter was used to test whether the LexA-pVIH-1 fusion proteins are able to enter the nucleus and bind LexA operators.¹⁷

The yeast strain EGY48 (*Mat α his3 leu2::3LexAop-LEU2 ura3 trp1*), which contains a chromosomal *LEU2* gene placed under the control of LexA operators was transformed to *ura*⁺ with pSH18-34, the *LexAop-LacZ* reporter plasmid, to *his*⁺ with pEG202-derivatives and to *trp*⁺ with pJG4-5 derivatives. At least four independent colonies were analyzed for their ability to grow in the absence of leucine (expression of *Lexop-LEU2*) or to show blue color on 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside (X-Gal)-containing medium (expression of *LexAop-LacZ*). A pair of interactive proteins was scored as positive when transformants did not grow on glucose medium lacking leucine (no expression of B42-fusions) but grew on galactose medium lacking leucine (expression of B42-fusions that interacted with LexA-fusions). These interactions were scored as strong when colonies were also blue on galactose medium containing X-Gal.

Enzymes, antibodies and western blot analysis

The different human LysRS species, pmLysRS, mLysRS, or cLysRS were expressed in yeast or in insect cells, and

purified essentially as described.⁵ Monoclonal antibodies directed to the hemagglutinin epitope were from BABCo. Antibodies to LexA were a gift from Patrice Moreau (Laboratoire de Chimie Bactérienne, Marseille). Polyclonal anti-LysRS, anti-AspRS and anti-p38 antibodies have been described.²⁶ Western blot analysis was done with goat anti-rabbit or goat anti-mouse secondary antibodies conjugated with peroxidase (Chemicon) and the ECL detection reagents (GE Healthcare).

Immunoprecipitation

The Pol domain of GagPol was inserted into the BglII site of pRS315-PGK²⁵ (*CEN/ARS*, *LEU2*²⁷). FLAG-Pol was expressed with an N-terminal MGDYKDDDDKPW sequence corresponding to the FLAG epitope (underlined). Plasmids pRS315-PGK-FLAG or pRS315-PGK-FLAG-Pol were used to transform yeast W303-1Bα strain (*leu2*, *his3*, *trp1*, *ura3*, *ade2*). Cells were grown at 28 °C in 1 l of minimal YNB medium (0.7% (w/v) yeast nitrogen base without amino acid, 2% (w/v) glucose) supplemented with uracil, adenine, histidine and tryptophan, to an *A*₆₀₀ of 1. Cells were washed, suspended in 5 ml of ice-cold extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) and lysed at 2100 bar (1 bar=0.1 Mpa) in a One Shot cell disrupter (Constant Systems Ltd) in the presence of 1 mM benzamidine and 1 mM PMSF. Extracts were clarified by centrifugation at 12,000g for 15 min at 4 °C, followed by centrifugation for 40 min at 160,000g at 4 °C. The supernatant was incubated for 2 h, at 4 °C, after addition of 120 µl of a 1:1 slurry of ANTI-FLAG M2 affinity gel (Sigma). The matrix was washed extensively and suspended in NETN50 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% (v/v) NP40). Anti-FLAG agarose incubated with an extract of yeast transformed with pRS315-PGK-FLAG-Pol is denoted FLAG-Pol matrix, or FLAG matrix when incubated with the control extract of yeast transformed with pRS315-PGK-FLAG. Before incubation with purified proteins, a fraction of the matrix was treated with SDS and analyzed by Western blotting with anti-FLAG antibodies to check that similar amounts of the different FLAG-proteins were bound to the matrix.

Purified proteins (0.1 ml at 2 µM) were incubated with 30 µl of FLAG or FLAG-Pol matrix in NETN50 containing BSA at 10 µg/ml. The mixture was incubated for 1 h at 4 °C with constant shaking. After centrifugation for 1 min at 13,000g at 4 °C, agarose beads were washed twice with 200 µl of NETN50, once with 200 µl of NETN250 (NETN50 containing 250 mM NaCl) and twice with 200 µl of NETN50. Beads were suspended in 36 µl of NETN50 and specific elution from an ANTI-FLAG M2 affinity gel was done after addition of 4 µl of FLAG peptide (5 mg/ml; Sigma). After incubation for 30 min at 4 °C, the supernatant was recovered by centrifugation and fractions were analyzed by Western blotting.

Acknowledgements

We thank Riccardo Freguja and Sebastian Flisiak for their involvement in the early stages of this study. This work was supported by grants from the

Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). L.K. is the recipient of a doctoral fellowship of Ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche. G.O. and J.D. were the recipients of postdoctoral fellowships of Agence Nationale de Recherches sur le SIDA and of Centre National de la Recherche Scientifique, respectively.

References

1. Abbink, T. E. & Berkhout, B. (2008). HIV-1 reverse transcription initiation: a potential target for novel antivirals? *Virus Res.* **134**, 4–18.
2. Jiang, M., Mak, J., Ladha, A., Cohen, E., Klein, M., Rovinski, B. & Kleiman, L. (1993). Identification of tRNAs incorporated into wild-type and mutant human immunodeficiency virus type-1. *J. Virol.* **67**, 3246–3253.
3. Mak, J., Jiang, M., Wainberg, M. A., Hammarskjöld, M. L., Rekosh, D. & Kleiman, L. (1994). Role of Pr160Gag-Pol in mediating the selective incorporation of tRNA^{Lys} into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol.* **68**, 2065–2072.
4. Cen, S., Khorchid, A., Javanbakht, H., Gabor, J., Stello, T., Shiba, K. *et al.* (2001). Incorporation of lysyl-tRNA synthetase into human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **75**, 5043–5048.
5. Francin, M., Kaminska, M., Kerjan, P. & Mirande, M. (2002). The N-terminal domain of mammalian lysyl-tRNA synthetase is a functional tRNA-binding domain. *J. Biol. Chem.* **277**, 1762–1769.
6. Francin, M. & Mirande, M. (2003). Functional dissection of the eukaryotic-specific tRNA-interacting factor of lysyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.* **278**, 1472–1479.
7. Mirande, M. (2010). Processivity of translation in the eukaryote cell: role of aminoacyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett.* **584**, 443–447.
8. Cen, S., Javanbakht, H., Niu, M. J. & Kleiman, L. (2004). Ability of wild-type and mutant lysyl-tRNA synthetase to facilitate tRNA^{Lys} incorporation into human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **78**, 1595–1601.
9. Tolkunova, E., Park, H., Xia, J., King, M. P. & Davidson, E. (2000). The human lysyl-tRNA synthetase gene encodes both the cytoplasmic and mitochondrial enzymes by means of an unusual alternative splicing of the primary transcript. *J. Biol. Chem.* **275**, 35063–35069.
10. Kaminska, M., Shalak, V., Francin, M. & Mirande, M. (2007). Viral hijacking of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase. *J. Virol.* **81**, 68–73.
11. Mirande, M. (2005). Multi-aminoacyl-tRNA synthetase complexes. In (Ibba, M., Francklyn, C. & Cusack, S., eds), pp. 298–308, Landes Bioscience, Georgetown, TX.
12. Gabor, J., Cen, S., Javanbakht, H., Niu, M. J. & Kleiman, L. (2002). Effect of altering the tRNA₃^{Lys} concentration in human immunodeficiency virus type

- 1 upon its annealing to viral RNA, GagPol incorporation, and viral infectivity. *J. Virol.* **76**, 9096–9102.
13. Javanbakht, H., Halwani, R., Cen, S., Saadatmand, J., Musier-Forsyth, K., Gottlinger, H. & Kleiman, L. (2003). The interaction between HIV-1 Gag and human lysyl-tRNA synthetase during viral assembly. *J. Biol. Chem.* **278**, 27644–27651.
 14. Saadatmand, J., Guo, F., Cen, S., Niu, M. & Kleiman, L. (2008). Interactions of reverse transcriptase sequences in Pol with Gag and LysRS in the HIV-1 tRNA₃^{Lys} packaging/annealing complex. *Virology*, **380**, 109–117.
 15. Kovaleski, B. J., Kennedy, R., Hong, M. K., Datta, S. A., Kleiman, L., Rein, A. & Musier-Forsyth, K. (2006). In vitro characterization of the interaction between HIV-1 Gag and human lysyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.* **281**, 19449–19456.
 16. Kaminska, M., Havrylenko, S., Decottignies, P., Le Marechal, P., Negrutskii, B. & Mirande, M. (2009). Dynamic organization of aminoacyl-tRNA synthetase complexes in the cytoplasm of human cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 13746–13754.
 17. Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H. & Brent, R. (1993). Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell*, **75**, 791–803.
 18. Kaminska, M., Havrylenko, S., Decottignies, P., Gillet, S., Marechal, P. L., Negrutskii, B. & Mirande, M. (2009). Dissection of the structural organization of the aminoacyl-tRNA synthetase complex. *J. Biol. Chem.* **284**, 6053–6060.
 19. Robinson, J. C., Kerjan, P. & Mirande, M. (2000). Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: quantitative analysis of protein-protein interactions and mechanism of complex assembly. *J. Mol. Biol.* **304**, 983–994.
 20. Quevillon, S., Robinson, J. C., Berthonneau, E., Siatecka, M. & Mirande, M. (1999). Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: Identification of protein-protein interactions and characterization of a core protein. *J. Mol. Biol.* **285**, 183–195.
 21. Arion, D., Harada, R., Li, X. G., Wainberg, M. A. & Parniak, M. A. (1996). HIV-1 reverse transcriptase shows no specificity for the binding of primer tRNA (Lys3). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**, 839–843.
 22. Zhu, K., Dobard, C. & Chow, S. A. (2004). Requirement for integrase during reverse transcription of human immunodeficiency virus type 1 and the effect of cysteine mutations of integrase on its interactions with reverse transcriptase. *J. Virol.* **78**, 5045–5055.
 23. Pavon-Eternod, M., Wei, M., Pan, T. & Kleiman, L. (2010). Profiling non-lysyl tRNAs in HIV-1. *RNA*, **16**, 267–273.
 24. Gampel, A. & Tzagoloff, A. (1989). Homology of aspartyl- and lysyl-tRNA synthetases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **86**, 6023–6027.
 25. Cirakoglu, B. & Waller, J. P. (1985). Leucyl-tRNA and lysyl-tRNA synthetases, derived from the high-Mr complex of sheep liver, are hydrophobic proteins. *Eur. J. Biochem.* **151**, 101–110.
 26. Mirande, M., Cirakoglu, B. & Waller, J. P. (1982). Macromolecular complexes from sheep and rabbit containing seven aminoacyl-tRNA synthetases. III. Assignment of aminoacyl-tRNA synthetase activities to the polypeptide components of the complexes. *J. Biol. Chem.* **257**, 11056–11063.
 27. Golinelli-Cohen, M. P., Zakrzewska, A. & Mirande, M. (2004). Complementation of yeast Arc1p by the p43 component of the human multisynthetase complex does not require its association with yeast MetRS and GluRS. *J. Mol. Biol.* **340**, 15–27.

CHAPITRE II

**Activation de la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale
humaine après maturation
de son précurseur prémitochondrial**

CHAPITRE II : ACTIVATION DE LA LYSYL ARNt SYNTHETASE MITOCHONDRIALE HUMAINE APRES MATURATION DE SON PRECURSEUR PREMITOCHONDRIAL

Comme présenté dans l'introduction, c'est la forme mitochondriale de la LysRS qui est responsable du transport et de l'encapsidation de l'ARNt_{3^{Lys}} dans les particules du VIH-1. Sa capacité à former un complexe d'encapsidation avec GagPol met en jeu plusieurs paramètres: la capacité de son domaine catalytique à interagir avec les régions TF et IN du domaine Pol de GagPol, la disponibilité de la LysRS, et sa capacité d'interaction avec l'ARNt.

Dans le cadre de notre étude, nous avons voulu savoir à quel stade la LysRS mitochondriale est capturée et acheminée vers les virions. Cela se fait-il lorsqu'elle est sous forme de précurseur pmLysRS avant son entrée dans la mitochondrie, ou après son clivage et sa maturation, donnant ainsi la forme mature? Cette dernière doit-elle être relarguée de la mitochondrie pour interagir avec GagPol? (Figure 40).

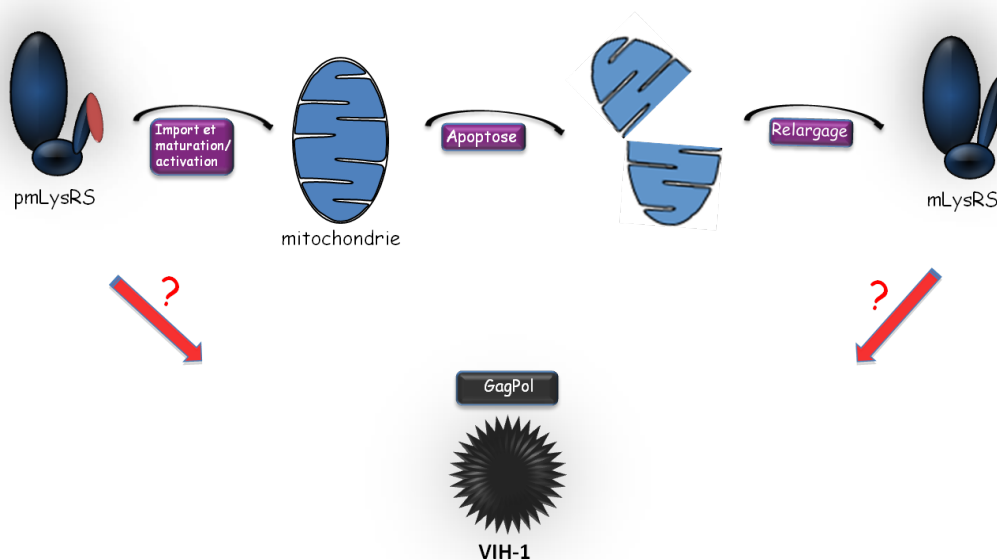


Figure 40. L'encapsidation de la LysRS mitochondriale: GagPol interagit avec la LysRS mitochondriale soit avant soit après son import mitochondrial.

Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons étudié la maturation de la mLysRS à partir de son précurseur pmLysRS lors de la translocation mitochondriale. Nous avons recherché quel était le site de maturation de cet enzyme, et nous avons caractérisé les deux

formes mitochondriales de la LysRS en déterminant leurs paramètres catalytiques dans la réaction d'aminocyclation de l'ARNt et nous avons étudié leur interaction avec l'ARNt_{3^{Lys}}.

I. Généralités sur la protéosynthèse chez l'homme

A. La synthèse protéique chez la mitochondrie est de type bactérien

1. Le génome mitochondrial

La mitochondrie contient plusieurs copies d'un ADN circulaire (ADNm) double brin. C'est un génome très compact, il ne contient aucune séquence intronique. Il code pour 13 protéines qui sont les constituants de la chaîne respiratoire. Il code également pour 22 ARNt et 2 ARNr (Figure 41). Toutes les autres protéines mitochondriales sont codées par le génome nucléaire de la cellule et sont transloquées vers la mitochondrie.

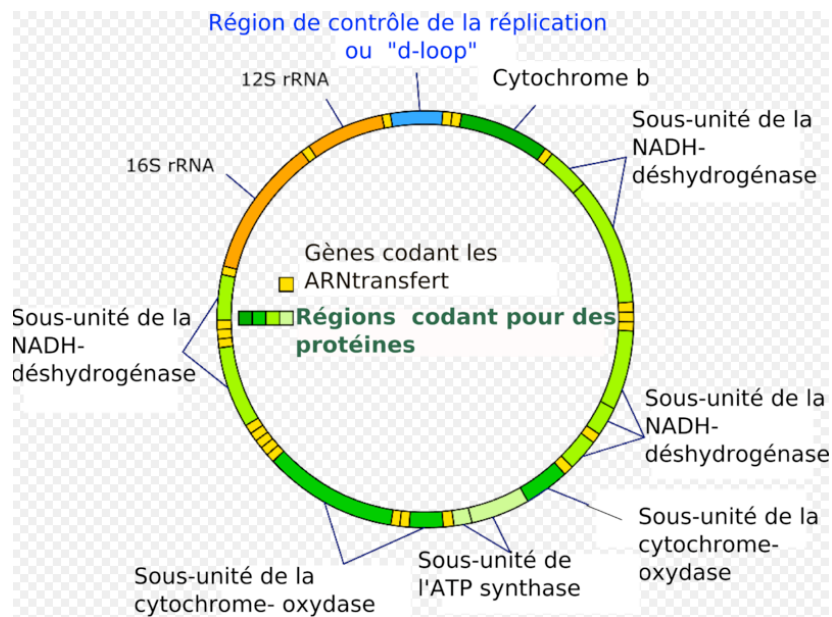


Figure 41. Génome mitochondrial humain: Le génome mitochondrial code pour les protéines de la chaîne respiratoire (régions en vert) et pour les ARNt et ARNr (régions en jaune).

2. La synthèse protéique mitochondriale

La traduction des ARNm mitochondriaux se fait au niveau de la membrane mitochondriale interne (Liu & Spremulli, 2000). Le mécanisme de la traduction dans la mitochondrie est proche du système eubactérien, mais il présente certaines particularités; en

effet, le code génétique mitochondrial possède des variations par rapport au code universel. Pour le génome mitochondrial des mammifères, le codon stop opale UGA est réassigné en codon tryptophane, le codon AUA en codon méthionine et les codons AGA et AGG en codons stop. Enfin, les ribosomes mitochondriaux sont particuliers, ils ont une faible teneur en ARNr.

3. L'origine endosymbiotique

L'endosymbiote original de la mitochondrie actuelle serait une α -protéobactérie (Margulis, 1981). Au cours de l'évolution, il aurait subi un transfert massif de ses gènes vers le génome de la cellule hôte réduisant ainsi drastiquement le génome mitochondrial.

4. Les aminoacyl-ARNt synthétases mitochondriales

Les partenaires de la synthèse protéique mitochondriale sont issus de compartiments différents. Les ARNt sont en grande majorité synthétisés à partir de gènes mitochondriaux tandis que les synthétases sont toutes codées par le génome nucléaire, synthétisées dans le cytoplasme puis importées dans la mitochondrie.

Les aaRS mitochondriales sont codées par des gènes distincts de ceux qui codent pour les aaRS cytoplasmiques sauf pour deux synthétases: la GlyRS et la LysRS. Pour la GlyRS, deux sites d'initiation de la traduction permettent de donner deux formes de l'enzyme (Mudge *et al*, 1998) tandis que pour la LysRS, les deux formes sont issues d'un épissage alternatif (Tolkunova *et al*, 2000).

Les aaRS mitochondriales ont des structures oligomériques semblables aux aaRS bactériennes sauf dans le cas des GlyRS (α_2) et PheRS (α). Elles conservent les motifs permettant de les définir comme classe I ou II. Les déterminants d'identité pour la reconnaissance des ARNt peuvent être différents de ceux de leurs homologues cytoplasmiques.

B. La maturation de la pmLysRS humaine

La mLysRS est la forme mitochondriale mature; elle est générée à partir du précurseur pmLysRS qui contient en N-terminal les 49 acides aminés spécifiques de cette forme. La maturation de la pmLysRS a lieu lors de sa translocation dans la mitochondrie par l'intervention des protéases membranaires mitochondriales. Les modalités exactes de cette

maturation ne sont pas encore connues. Le programme Mitoprot prédit une localisation mitochondriale à cette protéine (Claros, 1995). Il identifie également un site de coupure potentiel entre les résidus Lys¹⁶ et Thr¹⁷, ce qui conduit à la forme m*LysRS, forme prédite de mLysRS.

C. Les autres activités potentielles de la LysRS mitochondriale

Tout comme la cLysRS, la forme mitochondriale de l'enzyme joue des rôles non canoniques dans la cellule, en plus de son implication dans la formation du complexe d'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys}.

Une mutation de la Cu,Zn-superoxyde dismutase (SOD1), est à l'origine de la sclérose latérale amyotrophique (ALS). Cette mutation dans SOD1 conduit à des interactions aberrantes avec des protéines codées par le noyau et destinées à un import mitochondrial (Kunst *et al*, 1997). Dans les cellules de mammifères, le mutant de SOD1 interagit préférentiellement avec la pmLysRS (Kawamata *et al*, 2008). En présence du mutant de SOD1, la pmLysRS montre une grande instabilité, elle est mal repliée et forme des agrégats avant son importation dans la mitochondrie, devenant ainsi une cible pour la dégradation par le protéasome. L'importation de la pmLysRS vers la mitochondrie étant affectée, la synthèse protéique mitochondriale est de ce fait diminuée. En fin de compte, les interactions anormales entre le mutant de SOD1 et la pmLysRS aboutissent à des anomalies morphologiques mitochondriales et à la toxicité cellulaire. La pmLysRS est la première protéine mitochondriale dont l'interaction avec le mutant de SOD1 contribue au dysfonctionnement mitochondrial dans l'ALS.

II. Activation de la LysRS lors de son import dans la mitochondrie

Dans un premier temps, nous avons étudié la maturation de la pmLysRS. Nous avons voulu déterminer le site de coupure exacte du peptide d'adressage vers la mitochondrie car nos résultats suggéraient que le site prédit de clivage était erroné. Par la suite, nous avons déterminé les paramètres cinétiques dans la réaction d'aminacylation de l'ARNt des formes mitochondriales de la LysRS ainsi que leurs capacités d'interaction avec l'ARNt₃^{Lys}. La comparaison des données obtenues pour l'enzyme avant et après sa maturation a permis de

déterminer à quel stade cette dernière est le plus efficace et donc utilisable pour le transport de l'ARNt^{Lys}.

A. L'identification du site de maturation de la LysRS mitochondriale

L'observation *in cellulo* dans des cellules HeLa en culture d'une forme mitochondriale maturée de plus petite taille que la mLysRS prédite, nous a conduit à rechercher le site exacte de maturation de la pmLysRS.

A partir de ces observations, nous avons voulu déterminer expérimentalement le site de maturation de la pmLysRS *in vivo*. La pmLysRS a été surexprimée dans les cellules HeLa. Les produits de maturation de pmLysRS ont été purifiés. Trois produits de maturation ont été observés et soumis à l'analyse N-terminale par dégradation d'Edman et LC-MS/MS. Il s'agit d'un produit majeur issu de coupures entre les Gly³⁰ et Gln³¹ et de deux produits mineurs issus de coupure entre les Glu²⁶ et Leu²⁷ ainsi qu'entre les Phe⁴⁴ et Ser⁴⁵ (Figure 42). Lorsque la pmLysRS a été produite dans les cellules d'insectes High Five, un seul produit maturé a été observé, il correspond également au clivage entre la Gly³⁰ et Gln³¹, qui serait le site de maturation de la pmLysRS.

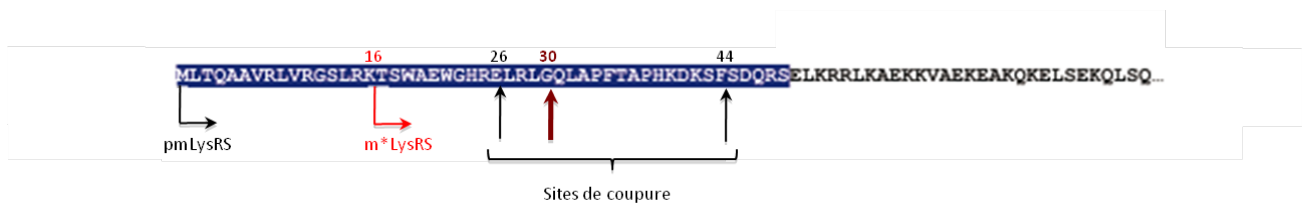


Figure 42. Sites putatifs de maturation de la pmLysRS en N-terminal: Le N-terminal de la pmLysRS complète est indiqué. La forme maturée prédictée par Mitoprot est indiquée (m*LysRS). Les 3 sites de coupure déterminés expérimentalement dans les produits de maturation *in vivo* sont également indiqués. C'est la coupure entre G³⁰ et Q³¹ qui est le site véritable de maturation de la pmLysRS.

B. La détermination de la séquence minimale de la pmLysRS permettant son import mitochondrial

1. Par microscopie confocale

Pour déterminer la séquence signal minimale permettant l'import mitochondrial, des régions N-terminales de tailles croissantes de la pmLysRS ont été fusionnées à la GFP. Ces séquences correspondent aux 8, 16, 27, 38, 49 et 83 résidus N-terminaux de la pmLysRS. Par microscopie confocale, une localisation mitochondriale complète a été observée pour la fusion

GFP qui porte 38 résidus N-terminaux. La plupart de ces résidus sont enlevés durant l'import mitochondrial (coupure entre la Gly³⁰ et Gln³¹).

2. Par complémentation dans les cellules de levure après sporulation

Nous avons aussi abordé le problème de la translocation mitochondriale de la pmLysRS humaine par une approche de complémentation *in vivo* de la LysRS cytoplasmique endogène de levure (yLysRS). En effet, nous avons observé que les cLysRS et m*LysRS humaines peuvent compléter la délétion du gène KRS1 de levure. Or, l'expression de la pmLysRS humaine ne conduit pas à une complémentation de la LysRS cytoplasmique de levure, car le produit de traduction est transloqué dans les mitochondries de levure. Nous avons utilisé cette propriété pour déterminer quelles délétions N-terminales de la pmLysRS pourraient empêcher son adressage mitochondrial, et donc permettre la complémentation.

Six séquences de la pmLysRS humaine ont été clonées dans le vecteur de levure pYeDP10; elles correspondent à des régions N-terminales de tailles décroissantes de la pmLysRS (Figure 43). La souche de levure diploïde ccdYK dont l'un des allèles du gène KRS1 est remplacé par le gène TRP1 a été transformée par les six plasmides exprimant les formes délétées de la pmLysRS. Après sporulation des levures diploïdes transformées, les spores ont été disséquées et isolées. Si la forme de pmLysRS délétée dans son extrémité N-terminale est capable de compléter le délétion du gène KRS1 de levure, et n'est donc pas transloquée dans les mitochondries, alors les 4 spores sont viables. La présence dans les souches haploïdes isolées de LysRS humaine et l'absence de la forme endogène yLysRS ont été vérifiées par western blot. Nous avons observé que la délétion des 3 premiers résidus de pmLysRS empêche son adressage mitochondrial.

3. Conclusion

Les deux approches décrites sont complémentaires. L'étude par microscopie confocale montre que la séquence minimale permettant une localisation mitochondriale totale est composée des 38 résidus N-terminaux de la pmLysRS. La deuxième approche, utilisant la complémentation endogène chez la levure a permis de mettre en évidence l'importance des premiers résidus N-terminaux dans le processus d'import mitochondrial.



Figure 43. Complémentation cytoplasmique de la pmLysRS dans la levure: Les six séquences de pmLysRS portant des délétions N-terminales qui ont servi à nos travaux sont indiquées. Surlignées en bleu sont indiquées les séquences spécifiques de pmLysRS. Les sites de maturation putatif (m*LysRS) et déterminé expérimentalement (mLysRS) de pmLysRS sont indiqués.

C. Caractérisation biochimique des deux formes de la LysRS mitochondriale

1. L'activité d'aminocyclisation

Les paramètres catalytiques de la cLysRS ainsi que ceux de la forme Δ NLysRS avaient déjà été déterminés (Francin *et al*, 2002). Nous avons voulu déterminer l'impact de la mutation du motif $^{20}\text{KxxxKRxxK}^{28}$ de cLysRS en un motif RxxxKRxxK , où la lysine en position 20 est remplacée par une arginine, dans les formes mitochondriales de LysRS. Les paramètres déterminés pour la forme mitochondriale mature mLysRS sont similaires à ceux de la forme cLysRS. Tandis que pour la forme pmLysRS le K_M pour l'ARNt₃^{Lys} est 4 fois plus élevé comparé à celui retrouvé pour la cLysRS, de plus elle se rapproche plus du K_M de la Δ NLysRS.

2. La capacité d'interaction avec l'ARNt₃^{Lys}

Nous avons analysé la capacité d'interaction des pmLysRS et mLysRS avec l'ARNt₃^{Lys} par des expériences de retard sur gel. La mLysRS interagit 4 fois moins bien avec l'ARNt₃^{Lys} que la cLysRS avec ce même ARNt, cela suggère que la substitution de la K²⁰ par une R dans le motif consensus $^{20}\text{KxxxKRxxK}$ a un impact négatif sur l'association avec l'ARNt₃^{Lys}. L'étude de l'interaction de la pmLysRS avec l'ARNt₃^{Lys} nous montre que les 30 résidus impliqués dans l'import mitochondrial bloquent complètement l'association avec l'ARNt₃^{Lys}. L'activation de la mLysRS se fait par sa maturation et donc par la coupure du peptide signal correspondant aux 30 acides aminés de l'extension N-terminale.

III. Rôle de la mLysRS dans l'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys}

Au laboratoire, Kaminska et collaborateurs ont déterminé que seule l'espèce mitochondriale de la LysRS était retrouvée dans les particules virales du VIH-1, servant de transporteur de l'ARNt₃^{Lys} (Kaminska *et al*, 2007b). Comme la cLysRS qui est dans MARS est indisponible pour l'encapsidation, l'interrogation était de savoir à quel moment la forme mitochondriale de LysRS était disponible pour une interaction avec GagPol: sous forme de précurseur pmLysRS ou après maturation donnant la forme activée de l'enzyme.

En étudiant les paramètres catalytiques des formes pmLysRS et mLysRS ainsi que leur capacité d'interaction avec l'ARNt₃^{Lys}, nous avons observé que le motif de liaison de l'ARNt des LysRS mitochondriales était moins efficace que celui de la cLysRS conduisant à une moins forte liaison des ARNt^{Lys}. À cet effet, il faut considérer que la synthèse protéique dans la mitochondrie est de type bactérien. Si la mLysRS avait une affinité pour l'ARNt aussi forte que la cLysRS, la dissociation de l'ARNt aminoacylé serait une étape limitante de la réaction d'aminoacylation. Le facteur d'élongation eFTu de type bactérien ne peut remplacer le facteur EF1A dans ce processus de canalisation de l'ARNt (Negrutskii *et al*, 1999). Une autre conséquence de cette interaction plus faible c'est que l'ARNt₃^{Lys} sera plus facilement relargué dans le virion. Une fois GagPol mûré, il y aura relargage de l'ARNt₃^{Lys} que la RT pourra utiliser comme amorce pour la transcription inverse du génome viral.

Ces mêmes données démontrent qu'il faut une activation de la pmLysRS pour qu'elle puisse jouer le rôle de transporteur de l'ARNt₃^{Lys}. La séquence d'adressage mitochondriale de la pmLysRS neutralise le domaine ESD de la LysRS probablement en masquant la séquence d'interaction avec l'ARNt (Figure 44).

En résumé, la pmLysRS ne forme pas de complexe stable avec l'ARNt et constitue donc un mauvais transporteur de l'ARNt₃^{Lys}. Son activation lors de sa maturation par le clivage du peptide signal par les protéases mitochondriales lui permet d'interagir avec les ARNt^{Lys}. La mLysRS, une fois libérée de la mitochondrie pourra interagir avec les ARNt^{Lys} cellulaires, et sera recrutée par la protéine GagPol (Figure 45).

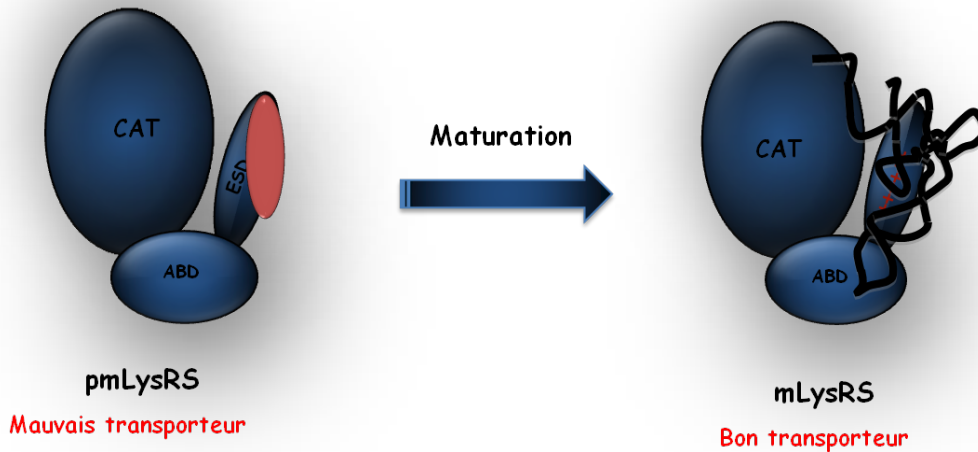


Figure 44. Activation de la pmLysRS: La maturation de la pmLysRS en N-terminal conduit à son activation et à l'exposition du motif d'interaction avec l'ARNt symbolisé ici par des + de couleur rouge.

La sortie de la mLysRS de la mitochondrie est rendue possible grâce à l'intervention de la protéine virale Vpr, qui agit sur la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Il est connu que Vpr est capable d'induire les cellules en apoptose et par conséquent de permettre le relargage des protéines mitochondriales hors de la mitochondrie (Jacotot *et al*, 2000). Kaminska et collaborateurs, ont démontré que l'addition de Vpr à des cellules humaines en culture à de très faibles concentrations provoquait l'arrêt de la croissance et menait à l'apoptose (Kaminska *et al*, 2007a). Dans leurs expériences, lorsqu'ils rajoutaient Vpr dans le milieu de culture de cellules HeLa exprimant stablement la pmLysRS fusionnée à la GFP, ils observaient que le marquage mitochondrial diminuait drastiquement au bout de 48h de traitement par Vpr. Ses résultats suggéraient que Vpr pouvait induire la relocalisation de la LysRS mitochondriale. L'action de Vpr ne se ferait pas par une interaction directe avec la LysRS mais se résumerait à un effet indirect sur la localisation de la LysRS mitochondriale.

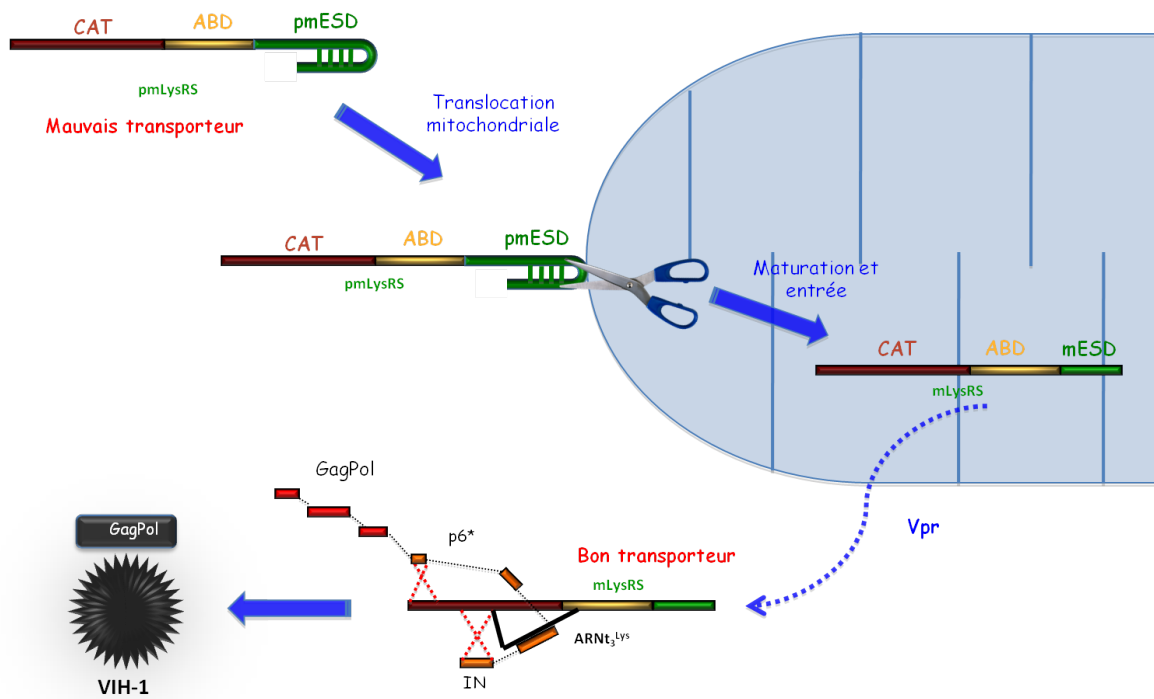


Figure 45. Schéma récapitulatif de l'étape de capture de la LysRS mitochondriale par le VIH-1: La pmLysRS est un mauvais transporteur de l'ARNt. Une fois transloquée dans la mitochondrie, elle sera maturée et suite à l'expression de Vpr, la mLysRS pourra quitter la mitochondrie et formera le complexe d'encapsulation avec l'ARNt_{3^{Lys}} et GagPol et sera dirigée vers les virions.

ARTICLE 2

Activation of human mitochondrial lysyl-ARNt synthetase upon maturation of its premitochondrial precursor

José DIAS, Guillaume OCTOBRE, Lydia KOBBI, Martine
COMISSO, Sebastian FLISIAK and Marc MIRANDE

Soumis

Activation of human mitochondrial lysyl-tRNA synthetase requires maturation of its pre-mitochondrial precursor *

José Dias, Guillaume Octobre, Lydia Kobbi, Martine Comisso, Sebastian Flisiak and Marc
Mirande⁺

*Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, Centre de Recherche de Gif, C.N.R.S.,
1 Avenue de la Terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette, France.*

*This work was supported by grants from the "Centre National de la Recherche Scientifique", and the "Agence Nationale de Recherches sur le Sida". J.D. and G.O. were the recipients of postdoctoral fellowships of "Centre National de la Recherche Scientifique" and of "Agence Nationale de Recherches sur le SIDA", respectively. L.K. and S.F. were the recipients of a doctoral fellowship of "Ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche".

⁺Corresponding author.

email: Marc.Mirande@lebs.cnrs-gif.fr

phone: + 33 1 69 82 35 05

fax: + 33 1 69 82 31 29

Running title: Human mitochondrial LysRS

ABSTRACT:

The cytoplasmic and mitochondrial species of human lysyl-tRNA synthetase are encoded by a single gene by means of alternative splicing of the KARS1 gene. The cytosolic enzyme possesses a eukaryotic-specific N-terminal polypeptide extension that confers on the native enzyme potent tRNA-binding properties require for the vectorial transfer of tRNA from the synthetase to elongation factor EF1A within the eukaryotic translation machinery. The mitochondrial enzyme is matured from its precursor upon its targeting to that organelle. To understand how the two enzymes are adapted to participate in two distinct translation machineries, of eukaryotic or bacterial origin, respectively for the cytoplasmic and the mitochondrial enzymes, we characterized the mitochondrial LysRS species. Here we report that cleavage of the precursor of mitochondrial LysRS leads a mature enzyme with reduced tRNA-binding properties as compared to the cytoplasmic counterpart. This adaptation mechanism may prevent inhibition of translation through sequestration of lysyl-tRNA on the synthetase in a compartment where the bacterial-like elongation factor EF-Tu could not assist its dissociation from the synthetase. We also observed that the RxxxKRxxK tRNA-binding motif is completely inactive in the precursor form of mitochondrial LysRS, its activation requires cleavage of the mitochondrial targeting sequence. The finding that maturation of the precursor is needed to activate the tRNA-binding properties of this enzyme has strong implications on the spatio-temporal regulation of its activities, and is consistent with previous studies suggesting that the only LysRS species able to promote tRNA^{Lys} packaging into HIV-1 viral particles is the mature form of the mitochondrial enzyme.

INTRODUCTION

Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) activate amino acids and transfer them on cognate tRNAs (1). These enzymes are ubiquitous to all living cells that generally possess the full set of twenty enzymes, one for each amino acid. In eukaryotic cells, in addition to the cytosolic translation machinery, a distinct translation system is found in mitochondria and in plant chloroplasts. Because these two organelles are of endosymbiotic origin, from an α -proteobacteria or from a cyanobacteria, for mitochondria and chloroplasts, respectively, two or three sets of tRNA and aminoacyl-tRNA synthetases are required in these organisms (2). All aaRS are nucleus encoded, and routed to the appropriate cellular compartment. In human cells, most mitochondrial aaRSs are of prokaryotic origin and are more similar in sequence to the bacterial enzymes than to the cytosolic counterparts. There are two exceptions, where the cytosolic and mitochondrial synthetases are expressed from a single gene. This is the case of glycyl-tRNA synthetase, where the two species are translated from a single mRNA from two in-frame initiation codons (3), and of lysyl-tRNA synthetase (LysRS) which is produced from two mRNA arising by alternative splicing of the unique KARS gene (4).

Cytosolic LysRS (cLysRS) is composed of a core enzyme, corresponding to the catalytic and anticodon-binding domains, that shares 43% identical amino acid residues with bacterial LysRS, and possesses a eukaryote-specific, N-terminal polypeptide extension of 73 residues that provides the core synthetase with potent tRNA-binding capacities (5, 6). A peptide from this extension may adopt an α -helical conformation, providing a tRNA-anchoring platform (7, 8) for the acceptor-T Ψ C stem-loop of tRNA (6, 9). The structural model of the complete *Brugia malayi* asparaginyl-tRNA synthetase (10), a synthetase closely evolutionary related to LysRS, recapitulates the properties ascribed to the polypeptide extensions of class IIb eukaryotic aaRSs. These polypeptide appendices are believed to mediate processivity of tRNA handling in translation, from the synthetase to elongation factor EF1A (11).

The cLysRS species is also a component of the multi-aminoacyl-tRNA synthetase

complex (MARS) containing eight other aaRSs (arginyl-, aspartyl-, isoleucyl-, glutaminyl-, glutamyl-, leucyl-, methionyl- and prolyl-tRNA synthetases) and three auxiliary proteins (p18, p38 and p43) involved in complex assembly (12-14). Association of cLysRS to MARS primarily involves interaction of the catalytic domain of the enzyme with the N-terminal 42-amino acid residues of p38, the scaffold protein of the complex (13-15). The complex is believed to accommodate two LysRS dimers per p38 dimer (16). The crystal structure of the core enzyme, lacking its eukaryotic-specific N-terminal polypeptide extension, has been determined (17). A 3D-model of the LysRS:p38 subcomplex, comprising one p38 dimer and two LysRS dimers, has been proposed (18).

Even if the main structural state of cLysRS is its associated form within MARS, and its main physiological role is tRNA aminoacylation within the cytosolic translation machinery, other alternative functions have been ascribed to cLysRS. For example, it has been shown that cLysRS is one of the most efficient synthetases in synthesizing diadenosine tetraphosphate (Ap₄A), and that this efficiency is increased after its dissociation from MARS (19). It was recently reported that cLysRS is released from MARS after MAPK-dependent phosphorylation in activated mast cells, and is translocated into the nucleus where it activates the transcription factor MITF in an Ap₄A-dependent manner (20). Moreover, the activity of cLysRS has been described to be regulated by syntenin-1, a PDZ protein involved in various cellular functions, such as transcription, cellular trafficking or cell adhesion (21), or has been reported to be secreted in response to TNF- α to trigger proinflammatory response (22).

The translation product for the premitochondrial species of LysRS (pmLysRS) possesses a specific N-terminal sequence of 49-amino acid residues which is predicted to be processed between Lys¹⁶ and Thr¹⁷ during mitochondrial import to give the mature species (mLysRS) (4). Whereas pmLysRS and mLysRS, which share the catalytic domain of cLysRS, have the intrinsic capacity to bind p38, they are never recovered within MARS (15). This suggests that pmLysRS is strictly routed *in cellulo*, which prevents its interaction with cytosolic proteins. Mitochondrial LysRS has also additional functions in addition to aminoacylation. A mutation in Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD1), that causes amyotrophic

lateral sclerosis (ALS), induces an aberrant interaction between SOD1 and mLysRS, resulting in mitochondrial disorders (23). The mitochondrial species of LysRS is also a key element for the biology of the human immunodeficiency virus (HIV-1). Cytosolic tRNA₃^{Lys}, the primer for reverse transcription of the HIV-1 genome, is hijacked into viral particles as a complex containing the viral protein GagPol and mLysRS (15, 24).

The involvement of cLysRS and mLysRS in several functional pathways beyond translation, suggests that the spatio-temporal organization of the translation machinery is a key element for the regulation of their functions and of cellular homeostasis. To understand how pmLysRS reaches the mitochondrial compartment without interfering with cytosolic translation, we determined the signal sequences of pmLysRS involved in its mitochondrial targeting and processing, and characterized the aminoacylation activity and tRNA-binding capacity of the precursor (pmLysRS) and mature (mLysRS) mitochondrial LysRS species. Our data show that mLysRS is activated upon pmLysRS processing

MATERIALS AND METHODS

Expression and purification of LysRS expressed in *E. coli*, yeast or insect cells.

Human cytosolic and mitochondrial LysRS were expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (24) and purified (6) as described previously.

The premitochondrial form of human LysRS was either expressed in High Five insect cells after subcloning its cDNA into pFastBac1, or in BL21(DE3) *E. coli* cells after subcloning into pET28b. When expressed in insect cells, crude extract was prepared in 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 5 mM EDTA, 10% glycerol, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1% Triton X-100, 10 mM benzamidine, and 1mM Pefabloc, sonicated, and the *in vivo* matured mitochondrial LysRS was purified essentially as described previously (6), by chromatography on S-Sepharose FF, Mono Q HR 5/5 and Mono S HR 5/5 columns (GE Healthcare). This procedure gave 2.5 mg of homogeneous protein per liter of culture. Analysis by nanoESI-Q-TOF indicated that the purified protein was cleaved after Gly30. When expressed in *E. coli*, premitochondrial LysRS was not processed and was purified as described below.

The protein was expressed in *E. coli* BL21(DE3) grown in LB medium supplemented with kanamycin (50 µg/ml). Culture (6 liters) was grown at 37 °C to an $A_{600}=0.4$, transferred at 20 °C to an $A_{600}=1.0$, and expression was induced by addition of 1 mM IPTG for 5 hours. Cells were washed twice with ice-cold extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM KCl, 5 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 10% glycerol, 10 mM 2-mercaptoethanol), resuspended in the same buffer (1ml per g of cell pellet) containing 2 mM diisopropyl-fluorophosphate, 2 mM PMSF, and 2 µg/ml of antipain and chymostatin, and lysed in an Eaton Press. All subsequent steps were conducted at 4 °C. After a two-fold dilution with extraction buffer, extract was sonicated to fragment nucleic acids, diluted by addition of 1 vol. of dilution buffer containing 800 mM KCl, cell debris were removed by centrifugation at 48,000g for 30 min. Nucleic acids were removed by precipitation with Polymin P at 0.5%. The clear supernatant was diluted by addition of 2 vol. of extraction buffer without KCl, and applied to a 65 ml S-Sepharose FF column (GE Healthcare). pmLysRS was eluted by a linear gradient (20 column

vol.) of NaCl from 150 to 600 mM in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 1 mM EDTA, 10% glycerol and 10 mM 2-mercaptoethanol. After dialysis against the same buffer containing 75 mM NaCl, fractions were applied to a 4.6 ml SOURCE 15Q column (GE Healthcare), equilibrated in the same buffer and eluted by a linear gradient (20 column vol.) of NaCl from 75 to 500 mM. Fractions containing pmLysRS were directly applied on a Mono S HR 5/5 column (GE Healthcare), equilibrated in the same buffer containing 200 mM NaCl and eluted by a linear gradient (50 column vol.) of NaCl from 200 to 800 mM. Fractions containing pmLysRS were concentrated by ultrafiltration, dialyzed against 25 mM potassium phosphate pH 7.5, 2 mM DTT, 55% glycerol, and stored at -20 °C. Protein concentration was determined by using a calculated absorption coefficient of $0.77 A_{280} \text{ units} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^2$. Analysis by nanoESI-Q-TOF and by automatic Edman degradation showed that the purified protein corresponded to pmLysRS with the removal of the N-terminal Met residue.

Expression of LysRS in HeLa cells.

The cDNA of human premitochondrial LysRS (pmLysRSHs), cytoplasmic LysRS (cLysRSHs), and the cDNA of a 529 amino acids long N-terminally truncated version of cLysRSHs (Δ LysRSHs) including the anticodon-binding domain (ABD) and the catalytic domain (CAT) were amplified by PCR. The sense oligonucleotides used were GGGGAATTCATAATGTTGACGCAAGCTGCTGTAAGG, GGGGAATTCATAATGGCGGCCGTGCAGGCGGCCGA and GGGGAATTCATAATGGTGGACCCAAATCAATACTACA for pmLysRSHs, cLysRSHs and Δ LysRSHs respectively. The antisense oligonucleotide was common to the three reactions and was GGGGAATTCCTAGACAGAACTGCCAACTGTTG. The PCR products were digested by *Eco*RI, and inserted into the *Eco*RI site of the eukaryotic expression vector pSG5. The encoded proteins correspond to the full-length pmLysRSHs, cLysRSHs and to the N-terminally truncated version of cLysRSHs (Δ LysRSHs). The sequence of the recombinant plasmids was verified by DNA sequencing.

Confocal imaging.

HeLa cells were grown in F12 medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf

serum, 2 mM glutamine, 100 µg/ml of penicillin and streptomycin. Cells were transfected with Effectene (QIAGEN). For localization experiments, cells were cotransfected with a pEGFP-N1 derivative and with pDsRed2-Mito (BD Biosciences). Cells were grown into 8-well Lab-Tek II chambers (Nalge Nunc International) and observed by confocal laser scanning microscopy using a Leica TCS SP2 confocal microscope equipped with a DD488/543 mirror. GFP was excited using laser line 488 nm of an Ar laser, and detected at 500-535 nm. DsRed was excited at 543 nm with a He-Ne laser, and detected at 584-659 nm. Imaging of GFP and DsRed fluorescence was performed in a sequential manner. The expression and the stability of the fusion proteins in HeLa cells was checked by Western blot analysis with anti-GFP and anti-DsRed antibodies.

Purification of mitochondrial LysRS expressed in HeLa cells.

The cDNA of human premitochondrial LysRS (pmLysRS) was PCR-amplified between oligonucleotides GGGGAATTCATAATGTTGACGCAAGCTGCTGTAAGG and GGGGAGATCTACAGAACTGCCAACTGTTG. The PCR product was digested by *EcoRI* and *BglIII*, and inserted into the *EcoRI-BamHI* sites of the eukaryotic expression vector pSG5(His). The encoded protein corresponds to the full-length pmLysRS bearing an additional C-terminal His⁶ sequence and was verified by DNA sequencing.

The 6His-tagged pmLysRS was expressed in HeLa cells. Cells were grown to 50% confluency in 25x145mm-diameter Petri dishes (approx. 2×10^8 cells), and transfected by the CaCl₂ method with pSG5-KRSpm-6His. The cells were harvested 48h post-transfection, lysed in extraction buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM imidazole, 500 mM NaCl, 5 mM 2-mercaptoethanol, 0.5% Triton X-100 and 2.5 mM benzamidine) and homogenized by sonication to disrupt mitochondria. After lysis, the supernatant recovered after centrifugation at 10,000 x g for 15 min was loaded on a 0.5-ml nickel-nitrilotriacetic acid Superflow matrix (Qiagen) charged with Ni²⁺. After washing with buffer A (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM imidazole, 500 mM NaCl and 5 mM 2-mercaptoethanol), bound material was eluted by addition of 5 ml buffer B (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM imidazole, 500 mM NaCl and 5 mM 2-mercaptoethanol). 1 ml fractions were collected, and fractions containing mLysRS-

His⁶ were pooled (~2 ml), and dialyzed against 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 1 mM dithiothreitol (DTT). After dialysis, mLysRS-His⁶ was applied to a MonoQ HR 5/5 anion exchange column (GE Healthcare) equilibrated in dialysis buffer. Bound material was eluted by a 20-ml linear gradient of 100 to 500 mM NaCl in the same buffer. 500 μ L fractions were collected and frozen at -80 °C.

Gel retardation assay.

Plasmid p_{trnA}^{Lys} was linearized with *FokI* and subjected to *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase as described (6).

Protein-RNA interactions were analyzed using a band shift assay. Homogeneous LysRS proteins were incubated at increasing concentrations with radiolabeled-RNA (25,000 cpm per point) in a 11 μ l volume containing 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol and BSA at 0.1 mg/ml. After incubation at 25 °C for 30 min, the mixture was placed on ice and loaded on a 6% polyacrylamide gel (mono:bis, 29:1) containing 5% glycerol in 0.5 \times TBE pH 8.0 at 4 °C. After electrophoresis, the gel was fixed, dried and subjected to autoradiography. Free and bound tRNA was quantified by densitometry measurements.

tRNA aminoacylation assay.

Initial rates of tRNA aminoacylation were measured at 25 °C in 0.1 ml of 20 mM Imidazole-HCl buffer (pH 7.5), 100 mM KCl, 0.5 mM DTT, 12 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 180 μ M ¹⁴C-labeled lysine (NEN; 16.66 Ci/mol) and saturating amounts of tRNA (5). Human tRNA₃^{Lys} expressed in *E. coli* (lysine acceptance of 780 pmol/*A*₂₆₀) was used as tRNA substrate. The incubation mixture contained catalytic amounts (1-5 nM) of enzymes appropriately diluted in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM 2-mercaptoethanol, containing bovine serum albumin at 4 mg/ml. One unit of activity is the amount of enzyme producing 1 nmol of lysine-tRNA^{Lys}/min, at 25 °C. For the determination of *K_m* values for tRNA, tRNA^{Lys} concentrations of 0.1–50 μ M were used. Michaelian parameters were obtained by non-linear regression of the theoretical Michaelis-Menten equation to the experimental curve using the KaleidaGraph 3.6.5 software (Abelbeck Software).

RESULTS

Identification of the N-terminal maturation site of mitochondrial LysRS.

Mitochondrial LysRS is expressed as a precursor protein (pmKRS) containing a specific N-terminal sequence made of 49 amino acid residues, as compared with the cytoplasmic protein encoded by the same gene by a mechanism of alternative splicing (Fig. 1a). The program Mitoprot predicted that maturation of the mitochondrial precursor of LysRS might occur between residues Lys¹⁶ and Thr¹⁷, leading to the putative mature mitochondrial species of LysRS, m*KRS. When m*KRS was expressed in HeLa cells, a polypeptide migrating with an electrophoretic mobility slower than the endogenous cytoplasmic form of LysRS (cKRS) was observed with antibodies directed to the sequences common to cytosolic and mitochondrial LysRS (Fig. 1b), consistent with its larger size. This polypeptide was not directed to mitochondria because it lacks the targeting sequence (see below). By contrast, when pmKRS was expressed in HeLa cells, no polypeptide displaying an electrophoretic mobility similar to m*KRS was observed, but the intensity of the polypeptide corresponding to the migration of cKRS was increased (Fig. 1b), suggesting that maturation of pmKRS occurred beyond Lys¹⁶. This gene product was directed to the mitochondria (24) (see below), and thus the polypeptide recovered after expression in HeLa cells corresponds to the naturally *in vivo* processed, mature mitochondrial LysRS. When the same samples were probed with antibodies directed to the peptide Arg²⁵ to Lys⁴² of pmKRS, the intensity of the polypeptide corresponding to the endogenously cleaved pmKRS was much weaker than the intensity of the non processed m*KRS species. These data suggested that the maturation site of pmKRS could be located between Arg²⁵ and Lys⁴², leading to the loss of one part of the antigenic peptide in the mature protein.

To experimentally determine the maturation site of pmKRS *in vivo*, pmKRS was overexpressed in HeLa cells with a C-terminal His-tag. After 48h of expression, the endogenously processed LysRS species were purified. Three maturation products were observed (Fig. 2). The N-terminal sequence of the purified products was determined by automated Edman degradation and LC-MS/MS analysis. One minor product was cleaved

between Glu²⁶ and Leu²⁷. It might correspond to an incomplete maturation product, due to overexpression of pmKRS. The two major products were cleaved between Gly³⁰ and Gln³¹, and between Phe⁴⁴ and Ser⁴⁵. Because the maturation product identified in crude extract from HeLa cells comigrates with cKRS, and no smaller maturation product could be observed (Fig. 1), we surmise that the product cleaved between Phe⁴⁴ and Ser⁴⁵ is the result of uncontrolled proteolysis that occurred during purification of the mitochondrial species of LysRS. When pmKRS was expressed in High Five insect cells and purified to homogeneity, a single maturation product was recovered, corresponding to a cleavage between Gly³⁰ and Gln³¹ (Fig. 2). When pmKRS was expressed in *E. coli*, the purified protein corresponded to a non mature mitochondrial LysRS containing all the presequence required for its targeting into mitochondria, as assessed by automated Edman degradation analysis.

Determination of the extent of the N-terminal sequence required for mitochondrial targeting of LysRS.

To identify the minimal amino-terminal sequence necessary for mitochondrial targeting of pmKRS in human cells, N-terminal sequences of pmKRS of variable lengths were fused to GFP (Fig. 3). The fusion of full-length pmLysRS with GFP led to a classical pattern of complete mitochondrial localization. The GFP fusion proteins containing only 8 or 16 N-terminal residues of pmKRS were not targeted to mitochondria. Addition of 27 or of 38 N-terminal residues of pmKRS to GFP, led to partial (27 residues) or complete (38 residues) mitochondrial localization of the GFP fusion proteins. Insertion of additional residues of pmKRS did not change the pattern of GFP localization. Thus, the 38 N-terminal residues of pmKRS are sufficient to trigger mitochondrial localization. Most of this mitochondria targeting sequence is removed (cleavage between Gly³⁰ and Gln³¹) during the import process.

Aminoacylation activity of premitochondrial and mitochondrial LysRS.

The eukaryote-specific tRNA-binding domain of the cytoplasmic form of human LysRS increases the catalytic efficiency of the enzyme, and provides the core synthetase with a potent tRNA-binding capacity (5). The tRNA-binding motif has been mapped to the peptide ²⁰KxxxKRxxK²⁸ of cLysRS, with the four basic residues being essential for tRNA-binding

(6). From this consensus sequence, the N-terminal K²⁰ residue belongs to the cytoplasmic-specific, N-terminal sequence of 21 residues encoded by exon 1 (Fig. 4). In the mitochondrial species of LysRS, this Lys-residue is replaced by an Arg-residue encoded by exon 2. To analyze the consequence of this amino-acid substitution on the functioning of the enzyme, the catalytic parameters of cLysRS, pmLysRS and mLysRS in the tRNA^{Lys} aminoacylation reaction were determined, and compared with the kinetic constants of LysRS with a deletion of the complete eukaryote-specific domain, Δ N-LysRS (Table 1). The catalytic parameters determined for the mature mitochondrial species, mLysRS, were similar to those determined for the cytoplasmic enzyme. In contrast, the non-mature mitochondrial species, pmLysRS, showed a 4-fold increase in K_M for tRNA₃^{Lys} as compared to cLysRS, with a value of 6.4 μ M very similar to that determined for Δ N-LysRS (7.7 μ M). These data suggest that mitochondria targeting sequences of pmLysRS neutralize the tRBD of LysRS, presumably by masking the tRNA-binding motif.

The tRNA-binding capacity of mitochondrial LysRS is revealed upon maturation of its premitochondrial precursor.

Because Δ N-LysRS displays a markedly reduced affinity for tRNA ($K_d \sim 6 \mu$ M) as compared with native, cytoplasmic LysRS ($K_d = 60$ nM, expressed as monomer concentration) (5), we analyzed the capacity of pmLysRS and mLysRS to bind tRNA₃^{Lys} in a gel retardation assay (Fig. 5). The mature mitochondrial species of LysRS interacted with tRNA₃^{Lys} with an apparent dissociation constant of 250 ± 40 nM of monomers of LysRS. This K_d value was about 4-fold higher than that reported for association of cLysRS with tRNA₃^{Lys}, suggesting that the replacement of the lysine residue at position 20 by an arginine significantly weakens the interaction between the tRNA and the synthetase. More surprisingly, the presence of the mitochondria targeting sequence of 30 amino acid residues into pmLysRS completely occulted the tRNA-binding properties of the enzyme, which bound tRNA as weakly as Δ N-LysRS does. Therefore, activation of mLysRS for tRNA binding occurs following maturation and removal of the 30 first amino acid residues of pmLysRS.

DISCUSSION

It is remarkable that, despite the fact that the two LysRS species present in the cytoplasm and in the mitochondria of human cells, are encoded by the same gene by means of alternative splicing and share 576 amino acid residues, they show a clear adaptation to the translation machinery of the compartment they are directed to. Indeed, a major difference between cytosolic and mitochondrial translation results from the endosymbiotic origin of mitochondria. While eukaryotic translation evolved an integrated system where tRNA is vectorially transferred from the synthetase, to elongation factor 1A, to ribosome (25), such a subcellular organization does not exist in bacteria. To ensure that aminoacyl-tRNA are not released in the cellular fluid after aminoacylation on the synthetases and before they form a ternary complex with EF1A:GTP, aaRS acquired in evolution additional protein domains that sequester aminoacyl-tRNA to ensure processivity of tRNA handling in translation from the synthetase to elongation factor EF1A (11). The tRNA-binding domain of cLysRS, carrying the $^{20}\text{KxxxKRxxK}^{28}$ tRNA-binding motif, has been extensively studied and characterized (5, 6, 8, 9). In human mitochondria, most aaRS are bacterial-like enzymes, and do not possess these additional tRBD. Because mLysRS is a eukaryotic-like enzyme, it was interesting to understand how a member of the eukaryotic translation apparatus can participate in mitochondrial translation. Indeed, the presence of a potent tRBD on mLysRS would introduce a limiting step in tRNA release and inhibit mitochondrial translation.

In this context, it is noteworthy that the tRNA-binding motif of mLysRS ($K_d = 250$ nM) is a significantly less potent tRNA-binding motif as compared to cLysRS ($K_d = 60$ nM). The replacement of the first Lys-residue in the KxxxKRxxK motif, encoded by exon 1 in cLysRS, by an Arg-residue, encoded by exon 2 in mLysRS, could be an adaptation mechanism to prevent sequestration of aa-tRNA by the synthetase in the mitochondrial compartment. Previous studies have shown that this Lys-residue is especially important for tRNA binding, its replacement by an Ala-residue led to a significant increase in the dissociation constant for tRNA ($K_d = 300$ nM) (6).

During functional characterization of mLysRS, we have also discovered that its

precursor protein, the pmLysRS species produced in the cytosol before proteolytic maturation during mitochondrial import, behaves as the N-terminal truncated derivative of LysRS. This means that pmLysRS does not possess the tRNA-binding capacity of cLysRS or even of mLysRS. This implies that its tRBD is neutralized by the very N-terminal signal sequence of pmLysRS involved in mitochondria targeting. Its activation requires removal of the first 30 N-terminal residues occurring during mitochondrial import (Fig. 6), a maturation step resulting in the exposure of the RxxxKRxxK motif of mLysRS. The reason why the cell uses this strategy to preclude that the pmLysRS species could interfere with cytosolic translation is unclear, but may be related to a need to efficiently segregate cytosolic and mitochondrial translation, to achieve a strict compartmentalization of the two mechanisms. Because cLysRS and mLysRS are also involved in other cellular functions beyond translation, such as the immune response (20), signal transduction (22) or HIV-1 replication (24), the finding that mLysRS needs to be activated during its maturation process, also suggests that this strategy might be a prerequisite for the spatio-temporal regulation of its activities. It is noteworthy that a similar mechanism has been recently observed for another LysRS species, the mitochondria-specific LysRS from the kinetoplastid *Trypanosoma brucei* (26). In this organism, cytosolic and mitochondrial LysRS are encoded by distinct genes. The mitochondrial gene product possesses a specific C-terminal polypeptide extension, and is completely inactive for amino acid activation and tRNA-aminoacylation. It is activated upon removal of this C-terminal extension, probably by a mitochondrial protease.

The finding that pmLysRS is a poor tRNA-binding protein is also of prime interest for the understanding of the role of mitochondrial LysRS in the packaging of tRNA₃^{Lys} into HIV-1 viral particles (24). We show here that pmLysRS functionally mimics Δ N-LysRS for tRNA binding. However, N-terminally truncated LysRS, which binds poorly to tRNA^{Lys}, is not able to promote tRNA^{Lys} packaging into viral particles (27). We previously observed that the electrophoretic mobility of the mitochondrial LysRS species recovered into HIV-1 particles was not consistent with the packaging of the pmLysRS precursor or of the predicted m*LysRS mature species (cleavage between Lys¹⁶ and Thr¹⁷), but was similar to that of cLysRS (24). The data that we report here provide a rational explanation to these

observations. Maturation of pmLysRS upon translocation into mitochondria does not occur after Lys¹⁶, but after Gly³⁰, leading to a mLysRS species similar in size to cLysRS (Fig. 2). The very weak tRNA-binding capacity of pmLysRS is enhanced after maturation into mLysRS, that could then serve as a carrier for tRNA^{Lys} into viral particles, after its Vpr-assisted release from the mitochondria (28). Because tRNA should be readily released in the virions to participate into initiation of reverse transcription of the viral RNA genome, the weaker tRNA-binding properties of mLysRS, as compared to cLysRS, should favor its effectiveness in the replication process.

Acknowledgments

We thank Paulette Decottignies (Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire, Orsay), and David Cornu and Manuela Argentini (SICaPS facility of the CNRS campus of Gif-sur-Yvette) for performing amino acid sequence and LC-MS/MS analyses. We thank Spencer Brown and Marie-Noëlle Soler for access to the confocal microscope facility (Institut des Sciences du Végétal, Gif-sur-Yvette). We also thank Peng Tu and Marie-Pierre Golinelli for their involvement during early stages of this study.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Expression of the cytoplasmic and mitochondrial forms of LysRS in HeLa cells. (a) The 576 C-terminal amino acid residues encoded by exons 3 to 15 of human KARS1 gene are common (=) to the cytoplasmic (cKRS) and mitochondrial (pmKRS) species of LysRS. The 21 N-terminal residues of cKRS are encoded by exon 1, the 49 N-terminal residues of pmKRS are encoded by exon 2. The peptide sequence used to raise antibodies specific for the mitochondrial species of human LysRS are indicated by (+). The putative maturation site of pmKRS (m*KRS) is indicated. (b,c) The two gene products m*KRS and pmKRS were expressed in HeLa cells. Total extracts were analyzed by Western blotting using antibodies directed to the core domain of LysRS (anti-KRS_{ΔN} IgG) (b) or to the synthetic peptide specific for the mitochondrial form of human LysRS (anti-PepMitoKRS IgG) (c).

Figure 2. Analysis of pmLysRS expressed in human, insect, or bacterial cells. The pmKRS gene product was expressed in human cells (HeLa), in insect cells (High Five), or in bacteria (E. coli), and purified to homogeneity. The cKRS gene product expressed in yeast is shown on the left. (a), (b) and (c) represent the three polypeptides recovered after expression in HeLa cells. Their corresponding N-terminal cleavage sites determined by Edman degradation and LC-MS/MS analyses are indicated.

Figure 3. Determination of the minimal sequence signal for targeting pmLysRS to mitochondria in human cells. The subcellular localization of GFP-fusion proteins was analyzed by confocal laser scanning microscopy. HeLa cells were cotransfected with plasmids expressing GFP alone, or the LysRS-GFP fusion proteins, and with pDsRed2-Mito, a plasmid that expresses a mitochondrial protein marker. The pmKRS-GFP fusion protein contains the full pmKRS sequence, the pmx-GFP fusion proteins contain the 8, 16, 27, 38, 49 or 83 N-terminal residues of pmKRS, as indicated. Differential interference contrast (DIC), GFP fluorescence and DsRed fluorescence imaging are shown. The merge image shows a perfect match between GFP and DsRed imaging when at least 38 residues of pmKRS are fused to GFP. The amino acid sequences from the mitochondria targeting sequence are shown in

green, from the pmKRS-specific sequence in yellow, and those common to cKRS and pmKRS in white.

Figure 4. The domain-structure of the three LysRS species from human cells. The three major domains of LysRS are indicated: the catalytic domain (*CAT*; amino acid residues 241–597); the anticodon binding domain (*ABD*; amino acid residues 74–240); the eukaryote-specific domain (*ESD*; amino acid residues 23–73). Numbering is given for the cytoplasmic enzyme. The N-domains of 21, 49 or 19 amino acid residues, specific for the cytoplasmic (cytoLysRS), pre-mitochondrial (pre-mitoLysRS) or mitochondrial (mitoLysRS) forms of LysRS are shown. The tRNA-binding motif identified in cytoLysRS is indicated; the Lys residue at position 20, which is an arginine in the mitochondrial species, is shown in red. It corresponds to Arg⁴⁸ or Arg¹⁸ in pre-mitoLysRS or mitoLysRS, respectively.

Figure 5. The tRNA-binding properties of the three LysRS species from human cells. ³²P-Labeled *in vitro* transcribed tRNA₃^{Lys} was incubated with cytoLysRS, with mitoLysRS, or with pre-mitoLysRS, at different concentrations (0-1000 nM, expressed as monomer concentrations). After electrophoresis at 4 °C on a 6% native polyacrylamide gel, the mobility shift of tRNA was visualized by autoradiography. In each assay, the *bottom band* corresponds to the free tRNA species. The deduced dissociation constants (*K_d*) for tRNA are indicated.

Figure 6. Maturation of premitochondrial LysRS reveals its tRNA-binding domain. The ⁴⁸RxxxKRxxK⁵⁶ tRBD motif of pmLysRS is masked by the mitochondria import sequence. Its removal upon proteolytic maturation leads to its functional exposure in mLysRS.

REFERENCES

1. Ibba, M., and Söll, D. (2000) Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 617-650.
2. Duchene, A. M., Pujol, C., and Marechal-Drouard, L. (2009) Import of tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases into mitochondria. *Curr. Genet.* 55, 1-18.
3. Mudge, S. J., Williams, J. H., Eyre, H. J., Sutherland, G. R., Cowan, P. J., and Power, D. A. (1998) Complex organisation of the 5'-end of the human glycine tRNA synthetase gene. *Gene* 209, 45-50.
4. Tolkunova, E., Park, H., Xia, J., King, M. P., and Davidson, E. (2000) The human lysyl-tRNA synthetase gene encodes both the cytoplasmic and mitochondrial enzymes by means of an unusual alternative splicing of the primary transcript. *J. Biol. Chem.* 275, 35063-35069.
5. Francin, M., Kaminska, M., Kerjan, P., and Mirande, M. (2002) The N-terminal domain of mammalian lysyl-tRNA synthetase is a functional tRNA-binding domain. *J. Biol. Chem.* 277, 1762-1769.
6. Francin, M., and Mirande, M. (2003) Functional dissection of the eukaryotic-specific tRNA-interacting factor of lysyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.* 278, 1472-1479.
7. Agou, F., Yang, Y. S., Gesquiere, J. C., Waller, J. P., and Guittet, E. (1995) Polyanion-induced alpha-helical structure of a synthetic 23-residue peptide representing the lysine-rich segment of the N-terminal extension of yeast cytoplasmic aspartyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* 34, 569-576.
8. Yiadom, K., Hammamieh, R., Ukpabi, N., Tsang, P., and Yang, D. C. H. (2003) A peptide from the extension of Lys-tRNA synthetase binds to transfer RNA and DNA. *Peptides* 24, 987-998.
9. Francin, M., and Mirande, M. (2006) Identity elements for specific aminoacylation of a tRNA by mammalian lysyl-tRNA synthetase bearing a nonspecific tRNA-interacting factor. *Biochemistry* 45, 10153-10160.
10. Crepin, T., Peterson, F., Haertlein, M., Jensen, D., Wang, C., Cusack, S., and Kron, M. (2011) A hybrid structural model of the complete *Brugia malayi* cytoplasmic

- asparaginyl-tRNA synthetase. *J. Mol. Biol.* 405, 1056-1069.
11. Mirande, M. (2010) Processivity of translation in the eukaryote cell: role of aminoacyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett.* 584, 443-447.
 12. Kaminska, M., Havrylenko, S., Decottignies, P., Gillet, S., Marechal, P. L., Negrutskii, B., and Mirande, M. (2009) Dissection of the structural organization of the aminoacyl-tRNA synthetase complex. *J. Biol. Chem.* 284, 6053-6060.
 13. Quevillon, S., Robinson, J. C., Berthonneau, E., Siatecka, M., and Mirande, M. (1999) Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: Identification of protein-protein interactions and characterization of a core protein. *J. Mol. Biol.* 285, 183-195.
 14. Robinson, J. C., Kerjan, P., and Mirande, M. (2000) Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: Quantitative analysis of protein-protein interactions and mechanism of complex assembly. *J. Mol. Biol.* 304, 983-994.
 15. Kobbi, L., Octobre, G., Dias, J., Comisso, M., and Mirande, M. (2011) Association of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase with HIV-1 GagPol involves catalytic domain of the synthetase and transframe and integrase domains of Pol. *J. Mol. Biol.* 410, 875-886.
 16. Mirande, M. (2005) Multi-Aminoacyl-tRNA Synthetase Complexes, in *The Aminoacyl-tRNA Synthetases* (Ibba, M., Francklyn, C., and Cusack, S., Eds.), pp 298-308, Landes Bioscience, Georgetown, Texas, USA.
 17. Guo, M., Ignatov, M., Musier-Forsyth, K., Schimmel, P., and Yang, X. L. (2008) Crystal structure of tetrameric form of human lysyl-tRNA synthetase: Implications for multisynthetase complex formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 2331-2336.
 18. Fang, P., Zhang, H. M., Shapiro, R., Marshall, A. G., Schimmel, P., Yang, X. L., and Guo, M. (2011) Structural context for mobilization of a human tRNA synthetase from its cytoplasmic complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108, 8239-8244.
 19. Wahab, S. Z., and Yang, D. C. (1985) Synthesis of diadenosine 5',5''' -P1,P4-tetraphosphate by lysyl-tRNA synthetase and a multienzyme complex of aminoacyl-tRNA synthetases from rat liver. *J. Biol. Chem.* 260, 5286-5289.

20. Yannay-Cohen, N., Carmi-Levy, I., Kay, G., Yang, C. M., Han, J. M., Kemeny, D. M., Kim, S., Nechushtan, H., and Razin, E. (2009) LysRS serves as a key signaling molecule in the immune response by regulating gene expression. *Mol. Cell* 34, 603-611.
21. Meerschaert, K., Remue, E., De Ganck, A., Staes, A., Boucherie, C., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Kleiman, L., and Gettemans, J. (2008) The tandem PDZ protein Syntenin interacts with the aminoacyl tRNA synthetase complex in a lysyl-tRNA synthetase-dependent manner. *J Proteome Res* 7, 4962-4973.
22. Park, S. G., Kim, H. J., Min, Y. H., Choi, E. C., Shin, Y. K., Park, B. J., Lee, S. W., and Kim, S. (2005) Human lysyl-tRNA synthetase is secreted to trigger proinflammatory response. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 6356-6361.
23. Kawamata, H., Magrane, J., Kunst, C., King, M. P., and Manfredi, G. (2008) Lysyl-tRNA synthetase is a target for mutant SOD1 toxicity in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 283, 28321-28328.
24. Kaminska, M., Shalak, V., Francin, M., and Mirande, M. (2007) Viral hijacking of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase. *J. Virol.* 81, 68-73.
25. Negrutskii, B. S., Stapulionis, R., and Deutscher, M. P. (1994) Supramolecular organization of the mammalian translation system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 964-968.
26. Espanol, Y., Thut, D., Schneider, A., and de Poupiana, L. R. (2009) A mechanism for functional segregation of mitochondrial and cytosolic genetic codes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 19420-19425.
27. Cen, S., Javanbakht, H., Niu, M. J., and Kleiman, L. (2004) Ability of wild-type and mutant lysyl-tRNA synthetase to facilitate tRNA^{Lys} incorporation into human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 78, 1595-1601.
28. Kaminska, M., Francin, M., Shalak, V., and Mirande, M. (2007) Role of HIV-1 Vpr-induced apoptosis on the release of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase. *FEBS Lett.* 581, 3105-3110.

Table 1. Kinetic constants^a of cytoplasmic (cLysRS), pre-mitochondrial (pmLysRS), mitochondrial (mLysRS), and N-terminal truncated LysRS in tRNA₃^{Lys} aminoacylation

LysRS	K_M (μM) (tRNA ₃ ^{Lys}) ^b	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)
cLysRS	1.5 ± 0.3	4.3 ± 0.8	2.87
pmLysRS	6.4 ± 0.7	6.8 ± 0.9	1.06
mLysRS	2.8 ± 0.5	4.9 ± 0.8	1.75
ΔN -LysRS	7.7 ± 0.9	8.1 ± 0.8	1.05

^aStandard errors were determined from at least two independent data sets.

^btRNA₃^{Lys} acceptance of 780 pmol / A_{260} .

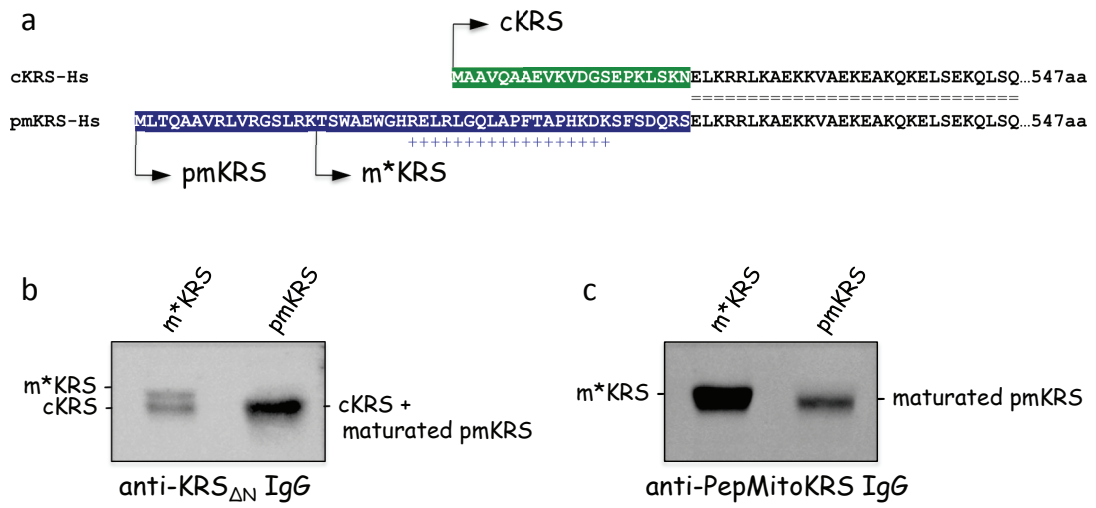


Fig. 1

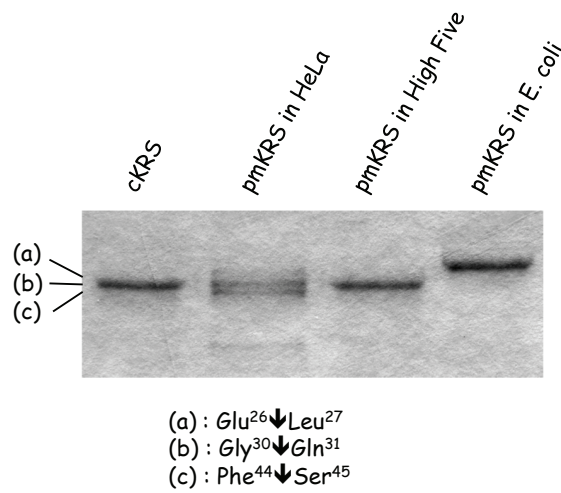
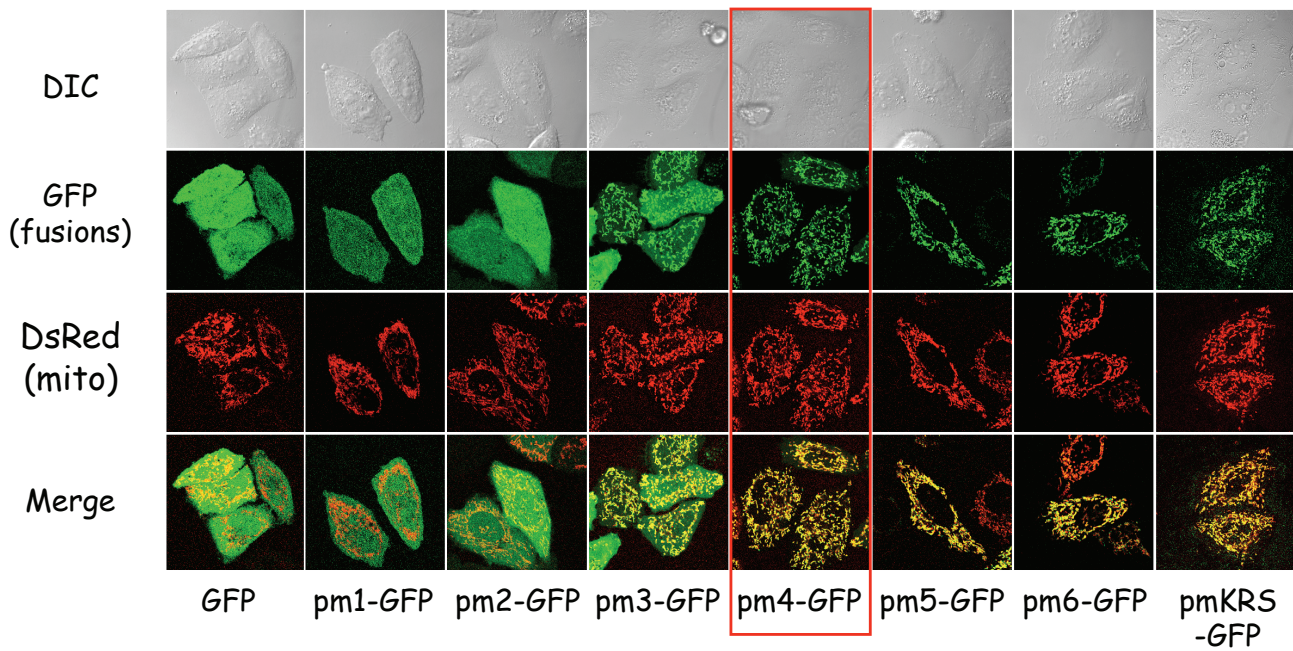


Fig. 2



```

pmKRS (625) MLTQAAVRLVRGSLRKTSWAEWGHRELRLGQLAPFTAPHKDKSFSDQRSELKRRLKAEKKVAEKEAKQKELSEKQLSQATAAA...
pm1 (8) MLTQAAVR
pm2 (16) MLTQAAVRLVRGSLRK
pm3 (27) MLTQAAVRLVRGSLRKTSWAEWGHREL
pm4 (38) MLTQAAVRLVRGSLRKTSWAEWGHRELRLGQLAPFTAP
pm5 (49) MLTQAAVRLVRGSLRKTSWAEWGHRELRLGQLAPFTAPHKDKSFSDQRS
pm6 (83) MLTQAAVRLVRGSLRKTSWAEWGHRELRLGQLAPFTAPHKDKSFSDQRSELKRRLKAEKKVAEKEAKQKELSEKQLSQATAAA

```

Fig. 3

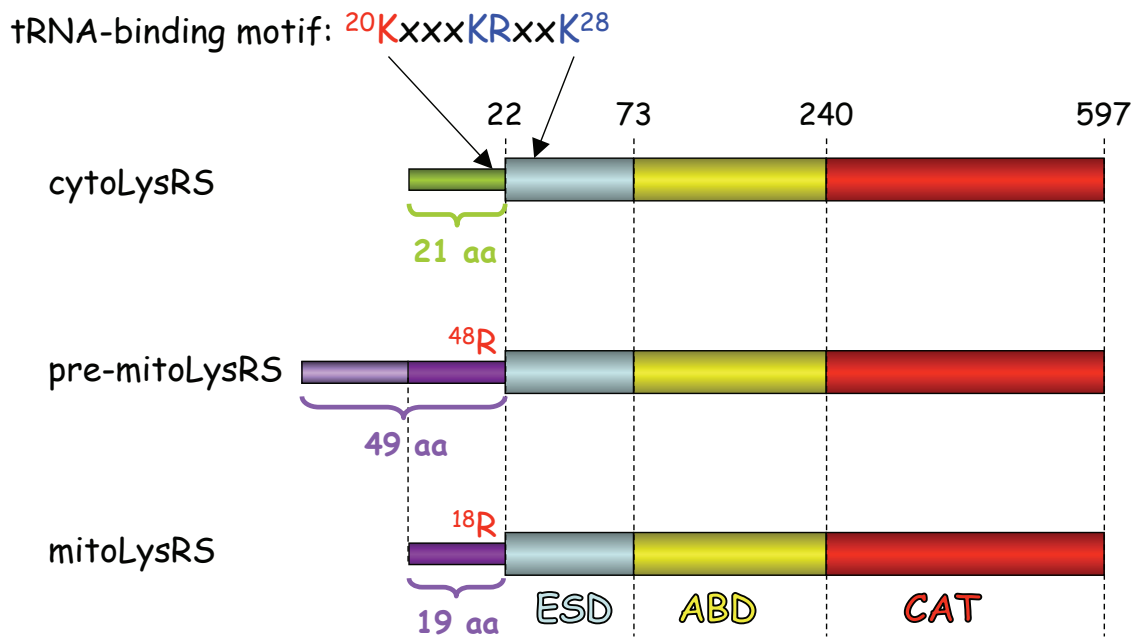


Fig. 4

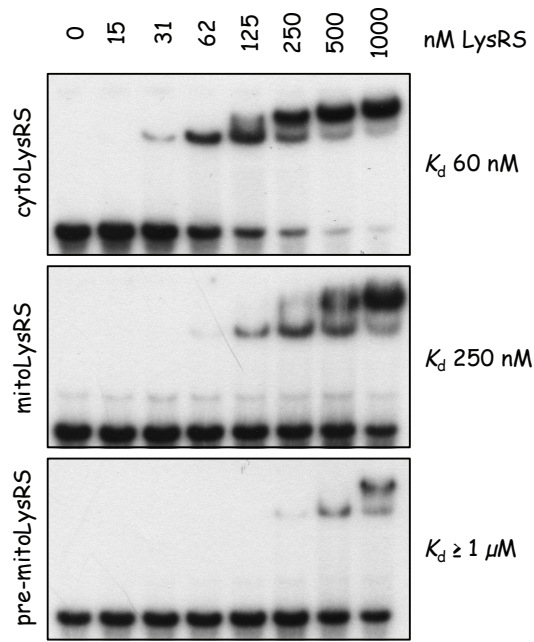


Fig. 5

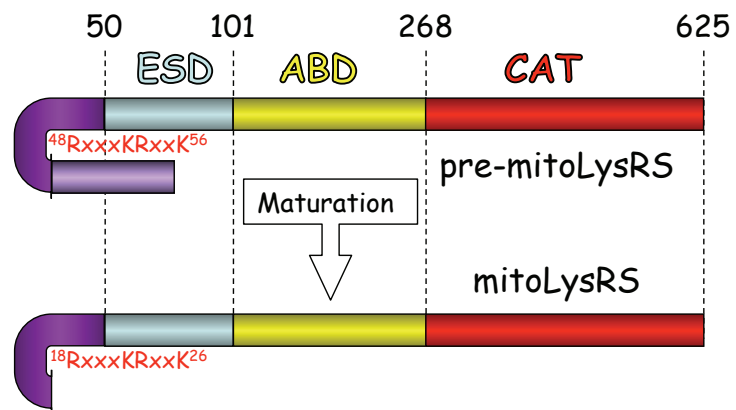


Fig. 6

CHAPITRE III

**Analyse du rôle potentiel des protéines auxiliaires
du VIH-1 dans l'association entre la lysyl-ARNt synthétase
et GagPol**

CHAPITRE III/ ANALYSE DU ROLE POTENTIEL DES PROTEINES AUXILIAIRES DU VIH-1 DANS L'ASSOCIATION ENTRE LA LYSYL-ARNt SYNTHETASE ET GagPol

Nous avons mis en évidence que le complexe d'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys} met en jeu la LysRS mitochondriale mature et la polyprotéine virale GagPol. GagPol permettrait la capture du complexe mLysRS-ARNt₃^{Lys} dans les particules naissantes du VIH-1.

Comme l'association entre LysRS et GagPol ne semble pas être spécifique *in vitro* de la seule forme mitochondriale mature de LysRS, mLysRS, nous nous sommes demandés si une autre des protéines virales pouvait être impliquée dans la formation d'un complexe sélectif. Comme cité dans l'introduction de ce manuscrit, les protéines accessoires et la polyprotéine Env du VIH-1 remplissent des rôles multiples tout au long du cycle répliatif, la plupart d'entre eux ayant été identifiés. Aucune interaction entre ces protéines virales et la LysRS humaine n'a été observée à ce jour, sauf pour Vpr, qui a été décrite comme pouvant interagir avec la LysRS et inhiber son activité catalytique (Stark & Hay, 1998). Toutefois, l'effet de Vpr sur l'activité de la LysRS a été remis en cause dans une autre étude (Kaminska *et al*, 2007a). Au cours de notre étude, nous avons voulu savoir si ces protéines pouvaient à un certain moment rejoindre le complexe d'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys} en interagissant avec la mLysRS au sein du complexe d'encapsidation GagPol:mLysRS:ARNt₃^{Lys}. Pour cela, nous avons d'abord recherché des interactions binaires entre la LysRS et l'ensemble des protéines auxiliaires (Vif, Vpu, Tat, Rev, Vpr et Nef) ainsi que Env. Par la suite, nous avons reconstitué *in vitro* le complexe d'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys} avec ces différents partenaires. Ces résultats nous ont permis de définir quelles sont les protéines virales impliquées dans ce processus, et suggèrent que Vpr et Rev puissent être régulées par l'action de la LysRS.

I. Etude des interactions binaires entre les protéines auxiliaires du VIH-1 et la lysyl-ARNt synthétase humaine et ses domaines.

La mise en évidence d'interactions protéine-protéine par le test du double hybride implique que les protéines virales d'intérêt soient localisées dans le compartiment nucléaire.

A. L'approche du double Hybride

1. Vérification de la localisation nucléaire des différentes protéines virales

L'entrée des protéines de fusion formées des protéines auxiliaires et de Env dans le noyau n'avait pas été étudiée au laboratoire auparavant, contrairement à Pol, Gag et les LysRS. Nous avons donc vérifié que les protéines virales fusionnées au domaine LexA dans le plasmide pEG202 étaient bien localisées en partie dans le noyau avant de commencer les tests du double hybride, car ce test est basé sur l'activation de la transcription d'un gène rapporteur suite à l'interaction des deux protéines d'intérêt.

Le principe du test de localisation nucléaire mis au point par Brent et al (Gyuris *et al*, 1993) consiste en la répression de l'expression du gène *lacZ* placé sous le contrôle du promoteur GAL1 (Figure 46). Un opérateur LexA (LexAop) est aussi inséré dans la région promotrice. La fixation d'une protéine contenant un domaine LexA sur l'opérateur LexAop conduit à la répression de la transcription du gène *lacZ*, et donc à une réduction de la synthèse de β -galactosidase. Le test est réalisé dans la souche de levure EGY48 après introduction du plasmide pJK101 portant le gène *lacZ*. Si la protéine fusionnée à LexA réussit à traverser l'enveloppe nucléaire, elle pourra se fixer sur l'opérateur LexAop et la transcription du gène *lacZ* sera réprimée. Le taux de répression est mesuré par l'activité β -galactosidase. Pour estimer ce taux de répression, nous avons utilisé deux plasmides témoins. Le plasmide pRS313 qui n'exprime pas LexA conduit à une activité β -galactosidase maximale; cette valeur sera attribuée aux protéines qui ne vont pas dans le noyau. Le pEG202 exprime fortement le domaine LexA seul. La teneur en LexA dans le noyau étant importante, l'activité β -galactosidase mesurée sera minimale, c'est le témoin des protéines qui vont dans le noyau et répriment l'expression du gène *lacZ*.

L'activité β -galactosidase mesurée dans les souches exprimant les différentes protéines virales a montré que Vpr, Vif, Vpu, Tat, Rev et Env fusionnées à LexA conduisent à la répression de l'expression de *lacZ*. Elles sont donc au moins en partie localisées dans le noyau. La valeur obtenue pour Nef est supérieure à celle obtenue en absence de LexA (transformation par pRS313). Le domaine LexA de Nef n'inhibe donc pas la transcription de *lacZ*. Comme observé ci-dessous dans le test du double hybride, Nef se comporte comme un activateur de la transcription.

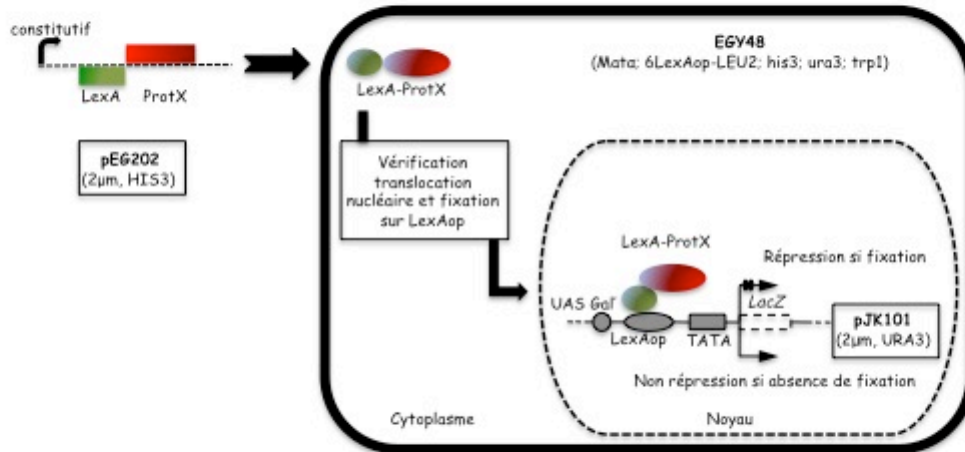


Figure 46. Schéma récapitulatif du principe du test de localisation nucléaire: S'il y a fixation de la protéine de fusion LexA, il y a répression du gène *lacZ* et la synthèse de la β -galactosidase est inhibée. En absence de LexA-ProtX dans le noyau, il n'y a pas de répression et la synthèse de la β -galactosidase est minimale.

2. Recherche des interactions par le double hybride

Nous avons commencé par l'étude des interactions des protéines auxiliaires et de Env avec les trois formes de LysRS. La coexpression de la LysRS (cLysRS, mLysRS ou pmLysRS) fusionnée au domaine activateur B42, avec les protéines Vif, Vpu et Env fusionnées à LexA, ne conduit pas à l'expression du gène LEU2, suggérant que ces protéines n'interagissent pas avec la LysRS. Nous avons observé que l'expression des protéines Tat, Env, Rev et Vpr avec la LysRS s'accompagne de l'expression de LEU2, suggérant que ces quatre protéines virales interagissent avec la LysRS. Dans le cas de Nef, la croissance des levures, et donc l'expression de LEU2, était également observée dans un milieu sans galactose, condition dans laquelle les LysRS ne sont pas exprimées. Nef a lui seul permet donc l'initiation de la transcription du gène *LEU2* en agissant comme un activateur de la transcription (également observé dans les expériences de localisation nucléaire). Nous n'avons donc pas pu conclure pour l'interaction de Nef aux LysRS par cette approche.

La deuxième étape a été de rechercher les domaines des LysRS qui pourraient interagir avec ces protéines virales. Nous avons trouvé que les protéines Tat, Rev, et Vpr interagissaient avec le domaine catalytique des LysRS.

B. L'immunoprécipitation

Nous avons utilisé l'immunoprécipitation comme deuxième approche pour confirmer nos résultats du double hybride. Nous avons testé l'interaction des protéines Tat, Rev, et Vpr avec la forme mitochondriale mature, mLysRS, exprimée dans les cellules d'insectes. L'association entre Nef et mLysRS a également été testée par cette approche.

Par immunoprécipitation, les interactions des protéines Rev et Vpr avec la mLysRS ont été confirmées. Tat et Nef ne montrent pas d'interaction significative avec la mLysRS.

C. Conclusion

Les expériences de double hybride et d'immunoprécipitation ont dévoilé une interaction spécifique des protéines accessoires Rev et Vpr avec la mLysRS et plus précisément avec le domaine catalytique de cette dernière. Par contre, ces expériences ne montraient pas si ces interactions de la mLysRS avec Rev et Vpr se faisaient en même temps que son interaction avec GagPol dans le complexe d'encapsidation. Pour déterminer si ces deux protéines virales pouvaient être des partenaires de la mLysRS au sein du complexe d'encapsidation, nous avons procédé à la reconstitution du complexe d'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys}.

II. Reconstitution *in vitro* du complexe d'encapsidation de l'ARNt

Le complexe d'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys} a été reconstitué au laboratoire *in vitro* pour vérifier si il pouvait aussi contenir les protéines Rev et Vpr, ces dernières ayant la capacité d'interagir avec la mLysRS. Nous avons reconstitué le complexe minimum (Pol:mLysRS) puis nous avons rajouté l'ARNt₃^{Lys} pour voir si il pouvait renforcer l'interaction entre mLysRS et Pol. Nous avons enfin rajouter Rev et Vpr pour analyser leur impact potentiel sur la formation du complexe d'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys}.

A. Expression des protéines

L'ensemble des protéines utilisées au cours de cette étude ont été produites dans des cellules d'insecte. Les séquences virales ont été introduites dans le plasmide pFastBac1 par un clonage SLIC. Les protéines virales GagPol et Pol utilisées dans cette étude présentent une étiquette de six histidines à l'extrémité C-terminale qui permet de les sélectionner sur la résine NiNTA. La formation des bacmides recombinants a été réalisée par transposition des séquences des pFastBac recombinants dans EMBacY. Les bacmides recombinants ont servi à

transférer des cellules d'insecte Sf21. Les baculovirus ainsi obtenus ont été utilisés pour infecter des cellules d'insecte High Five pour produire les protéines recombinantes.

B. Vérification de l'interaction entre Pol et mLysRS

Avant de procéder à la reconstitution du complexe d'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys}, nous avons d'abord voulu vérifier que l'approche envisagée permet de reproduire l'interaction entre Pol et mLysRS. Comme GagPol était moins fortement exprimé que Pol et plus sensible à la dégradation protéolytique, nous avons utilisé Pol dans les études décrites ci-dessous. Pour cela, des extraits bruts de cellules exprimant l'une ou l'autre de ces deux protéines ont été mélangés, puis la protéine Pol a été sélectionnée sur colonne NiNTA. Pol est la seule protéine étiquetée histidine en C-terminal. L'analyse des éluats par western blot montre que la mLysRS est co-purifiée avec Pol-H6 sur résine NiNTA.

C. Implication de l'ARNt₃^{Lys} sur la formation du complexe Pol-mLysRS

Le complexe d'encapsidation a pour rôle l'acheminement de l'ARNt₃^{Lys} au sein des particules virales. Par conséquent, nous nous sommes demandés si la présence de l'ARNt₃^{Lys} avait une incidence sur la formation du complexe entre mLysRS et Pol-H6.

L'ARNt₃^{Lys} a été ajouté aux extraits bruts en concentration saturante par rapport à la mLysRS afin que tous les complexes formés avec Pol-H6 contiennent l'ARNt₃^{Lys}. La protéine Pol a ensuite été sélectionnée sur colonne NiNTA.

Nous avons observé que la quantité de mLysRS co-purifiée avec Pol-H6 ne varie pas selon que l'on ajoute ou non l'ARNt₃^{Lys}. Ce dernier n'a donc pas d'effet sur l'interaction entre Pol-H6 et mLysRS donc sur la formation du complexe d'encapsidation.

D. Implication de Rev et Vpr dans la formation du complexe d'encapsidation de GagPol:mLysRS:ARNt₃^{Lys}

Le complexe d'encapsidation GagPol:mLysRS:ARNt₃^{Lys} implique l'interaction entre les domaines TF et IN de Pol et le domaine catalytique de mLysRS. Il a également été mis en évidence une interaction Rev:mLysRS et Vpr:mLysRS. Nous nous sommes alors demandés si ces interactions intervenaient dans le complexe d'encapsidation GagPol:mLysRS:ARNt₃^{Lys}.

La possible intervention de Rev et Vpr dans le complexe d'encapsidation GagPol:mLysRS:ARNt₃^{Lys} a été analysée en reconstituant le complexe Pol:mLysRS en présence des protéines Vpr ou Rev. Des extraits cellulaires issus de cellules d'insecte infectées par des baculovirus exprimant Pol, mLysRS, mais aussi Rev, Vpr, ont été mélangés avant d'être sélectionnés sur résine NiNTA.

Nous avons observé que Vpr et Rev n'interagissent pas avec Pol, ni avec la LysRS dans le complexe Pol:mLysRS. D'autre part, la présence de Vpr ou Rev n'influe pas sur la quantité de mLysRS associée à Pol dans l'éluat de la NiNTA. Ces protéines ne renforcent donc pas l'association entre Pol et mLysRS, mais n'induisent pas non plus la dissociation de la pince moléculaire formée par TF et IN. Par conséquent, les interactions Rev:mLysRS et Vpr:mLysRS ne semblent pas devoir être impliquées lors de l'assemblage du complexe d'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys}.

III. Conclusion générale

Le complexe d'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys} a été reconstitué. Les différentes protéines impliquées dans son assemblage ont été identifiées. GagPol et la mLysRS semblent être les deux seuls partenaires requis pour l'assemblage de ce complexe. L'absence d'implication des protéines Rev et Vpr dans la formation de ce complexe a été mise en évidence, et permet de supposer que la LysRS puisse être impliquée dans la régulation des fonctions de ces deux protéines au cours de cycle viral, mais à une étape distincte de l'assemblage du complexe d'encapsidation.

ARTICLE 3

Interaction of HIV-1 Rev and Vpr with mitochondrial lysyl-tRNA synthetase does not impact its association with Pol

Lydia KOBBI, Aurélien NAIL, Martine COMISSO and
Marc MIRANDE

Soumis

Interaction of HIV-1 Rev and Vpr with mitochondrial lysyl-tRNA synthetase does not impact its association with Pol

Running title: Association of Rev and Vpr with mitochondrial LysRS

Lydia Kobbi, Aurélien Nail, Martine Comisso, and Marc Mirande*

*Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, Centre de Recherche de Gif, CNRS,
1 Avenue de la Terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette, France.*

*Corresponding author.

email: Marc.Mirande@lebs.cnrs-gif.fr

phone: + 33 1 69 82 35 05

fax: + 33 1 69 82 31 29

ABSTRACT:

Packaging of tRNA₃^{Lys} into HIV-1 viral particles is an essential step to produce infectious virions with the capacity to initiate reverse transcription of their RNA genome. The mature form of human mitochondrial lysyl-tRNA synthetase (mLysRS) is taken up in viral particles along with tRNA₃^{Lys}. The transframe and integrase domains or the Pol region of the GagPol polyprotein precursor form molecular tweezers that interact with the catalytic domain of mLysRS to build the GagPol:mLysRS:tRNA₃^{Lys} packaging complex. In this work we searched for the possible association of one of the seven other viral proteins, Env, Vif, Vpr, Tat, Rev, Vpu and Nef of HIV-1, with mLysRS, and analyzed the significance of these interactions in the context of the formation of a specific packaging complex. Our data show that Vpr and Rev are able to interact with mLysRS, but that this association does not take place at the level of the assembly of the GagPol:mLysRS:tRNA₃^{Lys} packaging complex.

Keywords : HIV-1; tRNA₃^{Lys}; lysyl-tRNA synthetase; packaging complex

Introduction

An essential process in the viral life cycle of HIV-1, the human immunodeficiency virus type 1, is the conversion of its retroviral genomic RNA (vRNA) into proviral DNA. One of the crucial step of this mechanism is the packaging of tRNA₃^{Lys} from the host cell, a molecule that serves as a primer for initiation of reverse transcription (Abbink & Berkhout, 2008). Even though formation of a specific vRNA/tRNA₃^{Lys} complex primarily involves annealing of the 3'-terminal 18 nucleotides of tRNA₃^{Lys} to the complementary sequence located in the 5'-untranslated region of vRNA corresponding to the primer binding site (PBS), the complete process of initiation and transition to elongation requires a more complex pattern of interactions (Isel *et al*, 2010). Because initiation of reverse transcription starts soon after budding of new viral particles, packaging of tRNA₃^{Lys} during viral assembly is essential to produce effective virions (Gabor *et al*, 2002).

Lysyl-tRNA synthetase (LysRS) from infected cells, the enzyme that aminoacylates tRNA₃^{Lys} to give the aminoacyl-tRNA used for protein synthesis, is also packaged into HIV-1 particles (Cen *et al*, 2001). Human LysRS possesses a 73 amino acid residue N-terminal polypeptide extension that contributes a potent tRNA-binding domain (Francin *et al*, 2002; Francin & Mirande, 2003) required for efficient tRNA packaging (Cen *et al*, 2004). Although it has long been believed that cytosolic LysRS was involved in this process (Cen *et al*, 2001), the actual source of LysRS present in the virions is the mitochondrial enzyme (Kaminska *et al*, 2007b). Maturation of pmLysRS, the precursor of mitochondrial LysRS (mLysRS), after cleavage of its mitochondria-targeting sequence between Gly³⁰ and Gln³¹ upon translocation into mitochondria, generates an active enzyme with potent tRNA-binding properties (Dias *et al*, 2011). The transframe (TF or p6*) and integrase (IN) subunits or the Pol domain of the GagPol polyprotein precursor form molecular tweezers that interact with the catalytic domain of mLysRS to build the GagPol:mLysRS:tRNA₃^{Lys} packaging complex (Kobbi *et al*, 2011).

Whereas cLysRS, pmLysRS and mLysRS, which are produced by alternative splicing

of exon 2 of the KARS gene (Tolkunova *et al*, 2000), share the same catalytic domain, and have the intrinsic capacity to bind Pol (Kobbi *et al*, 2011), only the mLysRS species is recovered within the virions (Dias *et al*, 2011; Kaminska *et al*, 2007b). This suggests that the three LysRS species are strictly routed *in cellulo*, which prevents the interaction of cLysRS and pmLysRS with GagPol in HIV-1 infected cells (Kobbi *et al*, 2011). Alternatively, another yet unidentified viral protein could be involved in the assembly of a specific packaging complex. To explore this possibility, we analyzed the capacity of the Env polyprotein precursor, and of the auxiliary proteins Vif, Vpr, Tat, Rev, Vpu and Nef of HIV-1 to interact with LysRS, and to participate in the assembly of the GagPol:mLysRS:tRNA₃^{Lys} packaging complex.

Materials and Methods

Yeast two-hybrid analysis.

The yeast two-hybrid system developed by Brent et al. was used (Gyuris *et al*, 1993). The Vif, Tat, Rev, Vpu and Env coding regions from pNL4-3 were introduced between the *EcoRI* and *XhoI* sites of pEG202. The Vpr and Nef coding regions were introduced between the *BamHI* and *XhoI* sites, or *EcoRI* and *NcoI* sites of pEG202, respectively. The LexA DNA-binding domain-fused proteins in pEG202 are expressed under the control of a constitutive promoter. To test whether the LexA:pVIH-1 fusion proteins are able to enter the nucleus and bind LexA operators, the repression assay with the pJK101 reporter was used (Gyuris *et al*, 1993). The cDNAs encoding the human cytoplasmic, premitochondrial and mitochondrial forms of LysRS, the catalytic (CAT, from Asp238 to Val597), anticodon-binding (ABD, from Val71 to Asn237), or eukaryotic-specific (cESD, mESD, pmESD, from their respective N-terminus to Ser70) domains of LysRS introduced between the *EcoRI* and *XhoI* sites of pJG4-5 have been described (Kobbi *et al*, 2011). The B42 activation domain-fused proteins in pJG4-5 also carry an hemagglutinin epitope tag, and are expressed under the control of a galactose-inducible promoter.

The yeast strain EGY48 (*Mat α his3 leu2::3LexAop-LEU2 ura3 trp1*) which contains a chromosomal *LEU2* gene placed under the control of LexA operators was transformed to his⁺ with pEG202-derivatives and to trp⁺ with pJG4-5 derivatives. At least four independent colonies were analyzed for their ability to grow in the absence of leucine (expression of *Lexop-LEU2*). A pair of interactive proteins was scored as positive when transformants did not grow on glucose medium lacking leucine (no expression of B42-fusions) but grew on galactose medium lacking leucine (expression of B42-fusions that interacted with LexA-fusions).

Immunoprecipitation.

The Rev, Vpr, Tat and Nef coding sequences from pNL4-3 were inserted into the *Bgl/II* site of pRS315-PGK (*CEN/ARS, LEU2* (Golinelli-Cohen *et al*, 2004)). FLAG-tagged proteins were expressed with an N-terminal MGDYKDDDDKPW sequence corresponding

the FLAG epitope (underlined). Plasmids pRS315-PGK-FLAG or pRS315-PGK-FLAG-(Rev, Vpr, Tat, or Nef) were used to transform yeast W303-1B α strain (*leu2*, *his3*, *trp1*, *ura3*, *ade2*). Cells were grown at 28°C in 1 liter of minimal YNB medium (0.7% yeast nitrogen base without amino acid, 2% glucose) supplemented with uracil, adenine, histidine and tryptophan, to an A_{600} of 1. Cells were washed, resuspended in 5 ml of ice-cold extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) and lysed at 2100 bar in a "One Shot" cell disrupter (Constant Systems Ltd) in the presence of 1 mM benzamidine and 1 mM PMSF. Extracts were clarified by centrifugation at 12,000 *g* for 15 min at 4°C, followed by a 40 min centrifugation step at 160,000 *g*, at 4°C. The supernatant was incubated 2 hours, at 4°C, after addition of 120 μ l of a 1:1 slurry of ANTI-FLAG M2 affinity gel (Sigma). The matrix was extensively washed and resuspended in NETN50 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 % NP40). Anti-FLAG agarose incubated with an extract of yeast transformed with pRS315-PGK-FLAG-Pol is denoted FLAG-Pol matrix, or FLAG matrix when incubated with the control extract of yeast transformed with pRS315-PGK-FLAG. Before incubation with purified proteins, a fraction of the matrix was treated with SDS and analyzed by Western blotting with anti-FLAG antibodies to assess that similar amounts of the different FLAG-proteins were bound to the matrix.

Purified mLysRS expressed in insect cells and purified as described (Dias *et al*, 2011) was incubated (0.1 ml at 2 μ M) with 30 μ l of FLAG or FLAG-(Rev, Vpr, Tat, or Nef) matrix in NETN50 containing BSA at 10 μ g/ml. The mixture was incubated 1 hour at 4°C with constant shaking. After centrifugation 1 min at 4°C (13,000 \times *g*), agarose beads were washed twice with 200 μ l NETN50, once with 200 μ l NETN250 (NETN50 containing 250 mM NaCl), and twice with 200 μ l NETN50. Beads were resuspended in 36 μ l NETN50 and specific elution from ANTI-FLAG M2 affinity gel was performed after addition of 4 μ l of FLAG peptide (Sigma) at 5 mg/ml. After incubation for 30 min at 4°C, the supernatant was recovered by centrifugation. Fractions were analyzed by Western blotting.

Reconstitution of protein complexes

The Pol, IN, Rev and Vpr coding regions from pNL4-3 and mLysRS sequences were introduced between the *EcoRI* and *XhoI* sites of pFastBac1. The Pol and IN sequences contain a His⁶ tag at the C-terminus. Recombinant plasmids were integrated at the Tn7 transposition site of EMBaCY (gift from Imre Berger, EMBL, Grenoble) to give the recombinant bacmids (Trowitzsch *et al*, 2010). Initial baculoviruses were obtained after transfection of adhesive Sf21 cells grown in Grace medium supplemented with 10% FCS. Baculovirus amplification was performed by infection of Sf21 cells grown in suspension in SF-900 II medium (Invitrogen). To express recombinant proteins, baculoviruses were used to infect High Five cells grown in suspension in Express Five SFM medium (Invitrogen). After 48-56 h of culture at 27°C, cells were harvested by centrifugation, washed with ice-cold PBS, and the cell pellet was stored at -80°C. Cells were lysed by addition of 1 vol. of ice-cold extraction buffer (20 mM K-phosphate pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM imidazole, 5% glycerol, 5 mM 2-mercaptoethanol, 1% Triton X-100) in the presence of 1 mM Pefabloc, 10 mM benzamidine and 10 mM PMSF. Extracts were clarified by centrifugation at 12,000 *g* for 15 min at 4°C. The cell extracts containing different recombinant proteins were mixed as described, incubated 1h at 4°C. After addition of 1 vol. of buffer A-NiNTA (20 mM K-phosphate pH 7.5, 500 mM NaCl, 50 mM imidazole, 5% glycerol, 5 mM 2-mercaptoethanol), the mixture was incubated with 20 µl of a 1:1 slurry of Ni-NTA Superflow (Qiagen), during 1h at 4°C. Beads were washed with 4 x 1 ml of buffer A-NiNTA, and elution was performed by adding 2 x 200 µl of buffer B-NiNTA (20 mM K-phosphate pH 7.5, 500 mM NaCl, 400 mM imidazole, 5% glycerol, 5 mM 2-mercaptoethanol). Eluted proteins were analyzed by western blotting. Where indicated, tRNA₃^{Lys} was added during incubation of cell extracts. Human tRNA₃^{Lys} was produced in *E. coli* JM101Tr transformed with plasmid pBSTK3 (Tisné *et al*, 2000) and purified as described (Meinzel *et al*, 1992).

Antibodies and Western blot analysis.

Monoclonal antibodies directed to the hemagglutinin epitope were from BAbCo. Polyclonal antibodies to LexA were a gift of Patrice Moreau (Laboratoire de Chimie

Bactérienne, Marseille). Polyclonal anti- Δ NLysRS antibodies have been described previously (Mirande *et al*, 1982). Monoclonal anti-IN and anti-Rev antibodies were from Abcam. Polyclonal anti-Vpr antibodies were a gift from Uwe Tessmer (Heinrich-Pette-Institute, Hamburg, Germany). Western blot analyses were conducted with goat anti-rabbit or goat anti-mouse secondary antibodies conjugated with peroxidase (Chemicon) and the SuperSignal West Pico chemiluminescent substrates (Pierce).

Results

Search for viral proteins interacting with lysyl-tRNA synthetase

LysRS interacts with the TF and IN domains of the Pol region of GagPol to form the tRNA^{Lys} packaging complex (Kobbi *et al*, 2011). We investigated the putative role of the other HIV-1 viral proteins in establishing a specific tRNA packaging complex. Among the putative candidates were the Env polyprotein precursor, gp160, specifying the surface (SU, gp120) and transmembrane (TM, gp41) glycoproteins, as well as the auxiliary proteins Vif, Vpr, Tat, Rev, Vpu and Nef (Fig. 1). Association of LysRS with these viral proteins was first screened by the yeast two-hybrid method. The viral sequences were expressed fused with the LexA DNA-binding domain, and fusion proteins of the expected sizes were detected by western blot (Fig. 1C). To ascertain that the encoded proteins were translocated into the yeast nucleus, we used the repression assay developed by Brent *et al*. (Gyuris *et al*, 1993). A lacZ reporter gene is placed under the control of a GAL1 promoter that also contains a LexA operator. When LexA or a LexA-fusion protein binds LexA operator, expression of lacZ is repressed, leading to a reduced synthesis of β -galactosidase. With the exception of LexA-Nef, all other fusion proteins repressed lacZ expression to different extents, exemplifying their nuclear localization (Table I). The cytoplasmic, mitochondrial and premitochondrial LysRS species, cLysRS, mLysRS and pmLysRS, were expressed in yeast fused with the B42 transcription activation domain. These constructs also contain a nuclear localization signal and an HA11 hemagglutinin epitope that allows identification of the fusion proteins expressed in yeast (Fig. 1C).

Expression LexA-Tat, LexA-Rev, LexA-Vpr or LexA-Nef with B42-cLysRS, B42-mLysRS or B42-pmLysRS allowed yeast EGY48 to grow in the presence of galactose, but in the absence of leucine, suggesting that all these protein pairs are able to associate through protein:protein interactions (Fig. 1B). However, expression of LexA-Nef alone on a glucose medium where LysRS are not expressed, proved to be sufficient to activate the LEU2 gene (Fig. 1B). Thus, LexA-Nef by itself activates transcription, which is consistent with the results of the repression assay (Table I), showing that the level of β -

galactosidase expressed in the presence of LexA-Nef was higher than the level observed with pRS313, when no repression occurs. Expression of Vif, Vpu or Env with any of the three forms of LysRS did not lead to expression of LEU2.

Identification of the protein domain of LysRS involved in its interaction with viral proteins.

Because Tat, Rev, and Vpr were scored positive by the yeast two-hybrid test with any of the three forms of LysRS, this suggested that a domain common to all LysRS species was involved in their association.

The structural domains of LysRS (Fig. 2A) were independently expressed fused to B42 (Fig. 2B). This includes the C-terminal catalytic domain of LysRS (CAT), its tRNA anticodon-binding domain (ABD), and its N-terminal eukaryote-specific sequences (ESD) that promotes the formation of a stable complex between tRNA^{Lys} and LysRS in humans (Francin *et al*, 2002). The cESD, mESD and pmESD domains also contain the cytoplasmic-, mitochondrial- and premitochondrial-specific sequences, respectively. Expression of CAT, but of none of the other cESD, mESD, pmESD, or ABD domains, with Tat, Rev or Vpr, revealed a protein-protein interaction (Fig. 2A). No interaction was detected with Vif, Vpu or Env. As observed above, expression of Nef leads to the constitutive expression of the LEU2 gene.

Assessing protein:protein interactions by immunoprecipitation.

To validate interactions of Tat, Rev and Vpr with LysRS, as suggested by the two-hybrid assays, and to test for the interaction of Nef with LysRS that could not be appraised by the yeast two-hybrid approach, association of mLysRS with any of these four proteins was controlled by immunoprecipitation of LysRS with FLAG-tagged viral proteins produced in yeast.

The viral proteins were expressed in yeast with a FLAG-tag appended to their N-terminus, and purified by adsorption on an anti-FLAG agarose. The resulting FLAG-

proteins bound to the anti-FLAG agarose, or an aliquot of anti-FLAG agarose saturated with FLAG peptide, were incubated in the presence of purified mLysRS (Fig. 3). After washing of agarose beads, specific elution of interacting proteins was accomplished by adding an excess of FLAG peptide that released FLAG-proteins from the agarose matrix by competition. FLAG-Rev and FLAG-Vpr specifically adsorbed mLysRS, but only trace amounts of mLysRS were recovered from FLAG-Tat and FLAG-Nef (Fig. 3). Thus, only Rev and Vpr were selected as possible protein partners of mLysRS.

Reconstitution of the tRNA^{Lys} packaging complex

To assemble and isolate the tRNA^{Lys} packaging complex, containing GagPol, mLysRS and tRNA^{Lys}, the GagPol protein precursor, or the Pol polyprotein only, and mLysRS were expressed in insect cells. The baculovirus expression system allows expression or coexpression of proteins in a eukaryotic expression system closely mimicking the expression machinery of a human cell. The level of expression of GagPol was low, and the polyprotein was rapidly degraded by cellular proteases into individual components. Thus, we chose to associate mLysRS with Pol (Fig. 4). Pol was expressed with a C-terminal His-tag allowing its recovery on a NiNTA column. An extract of insect cells expressing Pol was mixed with an extract of insect cells expressing mLysRS in excess as compared to Pol, and incubated before recovery of Pol on a NiNTA matrix. As observed Fig. 4, mLysRS was recovered with Pol, showing that the Pol:mLysRS complex easily forms between the two proteins. When the two proteins were coexpressed in insect cells after coinfection with the two baculovirus species, the Pol:mLysRS complex recovered on NiNTA matrix directly after cell lysis displayed the same Pol/mLysRS ratio (not shown).

To test whether presence of tRNA₃^{Lys} could interfere with the interaction between Pol and mLysRS within the Pol:mLysRS:tRNA₃^{Lys} complex, extracts of insect cells containing Pol or mLysRS were mixed in the absence of tRNA₃^{Lys} or in the presence of a 3-fold molar excess of tRNA₃^{Lys} as compared to mLysRS (Fig. 5). As observed after isolation of Pol on NiNTA matrix, the presence of tRNA did not interfere with the recovery

of mLysRS into the Pol:mLysRS complex.

Association of Rev and Vpr with Pol and mLysRS in the tRNA^{Lys} packaging complex

To test for the possible involvement of Rev and Vpr in the assembly of the GagPol:mLysRS:tRNA₃^{Lys} packaging complex, Vpr and Rev were expressed in the baculovirus expression system, and the effect of the addition of these two proteins on the recovery of mLysRS with Pol on NiNTA matrix was analyzed (Fig. 6). As a control, the integrase (IN) domain of Pol, corresponding to one of the two domains of Pol interacting with mLysRS (Kobbi *et al*, 2011), was also expressed in insect cells with a C-terminal His-tag.

The additional viral proteins IN, Vpr or Rev were incubated alone, with Pol, with mLysRS, or with Pol and mLysRS (Fig. 6A). The protein samples recovered on NiNTA matrix contained the His-tagged proteins Pol and IN, where applicable, but did not contain Vpr or Rev, showing that Vpr and Rev do not interact with Pol, or with mLysRS into the Pol:mLysRS complex (Fig. 6B). The amount of mLysRS recovered with Pol in the Pol:mLysRS complex was not affected by the presence of Vpr or Rev (Fig. 6C), showing that their presence did not impair association of mLysRS with Pol. By contrast, when IN was added in excess, more mLysRS was recovered from the NiNTA matrix (Fig. 6C), showing that IN in excess, carrying a His-tag, is also able to associate with mLysRS. Altogether, these data show that the functional significance of the interaction between mLysRS and Rev or Vpr is likely not to be involved in the assembly of the tRNA^{Lys} packaging complex.

Discussion

We previously showed that association of HIV-1 GagPol with the cellular protein mLysRS to form the GagPol:mLysRS:tRNA₃^{Lys} complex involves interaction of the TF and IN domains of the Pol region of GagPol with the catalytic domain of mLysRS (Kobbi *et al*, 2011). Because a single gene encodes the cytoplasmic and mitochondrial species of LysRS in human by means of alternative splicing (Tolkunova *et al*, 2000), the three cellular species of LysRS, cLysRS, pmLysRS, and mLysRS, share 576 amino acid residues, corresponding to the catalytic and anticodon-binding domains. Accordingly, association of GagPol to the catalytic domain of LysRS is not restricted, *in vitro*, to the mLysRS species (Kobbi *et al*, 2011). However, cLysRS, a member of the cytosolic multisynthetase complex MARS (Mirande, 2005), is never recovered into the virions (Kaminska *et al*, 2007b), suggesting that its interaction with the p38 scaffold protein of MARS and its routing to this complex prevents its interaction with GagPol in HIV-1 infected cells (Kobbi *et al*, 2011). In this study, we explored an alternative explanation. We analyzed the possibility that association of another viral protein to the GagPol:mLysRS complex could render association of GagPol with LysRS specific for only the mature, mitochondrial species. We found that LysRS is also able to interact with the Rev and Vpr proteins, and determined that this association also involves the catalytic domain of LysRS common to the three LysRS species. Association of cytoplasmic LysRS with Vpr was already described in another study (Stark & Hay, 1998). However, interaction of Rev and Vpr with mLysRS does not occur within the GagPol:mLysRS complex, suggesting that these interactions are not involved in the assembly of the GagPol:mLysRS:tRNA₃^{Lys} packaging complex. Therefore, cellular compartmentalization appears to be a key mechanism for the selective targeting of mLysRS to HIV-1 virions.

Viral protein R (Vpr), one of the regulatory/accessory proteins encoded by HIV-1 genome, is involved in several aspects of host-virus interactions (Zhao *et al*, 2007). One of the main cellular role of Vpr seems to be induction of cell cycle arrest in G2 following

HIV-1 infection. Vpr causes hyperphosphorylation of Cdc2, a cyclin-dependent kinase which regulates the cell cycle, through inhibition of the Cdc25 phosphatase and activation of the Wee1 kinase. A small fraction of Vpr is also phosphorylated on Ser⁷⁹ and is essential for nuclear import of the HIV-1 genomic DNA preintegration complex. An important role of Vpr in induction of apoptosis through permeabilization of the mitochondrial membrane has also been reported. Finally, association of Vpr with numerous cellular proteins was observed. It is therefore conceivable that association of Vpr with LysRS could regulate one or several of these processes. For instance, association of Vpr with mLysRS could be required to induce relocalization of mLysRS in the cytoplasm of HIV-1 infected cells, as previously observed following exposure of HeLa cells to endogenous Vpr (Kaminska *et al*, 2007a). The Vpr-assisted release of mLysRS from mitochondria would be a prerequisite for its association with tRNA₃^{Lys} and GagPol to form the packaging complex. Alternatively, binding of cLysRS to Vpr could be a regulatory mechanism that controls the other functions of Vpr, in cell cycle arrest or nuclear import.

Rev, the Regulator of Expression of Virion proteins, is an essential component of HIV involved in nuclear export of intron-containing viral RNAs (Felber *et al*, 2007). Rev is a nucleo-cytoplasmic shuttling protein containing four functional domains: a nuclear localization signal and a nuclear export signal for efficient trafficking, an RNA binding domain and an oligomerization domain involved in binding the Rev-responsive elements located on unspliced or partially unspliced mRNAs. In the absence of Rev, unspliced RNAs are not efficiently exported, and GagPol and Env are poorly expressed. Rev functions as a molecular switch for the translation of viral proteins from unspliced transcripts, and several cellular proteins were shown to regulate its activity. For instance, a component of the translation machinery, the eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A) has been shown to be essential for Rev-mediated viral RNA export (Hofmann *et al*, 2001). Whether cLysRS, mLysRS or pLysRS could also be involved in regulation of Rev functions is an intriguing possibility.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the "Centre National de la Recherche Scientifique" (CNRS), and the "Agence Nationale de Recherches sur le SIDA" (ANRS). L.K. is the recipient of a doctoral fellowship of "Ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche".

Legends to Figures

Fig. 1. Two-hybrid analysis of LysRS:pHIV-1 interaction. **(A)** The sequences for the polyprotein Env, and for proteins Vif, Vpr, Tat, Rev, Vpu and Nef are encoded on the three reading frames of the viral genome. The viral (pHIV-1) proteins were expressed fused to LexA in pEG202. The three LysRS species for the cytoplasmic (cLysRS), mitochondrial (mLysRS), and premitochondrial (pmLysRS) enzymes were expressed fused to the B42 transcription activator, under the control of a galactose-inducible promoter in pJG4-5. **(B)** The two-hybrid protein:protein interaction assay between pHIV-1, and cLysRS, mLysRS, or pmLysRS, was conducted in EGY48 strain. As a control, all the strains grew on a galactose medium in the presence of leucine (YNBG+L). When the strains were plated on a galactose medium in the absence of leucine (YNBG), a protein:protein interaction resulted in the expression of the LEU2 gene, as observed following coexpression of any of the three LysRS species with Nef, Vpr, Rev or Tat. If the expression of LEU2 requires interaction between LysRS and pHIV-1, then none grew in the absence of leucine on a glucose medium (YNB) where LysRS is not expressed. All the strains grew on YNB in the presence of leucine (not shown). **(C)** Expression and stability of the fusion proteins produced in yeast. Left: Western blot analysis of the fusion proteins expressed in yeast from the pJG4-5 plasmid. The cLysRS, mLysRS or pmLysRS species (80 kDa) were expressed fused to the B42 transcription activator and to the HA11 hemagglutinin epitope. Right: Western blot analysis of the fusion proteins expressed in yeast from the pEG202 plasmid. The Vif (45.3 kDa), Vpu (31.8 kDa), Tat (32.5 kDa), Rev (35.7 kDa), Vpr (34.4 kDa), Nef (46 kDa) and Env (119.7 kDa) proteins were expressed fused to the LexA DNA-binding domain.

Fig. 2. Two-hybrid analysis of the LysRS domains interacting with pHIV-1. **(A)** The cytoplasmic- (cESD), mitochondrial- (mESD), or premitochondrial- (pmESD) eukaryote-specific domains, the anticodon-binding domain (ABD), and the catalytic domain (CAT) of LysRS were expressed fused to the B42 transcription activator, under the control of a galactose-inducible promoter in pJG4-5. The two-hybrid protein:protein interaction assay

between the LysRS constructs and the pHIV-1 constructs expressed fused to LexA in pEG202, was conducted in EGY48 strain. Expression of the CAT domain alone was as efficient as the expression of the three full-length LysRS species to restore growth in the presence of Nef, Vpr, Rev, or Tat. No growth was observed on YNB plates, except for the strain expressing the Nef construct. These data also show that none of the HA-LysRS fusions activate transcription of the reporter gene in the absence of a suitable B42-fusion protein. For clarity, only the YNBGal selection plate is shown. **(B)** Expression of the fusion proteins in yeast was analyzed by Western blot. The cESD, mESD, pmESD (21 kDa), ABD (31.1 kDa) or CAT (53.1 kDa) domains of LysRS, were expressed fused to the B42 transcription activator and to the HA11 hemagglutinin epitope.

Fig. 3. Co-immunoprecipitation of mLysRS with HIV-1 proteins. Anti-FLAG agarose beads carrying FLAG peptide (FLAG) or the FLAG-Nef, FLAG-Tat, FLAG-Vpr or FLAG-Rev fusion proteins were incubated with the mitochondrial species of LysRS (Input). After removal of the unbound fraction, beads were washed and then incubated with FLAG peptide in excess, and the eluted fraction was recovered (FLAG elution). LysRS present in these fractions was analyzed by Western blotting with anti- Δ NLysRS antibodies. The 'Input' and 'Unbound' fractions were diluted 10x.

Fig. 4. Co-purification of mLysRS with Pol. The mLysRS species and Pol with a C-terminal His-Tag (Pol-H6) were expressed independently in insect cells, and extracts were mixed (Pol-H6 + mLysRS), and subjected to NiNTA purification. The fractions obtained before (Input) or after (Output) NiNTA purification were analyzed by Western blotting with anti-IN or anti-LysRS antibodies.

Fig. 5. Effect of $tRNA_3^{Lys}$ on the interaction of mLysRS with Pol. The mLysRS species and Pol with a C-terminal His-Tag (Pol-H6) were expressed independently in insect cells, and extracts were mixed (Pol-H6 + mLysRS), and subjected to NiNTA purification in the absence ($-tRNA_3^{Lys}$) or in the presence ($+tRNA_3^{Lys}$) of $tRNA_3^{Lys}$. The fractions obtained after (Output) NiNTA purification were analyzed by Western blotting with anti-LysRS

antibodies.

Fig. 6. Rev and Vpr do not copurify with the mLysRS:Pol complex. The mLysRS species, Pol or IN with a C-terminal His-Tag (Pol, IN), Vpr and Rev were expressed independently in insect cells. Extracts were mixed as indicated, and subjected to NiNTA purification. The fractions obtained before (**A**: Input) or after (**B**: Output) NiNTA purification were analyzed by Western blotting with anti-IN (for Pol and IN), anti-Vpr, anti-Rev, or (**C**) with anti-LysRS antibodies.

References

- Abbink TE, Berkhout B (2008) HIV-1 reverse transcription initiation: a potential target for novel antivirals? *Virus Res* 134: 4-18
- Cen S, Javanbakht H, Niu MJ, Kleiman L (2004) Ability of wild-type and mutant lysyl-tRNA synthetase to facilitate tRNA^{Lys} incorporation into human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 78: 1595-1601
- Cen S, Khorchid A, Javanbakht H, Gabor J, Stello T, Shiba K, Musier-Forsyth K, Kleiman L (2001) Incorporation of lysyl-tRNA synthetase into human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 75: 5043-5048
- Dias J, Octobre G, Kobbi L, Comisso M, Flisiak S, Mirande M (2011) Activation of human mitochondrial lysyl-tRNA synthetase requires maturation of its pre-mitochondrial precursor. Submitted.
- Felber BK, Zolotukhin AS, Pavlakis GN (2007) Posttranscriptional control of HIV-1 and other retroviruses and its practical applications. *Adv Pharmacol* 55: 161-197
- Francin M, Kaminska M, Kerjan P, Mirande M (2002) The N-terminal domain of mammalian lysyl-tRNA synthetase is a functional tRNA-binding domain. *J Biol Chem* 277: 1762-1769
- Francin M, Mirande M (2003) Functional dissection of the eukaryotic-specific tRNA-interacting factor of lysyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* 278: 1472-1479
- Gabor J, Cen S, Javanbakht H, Niu MJ, Kleiman L (2002) Effect of altering the tRNA₃^{Lys} concentration in human immunodeficiency virus type 1 upon its annealing to viral RNA, GagPol incorporation, and viral infectivity. *J Virol* 76: 9096-9102
- Golinelli-Cohen MP, Zakrzewska A, Mirande M (2004) Complementation of yeast Arc1p by the p43 component of the human multisynthetase complex does not require its association with yeast MetRS and GluRS. *J Mol Biol* 340: 15-27
- Gyuris J, Golemis E, Chertkov H, Brent R (1993) Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 75: 791-803
- Hofmann W, Reichart B, Ewald A, Muller E, Schmitt I, Stauber RH, Lottspeich F, Jockusch

- BM, Scheer U, Hauber J, Dabauvalle MC (2001) Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. *J Cell Biol* 152: 895-910
- Isel C, Ehresmann C, Marquet R (2010) Initiation of HIV Reverse Transcription. *Viruses* 2: 213-243
- Kaminska M, Francin M, Shalak V, Mirande M (2007a) Role of HIV-1 Vpr-induced apoptosis on the release of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase. *FEBS Lett* 581: 3105-3110
- Kaminska M, Shalak V, Francin M, Mirande M (2007b) Viral hijacking of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase. *J Virol* 81: 68-73
- Kobbi L, Octobre G, Dias J, Comisso M, Mirande M (2011) Association of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase with HIV-1 GagPol involves catalytic domain of the synthetase and transframe and integrase domains of Pol. *J Mol Biol* 410: 875-886
- Meinzel T, Mechulam Y, Fayat G, Blanquet S (1992) Involvement of the size and sequence of the anticodon loop in tRNA recognition by mammalian and *E.coli* methionyl-tRNA synthetases. *Nucl Acids Res* 20: 4741-4746
- Mirande M (2005) Multi-Aminoacyl-tRNA Synthetase Complexes. In *The Aminoacyl-tRNA Synthetases*, Ibba M, Francklyn C, Cusack S (eds), pp 298-308. Georgetown, Texas, USA: Landes Bioscience
- Mirande M, Cirakoglu B, Waller JP (1982) Macromolecular complexes from sheep and rabbit containing seven aminoacyl-tRNA synthetases. III. Assignment of aminoacyl-tRNA synthetase activities to the polypeptide components of the complexes. *J Biol Chem* 257: 11056-11063
- Stark LA, Hay RT (1998) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral protein R (Vpr) interacts with Lys-tRNA synthetase: Implications for priming of HIV-1 reverse transcription. *J Virol* 72: 3037-3044
- Tisné C, Rigourd M, Marquet R, Ehresmann C, Dardel F (2000) NMR and biochemical characterization of recombinant human tRNA₃^{Lys} expressed in *Escherichia coli*: Identification of posttranscriptional nucleotide modifications required for efficient

initiation of HIV-1 reverse transcription. *RNA* 6: 1403-1412

Tolkunova E, Park H, Xia J, King MP, Davidson E (2000) The human lysyl-tRNA synthetase gene encodes both the cytoplasmic and mitochondrial enzymes by means of an unusual alternative splicing of the primary transcript. *J Biol Chem* 275: 35063-35069

Trowitzsch S, Bieniossek C, Nie Y, Garzoni F, Berger I (2010) New baculovirus expression tools for recombinant protein complex production. *J Struct Biol* 172: 45-54

Zhao RY, Elder RT, Bukrinsky M (2007) Interactions of HIV-1 viral protein R with host cell proteins. *Adv Pharmacol* 55: 233-260

Table 1. β -galactosidase activity in the repression assay^a

Plasmid used	%
pRS313 ^b	100
pEG202 ^c	17
pEG202-Vif	79
pEG202-Vpu	67
pEG202-Tat	21
pEG202-Rev	23
pEG202-Vpr	21
pEG202-Nef	121
pEG202-Env	75

^aActivity is expressed as the percentage of activity in the given strain as compared to the activity determined in the control strain that does not express LexA (pRS313).

^bControl plasmid that does not express LexA.

^cControl plasmid that expresses wild-type LexA.

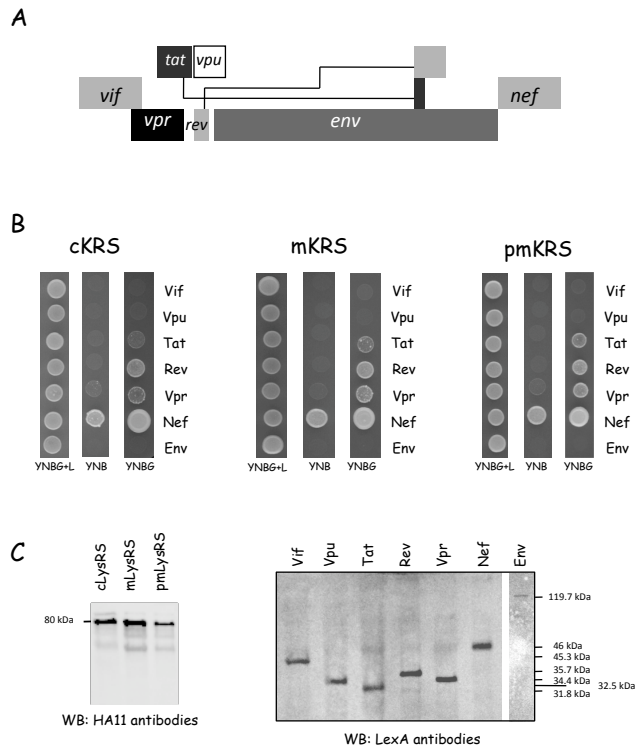


Fig. 1

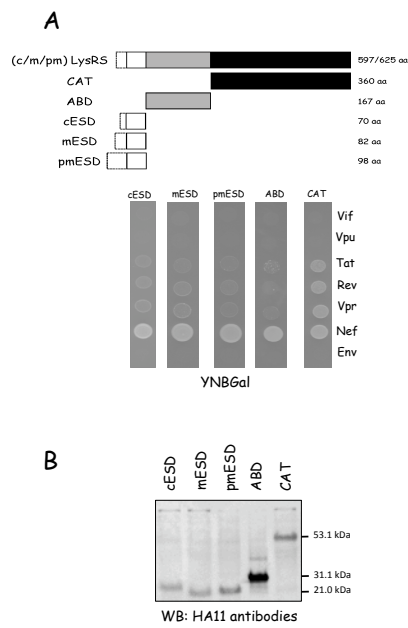


Fig. 2

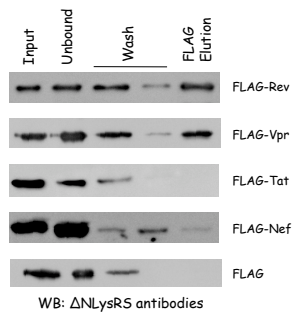


Fig. 3

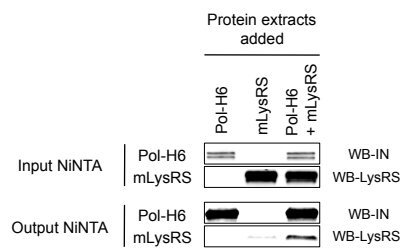


Fig. 4

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La transcription inverse du génome du VIH-1 est initiée par la transcriptase inverse au sein de la capsid virale. L'initiation de ce processus requiert un ARN amorce, l'ARNt₃^{Lys} (Wain-Hobson *et al*, 1985), dont la séquence 3'-terminale est complémentaire de la séquence PBS localisée près de l'extrémité 5' de l'ARN viral. Le rôle essentiel dévolu à l'ARNt₃^{Lys} au cours de l'initiation de la transcription inverse est maintenant bien décrit, les mécanismes moléculaires impliqués dans les étapes conduisant à son encapsidation étaient encore peu caractérisés. Des premières études ont démontré que l'ARNt₃^{Lys} qui est encapsidé au sein des particules virales est complexé à son partenaire cellulaire, la lysyl-ARNt synthétase humaine (LysRS) (Cen *et al*, 2001). La LysRS possède des partenaires cellulaires et viraux dans les cellules infectées par le VIH-1. La forme cytoplasmique est liée à la protéine p38 dans le complexe MARS alors que la forme mitochondriale est libre dans l'organelle. Ces deux protéines sont très similaires, elles partagent notamment le même domaine catalytique car elles sont issues d'un même gène par un mécanisme d'épissage alternatif. Seule la forme mitochondriale est encapsidée dans le VIH-1 et sert de co-transporteur de l'ARNt₃^{Lys} (Kaminska *et al*, 2007b). La recherche de partenaires viraux nécessaires à l'encapsidation du complexe mLysRS:ARNt₃^{Lys} avait suggéré que la polyprotéine Gag pourrait interagir avec la LysRS par son domaine CA. Toutefois, la constante de dissociation déterminée pour l'interaction entre Gag et la LysRS, de l'ordre de 310 ± 80 nM (Kovaleski *et al*, 2006), n'était pas en faveur d'une association robuste entre ces deux protéines.

Les objectifs de cette thèse étaient dans un premier temps de rechercher des protéines virales pouvant intervenir comme transporteur du complexe formé de la LysRS mitochondriale et de l'ARNt₃^{Lys} pour acheminer vers le virion lors du bourgeonnement viral l'amorce ARN nécessaire à l'initiation de la transcription inverse. Par des approches de double hybride et par immunoprécipitation, nous avons établi un modèle des interactions protéine-protéine impliquées dans la formation du complexe d'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys}. En recherchant les interactions des précurseurs Gag et GagPol avec les LysRS et leurs domaines, nous avons démontré que seul le domaine Pol du précurseur GagPol a la capacité de s'associer à la LysRS. Ce sont les sous-domaines transframe TF et intégrase IN du domaine Pol qui permettent l'association entre la LysRS et GagPol. Cette association se fait via le domaine catalytique de l'enzyme.

Lors de cette même étude, nous avons également recherché le domaine de la LysRS qui interagit avec p38, la protéine d'échafaudage du complexe MARS. L'interaction de LysRS à p38 se fait aussi via le domaine catalytique de l'enzyme.

A partir des différentes interactions des LysRS avec leurs partenaires cellulaires et viraux, nous avons conclu qu'il devait y avoir *in vivo* un phénomène de compartimentation des LysRS dans la cellule humaine. Lors de l'infection par le VIH-1, Pol ne pourrait pas interagir avec la cLysRS car elle intègre le complexe MARS, en se liant à p38 par son domaine catalytique. Cette forme cytoplasmique de LysRS complexée à MARS n'est plus disponible pour une interaction avec Pol. L'association de mLysRS à Pol serait liée à la disponibilité de cette dernière. Les mécanismes exacts de cette interaction restent encore méconnus.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes focalisé sur la caractérisation de l'un des partenaires du complexe d'encapsidation, la LysRS mitochondriale. Les données que nous avons obtenu auparavant ne permettaient pas d'établir à quel stade l'encapsidation de la LysRS mitochondriale avait lieu, soit avant sa translocation mitochondriale sous forme de précurseur pmLysRS, soit après sous forme mLysRS maturée. Nous avons déterminé le site de maturation du précurseur pmLysRS puis caractérisé les deux formes mitochondriales de la LysRS, en déterminant leurs paramètres cinétiques et leur affinité pour l'ARNt₃^{Lys}. Alors que la forme pmLysRS ne forme pas de complexe stable avec l'ARNt, la forme maturée mLysRS est la plus apte à interagir avec l'ARNt₃^{Lys}. Ce serait donc la mLysRS qui serait impliquée dans le transport de l'ARNt₃^{Lys} dans les particules virales lors du bourgeonnement.

Après avoir identifié les composants principaux du complexe d'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys}, à savoir GagPol comme transporteur du complexe mLysRS:ARNt₃^{Lys}, nous avons recherché si d'autres protéines virales pourraient intervenir dans la formation d'un complexe d'encapsidation spécifique qui ne pourrait interagir qu'avec la mLysRS au détriment des deux autres formes de LysRS. Nous avons montré que les protéines auxiliaires Rev et Vpr sont capables d'interagir avec l'ensemble des LysRS en s'associant à leur domaine catalytique. Elles ne montrent pas de sélectivité particulière pour la forme mitochondriale de l'enzyme.

Pour déterminer si Rev et Vpr font partie du complexe d'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys}, nous avons reconstitué ce complexe *in vitro*. Nous avons pu montrer que la mLysRS et

GagPol sont les deux seuls partenaires de l'ARNt₃^{Lys} dans ce complexe d'encapsidation. Les protéines Rev et Vpr ne peuvent s'y associer. Ces deux protéines virales n'étant pas impliquées dans le complexe d'encapsidation de l'ARNt, mais ayant la capacité d'interagir avec la LysRS (cLysRS, pmLysRS et/ou mLysRS), pourraient intervenir lors d'une étape distincte du cycle viral. Entre autres hypothèses de travail, Vpr pourrait avoir un rôle dans le relargage de la mLysRS de la mitochondrie avant son association à GagPol dans la cellule hôte. Vpr et Rev pourraient aussi contribuer avec la protéase virale à la dislocation de la pince moléculaire formée de TF et IN, et au relargage du complexe mLysRS:ARNt₃^{Lys} au cours de la maturation des virions, puis la protéase pourrait cliver l'extension N-terminale de la mLysRS et libérer ainsi l'ARNt₃^{Lys} pour amorcer la transcription inverse du génome viral. L'une des formes de LysRS pourrait également être impliquée dans la régulation de l'activité de Vpr ou Rev dans d'autres processus viraux, tels que la translocation nucléaire du complexe de preintégration, ou le transport nucléo-cytoplasmique des ARN viraux non épissés, mécanisme qui implique de constantes allées et venues de la protéine Rev. Ces nouveaux rôles potentiels de la LysRS cellulaire, schématisés sur la Figure 47, doivent maintenant être caractérisés en détail.

L'ensemble des données recueillies au cours de cette thèse, nous a permis de faire évoluer le modèle du complexe d'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys}. La forme mitochondriale de LysRS maturée sert de co-transporteur de cet ARNt dans les particules virales du VIH-1. Cet enzyme est détourné de sa voie naturelle et relargué de la mitochondrie par l'action de Vpr dont l'effet pro-apoptotique a déjà été démontré (Kaminska *et al*, 2007a). La mLysRS interagit via son domaine catalytique avec GagPol. GagPol, et plus précisément une synergie entre les domaines TF et IN de Pol, conduit à l'assemblage du complexe d'encapsidation contenant mLysRS:ARNt₃^{Lys}. Aucune autre protéine virale n'intervient lors de cette étape.

A l'issue de cette étude et pour approfondir les connaissances sur l'encapsidation du complexe mLysRS:ARNt₃^{Lys}, il serait nécessaire d'identifier les motifs protéiques et les acides aminés présents sur le domaine catalytique de l'enzyme et qui participent d'une part aux interactions GagPol:mLysRS, induisant l'encapsidation de la mLysRS, et d'autre part, les résidus impliqués dans l'interaction cLysRS-p38, induisant la rétention de la cLysRS dans MARS. L'identification des motifs d'interaction protéine-protéine impliquant les LysRS et leurs divers partenaires pourrait servir à l'élaboration d'inhibiteurs spécifiques et sélectifs

d'une interaction donnée, qui seraient susceptibles de bloquer cette étape du cycle viral à des fins thérapeutiques.

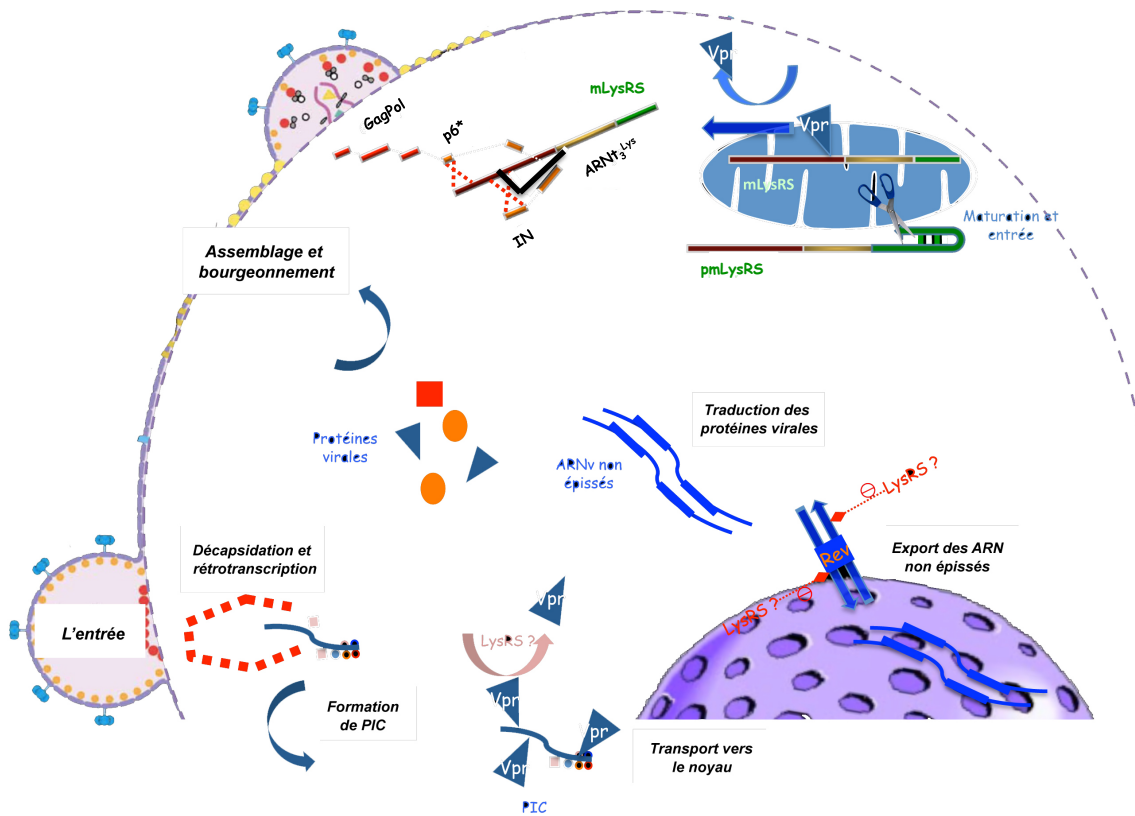


Figure 47 Implication potentielle de la lysyl-ARNt synthétase à diverses étapes du cycle viral du VIH-1: Le cycle répliatif du VIH-1 débute par l'entrée du virus dans la cellule hôte. Les étapes de rétrotranscription se déroulent dans le cytoplasme. Cette étape est suivie par l'import nucléaire du complexe de préintégration PIC qui contient entre autre la protéine virale Vpr. La LysRS pourrait se lier à Vpr à ce stade de l'infection réguler la fonction de Vpr dans le transport de ce complexe. Une fois dans le noyau, l'ADN viral va s'intégrer au génome de la cellule hôte. Lorsque l'expression des gènes viraux s'opère, donnant des transcrits de différentes tailles, les transcrits non épissés qui serviront à la traduction de certaines protéines virales vont être transportés vers le cytoplasme à l'aide de la protéine Rev. Son interaction avec la LysRS pourrait réguler la fonction de Vpr dans l'export de ces ARN. Les protéines virales sont produites dans le cytoplasme en utilisant la machinerie traductionnelle de la cellule hôte. Tous les composants des nouveaux virions sont acheminés vers la membrane cytoplasmique. En plus du génome et des protéines virales, l'ARN_t^{Lys} est également encapsidé. Il est transporté par la mLysRS mature qui provient du précurseur pmLysRS après translocation et maturation mitochondriale. Par la suite, Vpr provoque la dislocation de la membrane mitochondriale et pourrait également intervenir dans le relargage de la mLysRS mature de la mitochondrie. Une fois dans le cytoplasme, mLysRS sera interceptée par GagPol et transportera l'ARN_t^{Lys} dans les particules virales naissantes du VIH-1.

La reconstitution *in vitro* du complexe Pol:mLysRS, en présence ou non de l'ARNt₃^{Lys}, est maintenant maîtrisée au laboratoire, sa purification est envisageable à plus grande échelle. La détermination de la structure cristalline de ce complexe pourrait permettre de conduire l'évolution dirigée de molécules inhibitrices spécifiques des interactions qui sont à l'origine de l'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys} dans les particules virales du VIH-1. Ces molécules inhibitrices qui cibleraient exclusivement une composante de la machinerie traductionnelle mitochondriale sans affecter la machinerie traductionnelle cytoplasmique pourraient permettre à long terme d'élargir le spectre des molécules anti-VIH-1 car, rappelons-le, lorsque l'amorce de la transcription inverse n'est pas encapsidée au sein des particules virales, l'infectivité de ces dernières est abaissée de façon drastique (Gabor *et al*, 2002).

REFERENCES

- Abbink T, Berkhout B (2007) HIV-1 reverse transcription: close encounters between the viral genome and a cellular tRNA. *Adv Pharmacol* **55**: 99-135
- Abelson J, Trotta C, Li H (1998) tRNA splicing. *J Biol Chem* **273**: 12685-12688
- Aiken C, Trono D (1995) Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis. *J Virol* **69**: 5048-5056
- Akins R, Lambowitz A (1987) A protein required for splicing group I introns in neurospora mitochondria is mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase or a derivative thereof. *Cell* **50**: 331-345
- Aldovini A, Young R (1990) Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J Virol* **64**: 1920-1926
- Alizon M, Sonigo P, Barré-Sinoussi F, Chermann J, Tiollais P, Montagnier L, Wain-Hobson S (1984) Molecular cloning of lymphadenopathy-associated virus. *Nature* **312**: 757-760
- Arnez JG, Moras D (1997) Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. *Trends Biochem Sci* **22**: 211-216
- Asante-Appiah E, Skalka A (1997) A metal-induced conformational change and activation of HIV-1 integrase. *J Biol Chem* **272**: 16196-16205
- Barat C, Lullien V, Schatz O, Keith G, Nugeyre M, Gruninger LF, Barre SF, LeGrice S, Darlix J (1989) HIV-1 reverse transcriptase specifically interacts with the anticodon domain of its cognate primer tRNA. *EMBO J* **8**: 3279-3285
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**: 868-8671
- Bartz SR, Rogel ME, Emerman M (1996) Human immunodeficiency virus type 1 cell cycle control: Vpr is cytostatic and mediates G2 accumulation by a mechanism which differs from DNA damage checkpoint control. *J Virol* **70**: 2324-2331
- Bec G, Kerjan P, Waller JP (1994) Reconstitution *in vitro* of the valyl-tRNA synthetase-elongation factor (EF) 1 beta gamma delta complex - Essential roles of the NH₂-terminal extension of valyl-tRNA synthetase and of the EF-1 delta subunit in complex formation. *J Biol Chem* **269**: 2086-2092
- Bec G, Kerjan P, Zha XD, Waller JP (1989) Valyl-tRNA synthetase from rabbit liver. I - Purification as a heterotypic complex in association with elongation factor 1. *J Biol Chem* **264**: 21131-21137
- Beerens N, Berkhout B (2002b) The tRNA primer activation signal in the human immunodeficiency virus type 1 genome is important for initiation and processive elongation of reverse transcription. *J Virol* **76**: 2329-2339

Beerens N, Berkhout B (2002a) Switching the in vitro tRNA usage of HIV-1 by simultaneous adaptation of the PBS and PAS. *RNA* **8**: 357-369

Berg J (1986) Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. *Science* **232**: 485-487

Biswas P, Jiang X, Pacchia A, Dougherty J, Peltz S (2004) The human immunodeficiency virus type 1 ribosomal frameshifting site is an invariant sequence determinant and an important target for antiviral therapy. *J Virol* **78**: 2082-2087

Bouhamdan M, Benichou S, Rey F, Navarro J, Agostini I, Spire B, Camonis J, Slupphaug G, Vigne R, Benarous R, Sire J (1996) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein binds to the uracil DNA glycosylase DNA repair enzyme. *J Virol* **70**: 697-704

Bour S, Schubert U, Peden K, Strebel K (1996) The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 2 enhances viral particle release: a Vpu-like factor? *J Virol* **70**: 820-829

Bour S, Strebel K (2000) HIV accessory proteins: multifunctional components of a complex system. *Adv Pharmacol* **48**: 75-120

Braaten D, Aberham C, Franke E, Yin L, Phares W, Luban J (1996) Cyclosporine A-resistant human immunodeficiency virus type 1 mutants demonstrate that Gag encodes the functional target of cyclophilin A. *J Virol* **70**: 5170-5176

Brick P, Bhat T, Blow D (1989) Structure of tyrosyl-tRNA synthetase refined at 2.3 Å resolution. Interaction of the enzyme with the tyrosyl adenylate intermediate. *J Mol Biol* **208**: 83-98

Brick P, Blow D (1987) Crystal structure of a deletion mutant of a tyrosyl-tRNA synthetase complexed with tyrosine. *J Mol Biol* **194**: 287-297

Briggs J, Simon M, Gross I, Kräusslich H, Fuller S, Vogt V, Johnson M (2004) The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat Struct Mol Biol* **7**: 672-675

Buchsacher GJ, Yu L, Murai F, Friedmann T, Miyanochara A (1999) Association of murine leukemia virus pol with virions, independent of Gag-Pol expression. *J Virol* **73**: 9632-9637

Bukovsky A, Göttlinger H (1996) Lack of integrase can markedly affect human immunodeficiency virus type 1 particle production in the presence of an active viral protease. *J Virol* **70**: 6820-6825

Bukrinskaya A (2007) HIV-1 matrix protein: a mysterious regulator of the viral life cycle. *Virus Res* **124**: 1-11

Bukrinsky M, Sharova N, Dempsey M, Stanwick T, Bukrinskaya A, Haggerty S, Stevenson M (1992) Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 6580-6584

- Bullard J, Cai Y, Demeler B, Spremulli L (1999) Expression and characterization of a human mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol* **288**: 567-577
- Burton A (2003) Enfuvirtide approved for defusing HIV. *Lancet Infect Dis* **3**: 260
- Cahuzac B, Berthonneau E, Birlirakis N, Guittet E, Mirande M (2000) A recurrent RNA-binding domain is appended to eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases. *EMBO J* **19**: 445-452
- Cen S, Javanbakht H, Kim S, Shiba K, Craven R, Rein A, Ewalt K, Schimmel P, Musier-Forsyth K, Kleiman L (2002) Retrovirus-specific packaging of aminoacyl-tRNA synthetases with cognate primer tRNAs. *J Virol* **76**: 13111-13115
- Cen S, Javanbakht H, Niu M, Kleiman L (2004a) Ability of wild-type and mutant lysyl-tRNA synthetase to facilitate tRNA^{Lys} incorporation into human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **78**: 1595-1601
- Cen S, Khorchid A, Javanbakht H, Gabor J, Stello T, Shiba K, Musier-Forsyth K, Kleiman L (2001) Incorporation of lysyl-tRNA synthetase into human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **75**: 5043-5048
- Cen S, Niu M, Saadatmand J, Guo F, Huang Y, Nabel G, Kleiman L (2004b) Incorporation of pol into human immunodeficiency virus type 1 Gag virus-like particles occurs independently of the upstream Gag domain in Gag-pol. *J Virol* **78**: 1042-1049
- Chan D, Fass D, Berger J, Kim P (1997) Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**: 263-273
- Chazal N, Singer G, Aiken C, Hammarskjöld M, Rekosh D (2001) Human immunodeficiency virus type 1 particles pseudotyped with envelope proteins that fuse at low pH no longer require Nef for optimal infectivity. *J Virol* **75**: 4014-4018
- Chen Y, Ts'ai P, Yang C, Wang C (1997) Generation of infectious virus particles by transient co-expression of human immunodeficiency virus type 1 gag mutants. *J Gen Virol* **78**: 2497-2501
- Cherniack A, Garriga G, Kittle JJ, Akins R, Lambowitz A (1990) Function of Neurospora mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase in RNA splicing requires an idiosyncratic domain not found in other synthetases. *Cell* **62**: 745-755
- Cirakoglu B, Mirande M, Waller J (1985a) A model for the structural organization of aminoacyl-tRNA synthetases in mammalian cells. *FEBS Lett* **183**: 185-190
- Cirakoglu B, Waller J (1985b) Leucyl-tRNA and lysyl-tRNA synthetases, derived from the high-Mr complex of sheep liver, are hydrophobic proteins. *Eur J Biochem* **151**: 101-110
- Clark RL, Neidhardt FC (1990) Roles of the two lysyl-tRNA synthetases of Escherichia coli: analysis of nucleotide sequences and mutant behavior. *J Bacteriol* **172**: 3237-3243

- Claros M (1995) MitoProt, a Macintosh application for studying mitochondrial proteins. *Comput Appl Biosci* **11**: 441-447
- Clever J, Wong M, Parslow T (1996) Requirements for kissing-loop-mediated dimerization of human immunodeficiency virus RNA. *J Virol* **70**: 5902-5908
- Cobrinik D, Aiyar A, Ge Z, Katzman M, Huang H, Leis J (1991) Overlapping retrovirus U5 sequence elements are required for efficient integration and initiation of reverse transcription. *J Virol* **65**: 3864-3872
- Cobrinik D, Soskey L, Leis J (1988) A retroviral RNA secondary structure required for efficient initiation of reverse transcription. *J Virol* **62**: 3622-3630
- Commans S, Lazard M, Delort F, Blanquet S, Plateau P (1998) tRNA anticodon recognition and specification within subclass IIb aminoacyl-tRNA synthetases. *J Mol Biol* **278**: 801-813
- Corti O, Hampe C, Koutnikova H, Darios F, Jacquier S, Prigent A, Robinson J, Pradier L, Ruberg M, Mirande M, Hirsch T, Rooney T, Fournier A, Brice A (2003) The p38 subunit of the aminoacyl-tRNA synthetase complex is a Parkin substrate: linking protein biosynthesis and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* **12**: 1427-1437
- Crepin T, Peterson F, Haertlein M, Jensen D, Wang C, Cusack S, Kron M (2011) A hybrid structural model of the complete *Brugia malayi* cytoplasmic asparaginyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol* **405**: 1056-1069
- Cusack S (1997) Aminoacyl-tRNA synthetases. *Curr Opin Struct Biol* **7**: 881-889
- Cusack S, Berthet-Colominas C, Härtlein M, Nassar N, Leberman R (1990) A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å. *Nature* **347**: 249-255
- Cusack S, Härtlein M, Leberman R (1991) Sequence, structural and evolutionary relationships between class 2 aminoacyl-tRNA synthetases. *Nucleic Acids Res* **19**: 3489-3498
- Daly T, Cook K, Gray G, Maione T, Rusche J (1989) Specific binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the Rev-responsive element in vitro. *Nature* **342**: 816-819
- Darlix J, Godet J, Ivanyi-Nagy R, Fossé P, Mauffret O, Y. M (2011) Flexible nature and specific functions of the HIV-1 nucleocapsid protein. *J Mol Biol* **410**: 565-581
- Debouck C, Gorniak J, Strickler J, Meek T, Metcalf B, Rosenberg M (1987) Human immunodeficiency virus protease expressed in *Escherichia coli* exhibits autoprocessing and specific maturation of the gag precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 8903-8906
- Deinert K, Fasiolo F, Hurt EC, Simos G (2001) Arc1p organizes the yeast aminoacyl-tRNA synthetase complex and stabilizes its interaction with the cognate tRNAs. *J Biol Chem* **276**: 6000-6008

- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton R, Hill C, Davis C, Peiper S, Schall T, Littman D, Landau N (1996) Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**: 661-666
- Dettenhofer M, Cen S, Carlson B, Kleiman L, Yu X (2000) Association of human immunodeficiency virus type 1 Vif with RNA and its role in reverse transcription. *J Virol* **74**: 8938-8945
- Doms R, Moore J (2000) HIV-1 membrane fusion: targets of opportunity. *J Cell Biol* **151**: 9-14
- Dorsey B, Levin R, McDaniel S, Vacca J, Guare J, Darke P, Zugay J, Emini E, Schleif W, Quintero J (1994) L-735,524: the design of a potent and orally bioavailable HIV protease inhibitor. *J Med Chem* **37**: 3443-3451
- Doublet S, Bricogne G, Gilmore C, Carter C (1995) Tryptophanyl-tRNA synthetase crystal structure reveals an unexpected homology to tyrosyl-tRNA synthetase. *Structure* **3**: 17-31
- Douglas J, Gustin J, Viswanathan K, Mansouri M, Moses A, Früh K (2010) The great escape: viral strategies to counter BST-2/tetherin. *PLoS Pathog* **6**: e1000913
- Elder RT, Yu M, Chen M, Zhu X, Yanagida M, Zhao Y (2001) HIV-1 Vpr induces cell cycle G2 arrest in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) through a pathway involving regulatory and catalytic subunits of PP2A and acting on both Wee1 and Cdc25. *Virology* **287**: 359-370
- Eldred E, Schimmel P (1972) Rapid deacylation by isoleucyl transfer ribonucleic acid synthetase of isoleucine-specific transfer ribonucleic acid aminoacylated with valine. *J Biol Chem* **247**: 2961-2964
- Ennifar E, Paillart J, Bodlener A, Walter P, Weibel J, Aubertin A, Pale P, Dumas P, Marquet R (2006) Targeting the dimerization initiation site of HIV-1 RNA with aminoglycosides: from crystal to cell. *Nucleic Acids Res* **3**: 2328-2339
- Ennifar E, Walter P, Ehresmann B, Ehresmann C, Dumas P (2001) Crystal structures of coaxially stacked kissing complexes of the HIV-1 RNA dimerization initiation site. *Nat Struct Biol* **8**: 1064-1068
- Ennifar E, Yusupov M, Walter P, Marquet R, Ehresmann B, Ehresmann C, Dumas P (1999) The crystal structure of the dimerization initiation site of genomic HIV-1 RNA reveals an extended duplex with two adenine bulges. *Structure* **7**: 1439-1449
- Eriani G, Delarue M, Poch O, Gangloff J, Moras D (1990a) Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* **347**: 203-206
- Eriani G, Dirheimer G, Gangloff J (1990b) Aspartyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*: cloning and characterisation of the gene, homologies of its translated amino acid sequence with asparaginyl- and lysyl-tRNA synthetases. *Nucleic Acids Res* **18**: 7109-7118

- Fackler O, Moris A, Tibroni N, Giese S, Glass B, Schwartz O, Kräusslich H (2006) Functional characterization of HIV-1 Nef mutants in the context of viral infection. *Virology* **351**: 322-339
- Fang P, Zhang H, Shapiro R, Marshall A, Schimmel P, Yang X, Guo M (2011) Structural context for mobilization of a human tRNA synthetase from its cytoplasmic complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 8239-8244
- Farnet C, Haseltine W (1990) Integration of human immunodeficiency virus type 1 DNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4164-4168
- Feng Y, Campbell S, Harvin D, Ehresmann B, Ehresmann C, Rein A (1999) The human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein has nucleic acid chaperone activity: Possible role in dimerization of genomic RNA and placement of tRNA on the primer binding site. *J Virol* **73**: 4251-4256
- Fersht A (1977) Editing mechanisms in protein synthesis. Rejection of valine by the isoleucyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **16**: 1025-1030
- Francin M, Kaminska M, Kerjan P, Mirande M (2002) The N-terminal domain of mammalian lysyl-tRNA synthetase is a functional tRNA-binding domain. *J Biol Chem* **277**: 1762-1769
- Francin M, Mirande M (2003) Functional dissection of the eukaryotic-specific tRNA-interacting factor of lysyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* **278**: 1472-1479
- Frechin M, Senger B, Brayé M, Kern D, Martin R, Becker H (2009) Yeast mitochondrial Gln-tRNA(Gln) is generated by a GatFAB-mediated transamidation pathway involving Arc1p-controlled subcellular sorting of cytosolic GluRS. *Genes Dev* **23**: 1119-1130
- Freist W, Gauss DH, Ibba M, Söll D (1997) Glutaminyl-tRNA synthetase. *Biol Chem* **378**: 1103-1117
- Freist W, Sternbach H (1989) Isoleucyl-tRNA synthetase from baker's yeast. Discrimination of 20 amino acids in aminoacylation of tRNA^{Ile}-C-C-3'dA, role of terminal hydroxyl groups in aminoacylation of tRNA^{Ile}-C-C-A. *Eur J Biochem* **178**: 595-602
- Frick L, Nelson D, St Clair M, Furman P, Krenitsky T (1988) Effects of 3'-azido-3'-deoxythymidine on the deoxynucleotide triphosphate pools of cultured human cells. *Biochem Biophys Res Commun* **154**: 124-129
- Frugier M, Moulinier L, Giegé R (2000) A domain in the N-terminal extension of class IIB eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases is important for tRNA binding. *EMBO J* **19**: 2371-2380
- Gabor J, Cen S, Javanbakht H, Niu M, Kleiman L (2002) Effect of altering the tRNA₃^{Lys} concentration in human immunodeficiency virus type 1 upon its annealing to viral RNA, GagPol incorporation, and viral infectivity. *J Virol* **76**: 9096-9102

- Galani K, Grosshans H, Deinert K, Hurt EC, Simos G (2001) The intracellular location of two aminoacyl-tRNA synthetases depends on complex formation with Arc1p. *EMBO J* **20**: 6889-6898
- Gallo R, Salahuddin S, Popovic M, Shearer G, Kaplan M, Haynes B, Palker T, Redfield R, Oleske J, Safai B (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**: 500-503
- Gamble T, Yoo S, Vajdos F, von Schwedler U, Worthylake D, Wang H, McCutcheon J, Sundquist W, Hill C (1997) Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* **278**: 849-853
- Gao F, Bailes E, Robertson D, Chen Y, Rodenburg C, Michael S, Cummins L, Arthur L, Peeters M, Shaw G, Sharp P, Hahn B (1999) Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. *Nature* **397**: 436-441
- Garrett E, Tiley L, Cullen B (1991) Rev activates expression of the human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr gene products. *J Virol* **65**: 1653-1657
- Gatignol A (2007) Transcription of HIV: Tat and cellular chromatin. *Adv Pharmacol* **55**: 137-159
- Genin M, Poel T, Yagi Y, Biles C, Althaus I, Keiser B, Kopta L, Friis J, Reusser F, Adams W, Olmsted R, Voorman R, Thomas R, Romero D (1996) Synthesis and bioactivity of novel bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) reverse transcriptase inhibitors: structure-activity relationships and increased metabolic stability of novel substituted pyridine analogs. *J Med Chem* **39**: 5267-5275
- Gheysen D, Jacobs E, de Foresta F, Thiriart C, Francotte M, Thines D, De Wilde M (1989) Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* **59**: 103-112
- Giegé R, Sissler M, Florentz C (1998) Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res* **26**: 5017-5035
- Goldsmith M, Warmerdam M, Atchison R, Miller M, Greene W (1995) Dissociation of the CD4 downregulation and viral infectivity enhancement functions of human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J Virol* **69**: 4112-4121
- Golinelli-Cohen M, Mirande M (2007) Arc1p is required for cytoplasmic confinement of synthetases and tRNA. *Mol Cell Biochem* **300**: 47-59
- Gottlieb M, Schroff R, Schanker H, Weisman J, Fan P, Wolf R, 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* **24**: 1425-1431
- Göttlinger H, Dorfman T, Sodroski J, Haseltine W (1991) Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 3195-3199

- Göttlinger H, Sodroski J, Haseltine W (1989) Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 5781-5785
- Gragerov A, Kino T, Ilyina-Gragerova G, Chrousos G, Pavlakis G (1998) HHR23A, the human homologue of the yeast repair protein RAD23, interacts specifically with Vpr protein and prevents cell cycle arrest but not the transcriptional effects of Vpr. *Virology* **245**: 323-330
- Graindorge J, Senger B, Tritch D, Simos G, Fasiolo F (2005) Role of Arc1p in the modulation of yeast glutamyl-tRNA synthetase activity. *Biochemistry* **44**: 1344-1352
- Green DR, Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**: 626-629
- Guigou L, Shalak V, Mirande M (2004) The tRNA-interacting factor p43 associates with mammalian arginyl-tRNA synthetase but does not modify its tRNA aminoacylation properties. *Biochemistry* **43**: 4592-4600
- Guo F, Cen S, Niu M, Javanbakht H, Kleiman L (2003) Specific inhibition of the synthesis of human lysyl-tRNA synthetase results in decreases in tRNA^{Lys} incorporation, tRNA₃^{Lys} annealing to viral RNA, and viral infectivity in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **77**: 9817-9822
- Guo M, Ignatov M, Musier-Forsyth K, Schimmel P, Yang X (2008) Crystal structure of tetrameric form of human lysyl-tRNA synthetase: Implications for multisynthetase complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 2331-2336
- Gyuris J, Golemis E, Chertkov H, Brent R (1993) Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**: 791-803
- Harris R, Bishop K, Sheehy A, Craig H, Petersen-Mahrt S, Watt I, Neuberger M, Malim M (2003) DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* **113**: 803-809
- He J, Choe S, Walker R, Di Marzio P, Morgan DO, Landau NR (1995) Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J Virol* **69**: 6705-6711
- Heinzinger NK, Bukinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, Lee MA, Gendelman HE, Ratner L, Stevenson M, Emerman M (1994) The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 7311-7315
- Hill C, Worthylake D, Bancroft D, Christensen A, Sundquist W (1996) Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 3099-3104
- Holley R, Apgar J, Everett G, Madison J, Marquisee M, Merrill S, Penswick J, Zamir A (1965) Structure of a ribonucleic acid. *Science* **147**: 1462-1465
- Hopper AK, Phizicky EM (2003) tRNA transfers to the limelight. *Genes Dev* **17**: 162-180

- Houzet L, Morichaud Z, Didierlaurent L, Muriaux D, Darlix J, Mougél M (2008) Nucleocapsid mutations turn HIV-1 into a DNA-containing virus. *Nucleic Acids Res* **36**: 2311-2319
- Hsu K, Seharaseyon J, Dong P, Bour S, Marbán E (2004) Mutual functional destruction of HIV-1 Vpu and host TASK-1 channel. *Mol Cell* **14**: 259-267
- Huang M, Martin M (1997) Incorporation of Pr160(gag-pol) into virus particles requires the presence of both the major homology region and adjacent C-terminal capsid sequences within the Gag-Pol polyprotein. *J Virol* **71**: 4472-4478
- Huang M, Orenstein J, Martin MA, Freed E (1995) p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol* **69**: 6810-6818
- Huang Y, Khorchid A, Wang J, Parniak M, Darlix J, Wainberg M, Kleiman L (1997) Effect of mutations in the nucleocapsid protein (NCp7) upon Pr160(gag-pol) and tRNA(Lys) incorporation into human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **71**: 4378-4384
- Huvent I, Hong S, Fournier C, Gay B, Tournier J, Carrière C, Courcoull M, Vigne R, Spire B, Boulanger P (1998) Interaction and co-encapsidation of human immunodeficiency virus type 1 Gag and Vif recombinant proteins. *J Gen Virol* **79**: 1069-1081
- Ibba M, Bono J, Rosa PA, Söll D (1997a) Archaeal-type lysyl-tRNA synthetase in the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Proc Nat Acad Sci USA* **94**: 14383-14388
- Ibba M, Morgan S, Curnow A, Pridmore D, Vothknecht U, Gardner W, Lin W, Woese C, Söll D (1997b) A euryarchaeal lysyl-tRNA synthetase: Resemblance to class I synthetases. *Science* **278**: 1119-1122
- Isel C, Marquet R, Keith G, Ehresmann C, Ehresmann B (1993) Modified nucleotides of tRNA(3Lys) modulate primer/template loop-loop interaction in the initiation complex of HIV-1 reverse transcription. *J Biol Chem* **268**: 25269-25272
- Isel C, Ehresmann C, Keith G, Ehresmann B, Marquet R (1995) Initiation of reverse transcription of HIV-1: secondary structure of the HIV-1 RNA/tRNA_{3^{Lys}} (template/primer) complex. *J Mol Biol* **247**: 236-250
- Jacks T, Power M, Masiarz F, Luciw P, Barr P, Varmus H (1988) Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* **331**: 280-283
- Jacotot E, Ferri KF, El Hamel C, Brenner C, Druillennec S, Hoebeke J, Rustin P, Metivier D, Lenoir C, Geuskens M, Vieira HL, Loeffler M, Belzacq AS, Briand JP, Zamzami N, Edelman L, Xie ZH, Reed JC, Roques BP, Kroemer G (2001) Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein R and Bcl-2. *J Exp Med* **193**: 509-520.
- Jacotot E, Ravagnan L, Loeffler M, Ferri KF, Vieira HL, Zamzami N, Costantini P, Druillennec S, Hoebeke J, Briand JP, Irinopoulou T, Daugas E, Susin SA, Cointe D, Xie ZH,

- Reed JC, Roques BP, Kroemer G (2000) The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J Exp Med* **191**: 33-45
- Janssen G, van Damme H, Kriek J, Amons R, Möller W (1994) The subunit structure of elongation factor 1 from *Artemia*. Why two alpha-chains in this complex? *J Biol Chem* **269**: 31410-31417
- Javanbakht H, Cen S, Musier-Forsyth K, Kleiman L (2002) Correlation between tRNA₃^{Lys} aminoacylation and its incorporation into HIV-1. *J Biol Chem* **277**: 17389-17396
- Javanbakht H, Halwani R, Cen S, Saadatmand J, Musier-Forsyth K, Gottlinger H, Kleiman L (2003) The interaction between HIV-1 Gag and human lysyl-tRNA synthetase during viral assembly. *J Biol Chem* **278**: 27644-27651
- Jiang M, Mak J, Ladha A, Cohen E, Klein M, Rovinski B, Kleiman L (1993) Identification of tRNAs incorporated into wild-type and mutant human immunodeficiency virus type-1. *J Virol* **67**: 3246-3253
- Jiang S, Wolfe C, Warrington J, Norcum M (2005) Three-dimensional reconstruction of the valyl-tRNA synthetase/elongation factor-1H complex and localization of the delta subunit. *FEBS Lett* **579**: 6049-6054
- Kalpana G, Marmon S, Wang W, Crabtree G, Goff S (1994) Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5. *Science* **266**: 2002-2006
- Kaminska M, Francin M, Shalak V, Mirande M (2007a) Role of HIV-1 Vpr-induced apoptosis on the release of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase. *FEBS Lett* **581**: 3105-3110
- Kaminska M, Havrylenko S, Decottignies P, Gillet S, Le Maréchal P, Negrutskii B, Mirande M (2009) Dissection of the structural organization of the aminoacyl-tRNA synthetase complex. *J Biol Chem* **284**: 6053-6060
- Kaminska M, Shalak V, Francin M, Mirande M (2007b) Viral hijacking of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase. *J Virol* **81**: 68-73
- Kaminska M, Shalak V, Mirande M (2001) The appended C-domain of human methionyl-tRNA synthetase has a tRNA-sequestering function. *Biochemistry* **40**: 14309-14316
- Kamper U, Kuck U, Cherniack A, Lambowitz A (1992) The mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase of *podospira anserina* Is a bifunctional enzyme active in protein synthesis and RNA splicing. *Mol Cell Biol* **12**: 499-511
- Kao J, Ryan J, Brett G, Chen J, Shen H, Fan Y, Godman G, Familletti P, Wang F, Pan Y, et al. (1992) Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms. *J Biol Chem* **267**: 20239-20247
- Karacostas V, Wolffe E, Nagashima K, Gonda M, Moss B (1993) Overexpression of the HIV-1 gag-pol polyprotein results in intracellular activation of HIV-1 protease and inhibition of assembly and budding of virus-like particles. *Virology* **193**: 661-671

- Kawamata H, Magrané J, Kunst C, King M, Manfredi G (2008) Lysyl-tRNA synthetase is a target for mutant SOD1 toxicity in mitochondria. *J Biol Chem* **283**: 28321-28328
- Khorchid A, Javanbakht H, Wise S, Halwani R, Parniak MA, Wainberg M, Kleiman L (2000) Sequences within Pr160gag-pol affecting the selective packaging of primer tRNA(Lys3) into HIV-1. *J Mol Biol* **299**: 17-26
- Kim K, Park M, Choi S, Oh Y, Choi E, Cho H, Kim M, Kim S, Kim D, Kim S, Kang B (2008) Determination of three-dimensional structure and residues of the novel tumor suppressor AIMP3/p18 required for the interaction with ATM. *J Biol Chem* **283**: 14032-14040
- Kim M, Park B, Kang Y, Kim H, Park J, Kang J, Lee S, Han J, Lee H, Kim S (2003) Downregulation of FUSE-binding protein and c-myc by tRNA synthetase cofactor p38 is required for lung cell differentiation. *Nat Genet* **34**: 330-336
- Kim SH, Suddath FL, Quigley GJ, McPherson A, Sussman JL, Wang AHJ, Seeman NC, Rich A (1974) Three dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine tRNA. *Science* **185**: 435-440
- Kino T, Gragerov A, Slobodskaya O, Tsopanomichalou M, Chrousos G, Pavlakis G (2002) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) accessory protein Vpr induces transcription of the HIV-1 and glucocorticoid-responsive promoters by binding directly to p300/CBP coactivators. *J Virol* **76**: 9724-9734
- Kleman T, Wei D, Simpson K, First E (1997) Human tyrosyl tRNA synthetase shares amino acid sequence homology with a putative cytokine. *J Biol Chem* **272**: 14420-14425
- Kohlstaedt L, Wang J, Friedman J, Rice P, Steitz T (1992) Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* **256**: 1783-1790
- Kovaleski B, Kennedy R, Hong M, Datta S, Kleiman L, Rein A, Musier-Forsyth K (2006) In vitro characterization of the interaction between HIV-1 Gag and human lysyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* **281**: 19449-19456
- Kovaleski B, Kennedy R, Khorchid A, Kleiman L, Matsuo H, Musier-Forsyth K (2007) Critical role of helix 4 of HIV-1 capsid C-terminal domain in interactions with human lysyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* **282**: 32274-32279
- Kunst C, Mezey E, Brownstein M, Patterson D (1997) Mutations in SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis cause novel protein interactions. *Nat Genet* **15**: 91-94
- Kuppuswamy M, Subramanian T, Srinivasan A, Chinnadurai G (1989) Multiple functional domains of Tat, the trans-activator of HIV-1, defined by mutational analysis. *Nucleic Acids Res* **17**: 3551-3561
- Kwong P, Wyatt R, Robinson J, Sweet R, Sodroski J, Hendrickson W (1998) Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**: 648-659

- Labouesse M (1990) The yeast mitochondrial leucyl-tRNA synthetase is a splicing factor for the excision of several group I introns. *Mol Gen Genet* **224**: 209-221
- Lambowitz A, Perlman P (1990) Involvement of aminoacyl-tRNA synthetases and other proteins in group I and group II intron splicing. *Trends Biochem Sci* **15**: 440-444
- Le Grice S, Naas T, Wohlgensinger B, Schatz O (1991) Subunit-selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer associated p51 of HIV-1 reverse transcriptase. *EMBO J* **10**: 3905-3911
- Lechler A, Kreutzer R (1998) The phenylalanyl-tRNA synthetase specifically binds DNA. *J Mol Biol* **278**: 897-901
- Lee Y, Nechushtan H, Figov N, Razin E (2004) The function of lysyl-tRNA synthetase and Ap4A as signaling regulators of MITF activity in FcepsilonRI-activated mast cells. *Immunity* **20**: 145-151
- Lenburg M, Landau N (1993) Vpu-induced degradation of CD4: requirement for specific amino acid residues in the cytoplasmic domain of CD4. *J Virol* **67**: 7238-7245
- Levin J, Seidman J (1981) Effect of polymerase mutations on packaging of primer tRNA^{Pro} during murine leukemia virus assembly. *J Virol* **38**: 403-408
- Levinger L, Oestreich I, Florentz C, Mörl M (2004) A pathogenesis-associated mutation in human mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) leads to reduced 3'-end processing and CCA addition. *J Mol Biol* **337**: 535-544
- Liang C, Rong L, Morin N, Cherry E, Huang Y, Kleiman L, Wainberg M (1997) The roles of the human immunodeficiency virus type 1 Pol protein and the primer binding site in the placement of primer tRNA(3Lys) onto viral genomic RNA. *J Virol* **71**: 9075-9086.
- Liu B, Yu X, Luo K, Yu Y, Yu X (2004) Influence of primate lentiviral Vif and proteasome inhibitors on human immunodeficiency virus type 1 virion packaging of APOBEC3G. *J Virol* **78**: 2072-2081
- Liu M, Spremulli L (2000) Interaction of mammalian mitochondrial ribosomes with the inner membrane. *J Biol Chem* **275**: 29400-29406
- Lori F, di Marzo Veronese F, de Vico A, Lusso P, Reitz M, Jr., Gallo R (1992) Viral DNA carried by human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol* **66**: 5067-5074
- Mak J, Jiang M, Wainberg M, Hammariskjold M, Rekosh D, Kleiman L (1994) Role of Pr160^{Gag-Pol} in mediating the selective incorporation of tRNA^{Lys} into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol* **68**: 2065-2072
- Malim M, Böhnlein S, Hauber J, Cullen B (1989a) Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator derivation of a trans-dominant repressor of Rev function. *Cell* **58**: 205-214

Malim M, Hauber J, Le S, Maizel JV, Cullen BR (1989b) The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**: 254-257

Margulis L (1981) Symbiosis in cell evolution. *San Francisco : Freeman WH*

Marin M, Rose K, Kozak S, Kabat D (2003) HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* **11**: 1398-1403

McCune J (1991) HIV-1: the infective process in vivo. *Cell* **64**: 351-363

Mely Y, Derocquigny H, Sorinasjimeno M, Keith G, Roques B, Marquet R, Gerard D (1995) Binding of the HIV-1 nucleocapsid protein to the primer tRNA₃^{Lys}, in vitro, is essentially not specific. *J Bio Chem* **270**: 1650-1656

Michel F, Crucifix C, Granger F, Eiler S, Mouscadet J, Korolev S, Agapkina J, Ziganshin R, Gottikh M, Nazabal A, Emiliani S, Benarous R, Moras D, Schultz P, M. Ruff (2009) Structural basis for HIV-1 DNA integration in the human genome, role of the LEDGF/P75 cofactor. *EMBO J* **28**: 980-991

Mirande M (2005) Multi-Aminoacyl-tRNA Synthetase Complexes. In *The Aminoacyl-tRNA Synthetases*, Ibba M, Francklyn C, Cusack S (eds), pp 298-308. Georgetown, Texas, USA: Landes Bioscience

Mishima Y, Steitz J (1995) Site-specific crosslinking of 4-thiouridine-modified human tRNA(3)(Lys) to reverse transcriptase from human immunodeficiency virus type i. *EMBO J* **14**: 2679-2687

Morales AJ, Swairjo MA, Schimmel P (1999) Structure-specific tRNA-binding protein from the extreme thermophile *Aquifex aeolicus*. *EMBO J* **18**: 3475-3483

Morellet N, Bouaziz S, Petitjean P, Roques BP (2003) NMR Structure of the HIV-1 Regulatory Protein VPR. *J Mol Biol* **327**: 215-227

Morita E, Sundquist W (2004) Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 395-425

Mudge S, Williams J, Eyre H, Sutherland G, Cowan P, Power D (1998) Complex organisation of the 5'-end of the human glycine tRNA synthetase gene. *Gene* **209**: 45-50

Muramatsu T, Nishikawa K, Nemoto F, Kuchino Y, Nishimura S, Miyazawa T, Yokoyama S (1988) Codon and amino-acid specificities of a transfer RNA are both converted by a single post-transcriptional modification. *Nature* **336**: 179-181

Navia M, Fitzgerald P, McKeever B, Leu C, Heimbach J, Herber W, Sigal I, Darke P, Springer J (1989) Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature* **337**: 615-620

Negrutskii B, Shalak V, Kerjan P, El'skaya A, Mirande M (1999) Functional interaction of mammalian valyl-tRNA synthetase with elongation factor EF-1alpha in the complex with EF-1H. *J Biol Chem* **274**: 4545-4550

- Neil S, Zang T, Bieniasz P (2008) Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* **451**: 425-430
- O'Donoghue P, Luthey-Schulten Z (2003) Evolution of structure in aminoacyl-tRNA synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 550-573
- Onesti S, Desogus G, Brevet A, Chen J, Plateau P, Blanquet S, Brick P (2000) Structural studies of lysyl-tRNA synthetase: conformational changes induced by substrate binding. *Biochemistry* **39**: 12853-12861
- Oude Essink B, Das A, Berkhout B (1996) HIV-1 reverse transcriptase discriminates against non-self tRNA primers. *J Mol Biol* **264**: 243-254
- Park B, Kang J, Lee S, Choi S, Shin Y, Ahn Y, Choi Y, Choi D, Lee K, Kim S (2005) The haploinsufficient tumor suppressor p18 upregulates p53 via interactions with ATM/ATR. *Cell* **120**: 209-221
- Park J, Morrow C (1991) Overexpression of the gag-pol precursor from human immunodeficiency virus type 1 proviral genomes results in efficient proteolytic processing in the absence of virion production. *J Virol* **65**: 5111-5117
- Pavlikis G, Felber B (1990) Regulation of expression of human immunodeficiency virus. *New Biol* **2**: 20-31
- Perelson A, Neumann A, Markowitz M, Leonard J, Ho D (1996) HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* **271**: 1582-1586
- Perona JJ, Rould MA, Steitz TA (1993) Structural basis for tRNA aminoacylation by Escherichia coli glutamyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **32**: 8758-8771
- Perret V, Florentz C, Puglisi JD, Giegé R (1992) Effect of conformational features on the aminoacylation of tRNAs and consequences on the permutation of tRNA specificities. *J Mol Biol* **226**: 323-333
- Peters G, Harada F, Dahlberg J, Panet A, Haseltine W, Baltimore D (1977) Low-molecular-weight RNAs of Moloney murine leukemia virus: identification of the primer for RNA-directed DNA synthesis. *J Virol* **21**: 1031-1041
- Pornillos O, Garrus J, Sundquist W (2002) Mechanisms of enveloped RNA virus budding. *Trends Cell Biol* **12**: 569-579
- Prabakaran P, Dimitrov A, Fouts T, Dimitrov D (2007) Structure and function of the HIV envelope glycoprotein as entry mediator, vaccine immunogen, and target for inhibitors. *Adv Pharmacol* **55**: 33-97
- Prats A, Sarih L, Gabus C, Litvak S, Keith G, Darlix J (1988) Small finger protein of avian and murine retroviruses has nucleic acid annealing activity and positions the replication primer tRNA onto genomic RNA. *EMBO J* **7**: 1777-1783

- Pryciak P, Varmus H (1992) Nucleosomes, DNA-binding proteins, and DNA sequence modulate retroviral integration target site selection. *Cell* **69**: 769-780
- Putney S, Melendez D, Schimmel P (1981) Cloning, partial sequencing, and in vitro transcription of the gene for alanine tRNA synthetase. *J Biol Chem* **256**: 205-211
- Quevillon S, Mirande M (1996) The p18 component of the multisynthetase complex shares a protein motif with the beta and gamma subunits of eukaryotic elongation factor 1. *FEBS Lett* **395**: 63-67
- Quevillon S, Robinson J, Berthonneau E, Siatecka M, Mirande M (1999) Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: Identification of protein-protein interactions and characterization of a core protein. *J Mol Biol* **285**: 183-195
- Quinn T (1989) The epidemiology of the acquired immune deficiency syndrome and the immunological responses to the human immunodeficiency virus. *Curr Opin Immunol* **3**: 502-512
- Raba M, Limburg K, Burghagen M, Katze J, Simsek M, Heckman J, Rajbhandary U, Gross H (1979) Nucleotide sequence of three isoaccepting lysine tRNAs from rabbit liver and SV40-transformed mouse fibroblasts. *Eur J Biochem* **97**: 305-318
- Ratner L, Haseltine W, Patarca R, Livak K, Starcich B, Josephs S, Doran E, Rafalski J, Whitehorn E, Baumeister K (1985) Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* **313**: 277-284
- Rein A, Henderson L, Levin J (1998) Nucleic-acid-chaperone activity of retroviral nucleocapsid proteins: significance for viral replication. *Trends Biochem Sci* **23**: 297-301
- Rizzuto C, Wyatt R, Hernández-Ramos N, Sun Y, Kwong P, Hendrickson W, Sodroski J (1998) A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* **280**: 1949-1953
- Robertus JD, Ladner JE, Finch JT, Rhodes D, Brown RS, Clark BFC, Klug A (1974) Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3 Å resolution. *Nature* **250**: 546-551
- Robinson J, Kerjan P, Mirande M (2000) Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: Quantitative analysis of protein-protein interactions and mechanism of complex assembly. *J Mol Biol* **304**: 983-994
- Romby P, Caillet J, Ebel C, Sacerdot C, Graffe M, Eyermann F, Brunel C, Moine H, Ehresmann C, Ehresmann B, Springer M (1996) The expression of *E. coli* threonyl-tRNA synthetase is regulated at the translational level by symmetrical operator-repressor interactions. *EMBO J* **15**: 5976-5987
- Rould MA, Perona JJ, Söll D, Steitz TA (1989) Structure of *E. coli* glutamyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Gln} and ATP at 2.8 Å resolution. *Science* **246**: 1135-1142
- Royce R, Sena A, Cates WJ, Cohen M (1997) Sexual transmission of HIV. *N Engl J Med* **336**: 1072-1078

- Ruff M, Krishnaswamy S, Boeglin M, Poterszman A, Mitschler A, Podjarny A, Rees B, Thierry JC, Moras D (1991) Class II aminoacyl tRNA synthetases: crystal structure of yeast aspartyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Asp}. *Science* **252**: 1682-1689
- Russell R, Hu J, Bériault V, Mouland A, Laughrea M, Kleiman L, Wainberg M, Liang C (2003) Sequences downstream of the 5' splice donor site are required for both packaging and dimerization of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Virol* **77**: 84-96
- Sacerdot C, Caillet J, Graffe M, Eyermann F, Ehresmann B, Ehresmann C, Springer M, Romby P (1998) The *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase gene contains a split ribosomal binding site interrupted by a hairpin structure that is essential for autoregulation. *Mol Microbiol* **29**: 1077-1090
- Sampath P, Mazumder B, Seshadri V, Gerber C, Chavatte L, Kinter M, Ting S, Dignam J, Kim S, Driscoll D, Fox P (2004) Noncanonical function of glutamyl-prolyl-tRNA synthetase: gene-specific silencing of translation. *Cell* **119**: 195-208
- Santiago M, Range F, Keele B, Li Y, Bailes E, Bibollet-Ruche F, Fruteau C, Noë R, Peeters M, Brookfield J, Shaw G, Sharp P, Hahn B (2005) Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Taï Forest, Côte d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. *J Virol* **79**: 12515-12527
- Sawyer R, Dahlberg J (1973) Small RNAs of Rous sarcoma virus: characterization by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and fingerprint analysis. *J Virol* **12**: 1226-1237
- Schimmel P, dePouplana LR (1999) Genetic code origins: Experiments confirm phylogenetic predictions and may explain a puzzle. *Proc Nat Acad Sci USA* **96**: 327-328
- Schüler W, Wecker K, de Rocquigny H, Baudat Y, Sire J, Roques B (1999) NMR structure of the (52-96) C-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr: molecular insights into its biological functions. *J Mol Biol* **285**: 2105-2117
- Schwartz S, Felber B, Fenyö E, Pavlakis G (1990) Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J Virol* **64**: 5448-5456
- Schwartz S, Felber B, Pavlakis G (1991) Expression of human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr mRNAs is Rev-dependent and regulated by splicing. *Virology* **183**: 677-686
- Schwartz S, Felber B, Pavlakis G (1992) Mechanism of translation of monocistronic and multicistronic human immunodeficiency virus type 1 mRNAs. *Mol Cell Biol* **12**: 207-219
- Shalak V, Guigou L, Kaminska M, Wautier M, Wautier J, Mirande M (2007) Characterization of p43(ARF), a derivative of the p43 component of multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex released during apoptosis. *J Biol Chem* **282**: 10935-10943

- Shalak V, Kaminska M, Mitnacht-Kraus R, Vandenabeele P, Clauss M, Mirande M (2001) The EMAPII cytokine is released from the mammalian multisynthetase complex after cleavage of its p43/proEMAPII component. *J Biol Chem* **276**: 23769-23776
- Sheehy A, Gaddis N, Choi J, Malim M (2002) Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**: 646-650
- Sheehy A, Gaddis N, Malim M (2003) The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* **9**: 1404-1407
- Sherman M, Greene W (2002) Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. *Microbes and Infection* **4**: 67-73
- Shiba K, Motegi H, Schimmel P (1997) Maintaining genetic code through adaptations of tRNA synthetases to taxonomic domains. *Trends Biochem Sci* **22**: 453-457
- Simos G, Sauer A, Fasiolo F, Hurt EC (1998) A conserved domain within Arc1p delivers tRNA to aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol Cell* **1**: 235-242
- Simos G, Segref A, Fasiolo F, Hellmuth K, Shevchenko A, Mann M, Hurt E (1996a) The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases. *EMBO J* **15**: 5437-5448
- Sprinzi M, Vassilenko K (2005) Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res* **33**: 139-140
- Stark L, Hay R (1998) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral protein R (Vpr) interacts with Lys-tRNA synthetase: implications for priming of HIV-1 reverse transcription. *J Virol* **72**: 3037-3044
- Stewart S, Poon B, Jowett J, Chen I (1997) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis following cell cycle arrest. *J Virol* **71**: 5579-5592
- Stove V, Van de Walle I, Naessens E, Coene E, Stove C, Plum J, Verhasselt B (2005) Human immunodeficiency virus Nef induces rapid internalization of the T-cell coreceptor CD8alpha-beta. *J Virol* **79**: 11422-11433
- Strebel K (2003) Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev. *AIDS* **17**: 25-34
- Strebel K (2007) HIV accessory genes Vif and Vpu. *Adv Pharmacol* **55**: 199-232
- Strebel K, Daugherty D, Clouse K, Cohen D, Folks T, Martin M (1987) The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* **328**: 728-730
- Tagliamonte M, Tornesello M, Buonaguro F, Buonaguro L (2011) Conformational HIV-1 Envelope on particulate structures: a tool for chemokine coreceptor binding studies. *J Transl med* **9**: 1-10

- Tan K, Liu J, Wang J, Shen S, Lu M (1997) Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 12303-12308
- Telesnitsky A, Goff S (1997) Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA. *Retroviruses Edited by: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE Cold Spring Harbor Laboratory Press*: 121-160
- Terada T, Nureki O, Ishitani R, Ambrogelly A, Ibba M, Söll D, Yokoyama S (2002) Functional convergence of two lysyl-tRNA synthetases with unrelated topologies. *Nat Struct Biol*: 257-262
- Tisné C (2005) Structural bases of the annealing of primer tRNA(3Lys) to the HIV-1 viral RNA. *Curr HIV Res* **3**: 147-156
- Tisné C, Rigour M, Marquet R, Ehresmann C, Dardel F (2000) NMR and biochemical characterization of recombinant human tRNA(Lys)₃ expressed in *Escherichia coli*: identification of posttranscriptional nucleotide modifications required for efficient initiation of HIV-1 reverse transcription. *RNA* **10**: 1403-1412
- Tisné C, Roques B, Dardel F (2001) Heteronuclear NMR studies of the interaction of tRNA(Lys)₃ with HIV-1 nucleocapsid protein. *J Mol Biol* **306**: 443-454
- Tisné C, Roques B, Dardel F (2004) The annealing mechanism of HIV-1 reverse transcription primer onto the viral genome. *J Biol Chem* **279**: 3588-3595
- Tolkunova E, Park H, Xia J, King M, Davidson E (2000) The human lysyl-tRNA synthetase gene encodes both the cytoplasmic and mitochondrial enzymes by means of an unusual alternative splicing of the primary transcript. *J Biol Chem* **275**: 35063-35069
- Tristem M, Purvis A, Quicke D (1998) Complex evolutionary history of primate lentiviral vpr genes. *Virology* **240**: 232-237
- Trono D (1992) Partial reverse transcripts in virions from human immunodeficiency and murine leukemia viruses. *J Virol* **66**: 4893-4900
- Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson R, Mitchell R, Johnson M, Stephens E, Guatelli J (2008) The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe* **3**: 245-252
- Van Maele B, Debysse Z (2005) HIV-1 integration: an interplay between HIV-1 integrase, cellular and viral proteins. *AIDS Rev* **7**: 26-43
- Van Wamel J, Berkhout B (1998) The first strand transfer during HIV-1 reverse transcription can occur either intramolecularly or intermolecularly. *Virology* **244**: 245-251
- Visier L (2005) Quelques aspects d'histoire sociale du SIDA. *Médecine, Maladie, Société Les maladies infectieuses Sauramps médical*: 87-105

- Wahab S, Yang D (1985) Influence of supramolecular structure on the enzyme mechanisms of rat liver lysyl-tRNA synthetase-catalyzed reactions. Synthesis of P1,P4-bis(5'-adenosyl)tetrphosphate. *J Biol Chem* **260**: 12735-12739
- Wain-Hobson S, Sonigo P, Danos O, Cole S, Alizon M (1985) Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* **40**: 9-17
- Wakasugi K, Schimmel P (1999a) Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science* **284**: 147-151
- Wakasugi K, Schimmel P (1999b) Highly differentiated motifs responsible for two cytokine activities of a split human tRNA synthetase. *J Biol Chem* **274**: 23155-23159
- Waters L, Mullin B (1977) Transfer RNA into RNA tumor viruses. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **20**: 131-160
- Waters L, Mullin B, Ho T, Yang W (1975) Ability of tryptophan tRNA to hybridize with 35S RNA of avian myeloblastosis virus and to prime reverse transcription in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 2155-2159
- Wei P, Garber M, Fang S, Fischer W, Jones K (1998) A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* **92**: 451-462
- Weissenhorn W, Dessen A, Harrison S, Skehel J, Wiley D (1997) Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**: 426-430
- Wills J, Craven R (1991) Form, function, and use of retroviral gag proteins. *AIDS* **5**: 639-654
- Wlodawer A, Erickson J (1993) Structure-based inhibitors of HIV-1 protease. *Annu Rev Biochem* **62**: 543-585
- Wolf Y, Aravind L, Grishin N, Koonin E (1999) Evolution of aminoacyl-tRNA synthetases - Analysis of unique domain architectures and phylogenetic trees reveals a complex history of horizontal gene transfer events. *Genome Res* **9**: 689-710
- Wolfe C, Warrington J, Treadwell L, Norcum M (2005) A three-dimensional working model of the multienzyme complex of aminoacyl-tRNA synthetases based on electron microscopic placements of tRNA and proteins. *J Biol Chem* **280**: 38870-38878
- Yannay-Cohen N, Carmi-Levy I, Kay G, Yang C, Han J, Kemeny D, Kim S, Nechushtan H, Razin E (2009) LysRS serves as a key signaling molecule in the immune response by regulating gene expression. *Mol Cell* **34**: 603-611
- Yedavalli V, Shih H, Chiang Y, Lu C, Chang L, Chen M, Chuang C, Dayton A, Jeang K, Huang L (2005) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts with antiapoptotic mitochondrial protein HAX-1. *J Virol* **79**: 13735-13746
- Yoder K, Bushman F (2000) Repair of gaps in retroviral DNA integration intermediates. *J Virol* **74**: 11191-11200

- Zaitseva L, Myers R, Fassati A (2006) tRNAs promote nuclear import of HIV-1 intracellular reverse transcription complexes. *PLoS Biol* **332**: 1689-1706
- Zennou V, Petit C, Guetard D, Nerhbass U, Montagnier L, Charneau P (2000) HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* **101**: 173-185
- Zhang C, Hou Y (2005) Domain-domain communication for tRNA aminoacylation: The importance of covalent connectivity. *Biochemistry* **44**: 7240-7249
- Zhang H, Pomerantz R, Dornadula G, Sun Y (2000) Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is an integral component of an mRNP complex of viral RNA and could be involved in the viral RNA folding and packaging process. *J Virol* **74**: 8252-8261
- Zhang H, Zhang Y, Spicer T, Henrard D, Poiesz BJ (1995) Nascent human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription occurs within an enveloped particle. *J Virol* **69**: 3675-3682
- Zhao R, Elder R, Bukrinsky M (2007) Interactions of HIV-1 viral protein R with host cell proteins. *Adv Pharmacol* **55**: 233-260
- Zhao Y, Cao J, O'Gorman MR, Yu M, Yogev R (1996) Effect of human immunodeficiency virus type 1 protein R (vpr) gene expression on basic cellular function of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Virol* **70**: 5821-5826.

◆ Résumé

Le complexe d'encapsidation de l'ARNt₃^{Lys} dans les particules du VIH-1 implique la lysyl-ARNt synthétase mitochondriale (mLysRS) de la cellule hôte et le précurseur viral polyprotéique GagPol. Les domaines IN et TF de Pol forment une pince moléculaire qui séquestre le domaine catalytique de la forme maturée de mLysRS. Vpr ou Rev se lient à mLysRS à des étapes distinctes du cycle viral.

◆ Mots clés

Lysyl-ARNt synthétase, mitochondrie, VIH-1, encapsidation ARNt₃^{Lys}, GagPol.

◆ Le nom du laboratoire de rattachement

Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales. UPR3082. Campus CNRS Gif-sur-Yvette.

PÔLE : INGENIERIE DES PROTEINES ET CIBLES THERAPEUTIQUES

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex