

2M11.2644.5

Université de Montréal

Étude d'un déphasage programmé du cadre de lecture chez *Escherichia coli*

par

Marie-Noëlle Brunelle

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en biochimie

Juillet 1998

© Marie-Noëlle Brunelle, 1998



2-ppw6jmg

W

4

058

1998

v.093

Department of Mathematics

Department of Mathematics
University of Michigan

Michigan University
Department of Mathematics
48106-1103



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:
"Étude d'un déphasage programmé du cadre de lecture chez *Escherichia coli*"

présenté par
Marie-Noëlle Brunelle

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Stephen Michnick : président-rapporteur
Léa Brakier-Gingras : directeur de recherche
Luis A. Rokeach : membre du jury

Mémoire accepté le: 3 septembre 1998.

SOMMAIRE

Au cours de la traduction, le cadre de lecture du RNA messager (mRNA) peut être modifié en réponse à certains signaux spécifiques du mRNA. Le changement programmé du cadre de lecture d'une base en direction 5' ("frameshift" programmé - 1) est un moyen de régulation de l'expression des gènes employé par certains virus, et quelques gènes bactériens. Ainsi, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), utilise le "frameshift" programmé - 1 pour contrôler l'expression du précurseur des activités enzymatiques virales, la protéine de fusion "Gag-Pol". Cette protéine est indispensable à la réplication du virus. Le changement de cadre de lecture s'effectue au niveau d'une séquence spécifique du mRNA, dite site de "frameshift", qui comporte une séquence glissante suivie à une courte distance d'une structure secondaire stimulatrice. D'après le modèle du glissement simultané proposé par le groupe de Varmus (Jacks *et al.*, 1988b), le ribosome, et les deux RNA de transfert (tRNA) qui lui sont liés, glissent simultanément d'un nucléotide en direction 5' lorsqu'ils arrivent au site de "frameshift". Ce glissement a lieu alors que le peptidyl-tRNA et l'aminocyl-tRNA (aa-tRNA) sont respectivement aux sites donneur et accepteur du ribosome.

Le but de notre projet de recherche est de raffiner le modèle de Varmus. On sait que lorsque l'aa-tRNA occupe le site accepteur, le lien peptidique se forme très rapidement, ce qui ne laisserait guère de temps au ribosome pour changer de cadre de lecture. Nous avons proposé comme hypothèse de travail que le glissement du ribosome s'effectuerait avant que l'aa-tRNA n'occupe le site accepteur, c'est-à-dire pendant qu'il occupe le site d'entrée sur le ribosome. Dans un premier temps, nous avons reproduit *in vitro* le "frameshift" programmé - 1 du VIH dans un extrait acellulaire d'*Escherichia coli*. Nous avons modifié un gène rapporteur, le gène de la chloramphénicol acétyltransférase (CAT), contenu dans un plasmide dérivé de Bluescript, et placé sous contrôle du promoteur du phage T7. La modification consiste en l'insertion, au début de la région codante de la protéine CAT, de la séquence du génome du VIH-1 contenant le site de "frameshift", c'est-à-dire la séquence glissante et la structure secondaire stimulatrice qui est une tige-boucle dans le cas du VIH-

1. Avec une telle construction, seuls les ribosomes qui changent de cadre de lecture produisent la protéine CAT. Une construction témoin a également été réalisée. Cette construction est identique à la première, excepté qu'elle contient une base supplémentaire à la base de la tige-boucle. Il s'en suit que la protéine CAT est produite uniquement par les ribosomes qui ne changent pas de cadre de lecture. Les deux constructions ont été transcrites *in vitro* par la T7 RNA polymérase, et les messagers ainsi obtenus traduits dans l'extrait S30 en présence de [³⁵S]méthionine. Les produits de traduction ont été séparés par SDS-PAGE, puis les gels ont été autoradiographiés. L'efficacité du "frameshift" programmé - 1 a été évaluée par mesure de la quantité de protéine CAT produite avec les deux constructions, cette mesure ayant été effectuée par analyse densitométrique des bandes correspondant à cette protéine. L'efficacité du "frameshift" a été évaluée à environ 10 %, ce qui est en parfait accord avec des données de la littérature où le "frameshift" programmé du VIH était reproduit *in vitro*, mais dans un système de traduction eucaryote.

Nous avons ensuite utilisé le même système de traduction acellulaire pour évaluer l'efficacité du "frameshift" programmé - 1 du VIH en présence de différents antibiotiques aminoglycosidés, qui perturbent spécifiquement des étapes distinctes de la synthèse protéique. Ces antibiotiques accélèrent l'occupation du site accepteur du ribosome par l'aa-tRNA, ralentissent la translocation, et déstabilisent la liaison du peptidyl-tRNA au site donneur. Nos résultats supportent notre modèle de départ, selon lequel le glissement du ribosome a lieu alors que l'aa-tRNA occupe un site d'entrée du ribosome, préalablement à l'occupation du site accepteur. Cependant, ils suggèrent aussi que le "frameshift" programmé - 1 du VIH peut également avoir lieu avant même que l'aa-tRNA n'interagisse avec le ribosome au site d'entrée, lorsqu'il n'y a qu'un seul tRNA lié au ribosome, le peptidyl-tRNA situé au site donneur.

Table des Matières

	Page
Sommaire	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des abbréviations	xiii
Remerciements	xvi
Chapitre I – Introduction	1
1.1 Le ribosome et la fidélité de lecture	3
1.1.1 Les étapes de la synthèse protéique	3
1.1.1.1 L'élongation chez les procaryotes	4
1.1.1.2 L'élongation chez les eucaryotes	8
1.1.2 La fidélité de traduction	9
1.1.2.1 Le maintien de la fidélité de lecture	9
1.1.2.2 Le maintien du cadre de lecture	11
1.1.2.2.1 Mécanismes du maintien du cadre de lecture	12
1.1.2.2.2 Perturbations occasionnelles du cadre de lecture	12
1.2 Les "frameshifts" programmés	13
1.2.1 Définition et distribution des "frameshifts" programmés	14
1.2.2 Fonctions des "frameshifts" programmés	15
1.2.2.1 Exemple d'autorégulation de gène: cas du gène <i>prfB</i>	15

1.2.2.2 Production d'activités enzymatiques alternatives: cas du gène <i>dnaX</i> d' <i>E. coli</i>	18
1.2.2.3 Production d'activités catalytiques: exemple de la production de la protéine de fusion "Gag-Pol" du VIH	19
1.2.2.4 Avantages procurés aux rétrovirus par le "frameshift" programmé	22
1.2.3 Etude des "frameshifts" programmés	23
1.3 Le "frameshift" programmé – 1	24
1.3.1 Le "frameshift" programmé - 1 chez les eucaryotes	24
1.3.1.1 Le site de "frameshift" programmé –1	24
1.3.1.1.1 La séquence glissante	25
1.3.1.1.2 Les structures secondaires de RNA stimulatrices du "frameshift" programmé	27
1.3.1.1.2.1 Les pseudo-noeuds	27
1.3.1.1.2.2 La tige-boucle	30
1.3.1.2 Les modèles de "frameshift" programmé – 1	34
1.3.2 Le "frameshift" programmé -1 chez les procaryotes	38
1.4 But du projet de recherche	41
Chapitre 2 - Matériel et méthodes	44
2.1 Souches bactériennes, enzymes et produits chimiques	45
2.2 Tampons	46

2.3 Construction des vecteurs pCPCAT(-1) et pCPCAT(0)	47
2.4 Transcription <i>in vitro</i>	49
2.4.1 Préparation de la RNA polymérase du phage T7	49
2.4.2 Transcription <i>in vitro</i> du gène CAT	50
2.5 Préparation de l'extrait bactérien S30	51
2.5.1 Culture cellulaire et préparation des extraits	51
2.5.2 Préincubation de l'extrait S30	53
2.5.3 Optimisation de l'extrait S30	53
2.6 Traduction <i>in vitro</i> dans l'extrait S30	54
2.7 Quantification de l'efficacité du "frameshift" programmé -1	55
2.7.1 Détermination de la quantité de protéine CAT produite par test immunologique	56
2.7.2 Dosage de l'activité enzymatique de la protéine CAT	56
2.7.3 Quantification de la protéine CAT marquée à la [³⁵ S]méthionine après séparation des produits de la traduction sur SDS-PAGE	58
Chapitre 3 – Résultats	60
3.1 Construction des vecteurs contenant le gène rapporteur CAT en vue de l'étude du "frameshift" programmé -1 ribosomique	61
3.2 Production des RNA messagers codant pour la protéine CAT	64
3.3 Préparation et optimisation de l'extrait bactérien S30	65
3.3.1 Préparation de l'extrait S30	65
3.3.2 Caractérisation des extraits S30 obtenus	66

3.3.3 Optimisation des extraits S30	69
3.4 Mesure de l'efficacité du "frameshift" programmé -1 du VIH-1 dans l'extrait S30	71
3.5 Effet d'antibiotiques sur le "frameshift" programmé -1 du VIH-1	73
Chapitre 4 – Discussion	76
4.1 Reproduction du "frameshift" programmé - 1 du VIH-1 dans un extrait acellulaire d' <i>E. coli</i>	80
4.2 Analyse de l'effet des antibiotiques sur l'efficacité du "frameshift" programmé - 1	81
4.2.1 L'effet de la néamine sur le "frameshift" programmé -1 permet de raffiner le modèle du glissement simultané	82
4.2.2 Le double effet de la streptomycine sur le "frameshift" programmé -1	85
4.3 Conclusions et perspectives	87
Références	90

Liste des Tableaux

	page
Tableau I-I Exemples de composition de ribosomes	5
Tableau I-II Distribution des "frameshifts" programmés à travers les organismes	16
Tableau I-III Exemples de sites de "frameshift" programmés - 1 de virus à RNA	26
Tableau III-I Exemple de fiche signalétique d'un extrait S30	67

Liste des Figures

	page
Figure 1-1: Modèle du cycle d'élongation de la traduction chez les procaryotes	6
Figure 1-2: Modèle cinétique du maintien de la fidélité de lecture	10
Figure 1-3: Exemples de "frameshifts" programmés:	
A. Modèle de régulation de l'expression du gène bactérien du RF2, un exemple d'autorégulation de gène par un "frameshift" programmé ribosomique + 1	17
B. Modèle de régulation de l'expression du gène <i>dnaX</i> , un exemple de production d'activités enzymatiques alternatives par un "frameshift" programmé - 1	20
C. Production de la protéine de fusion "Gag-Pol" du VIH, un exemple de production d'activités catalytiques par un "frameshift" programmé -1	21
Figure 1-4: Modèles de pseudo-noeuds stimulateurs du "frameshift" programmé - 1	
A. Exemple du pseudo-noeud du VTMS	28
a) Représentation graphique	
b) Modèle atomique de la structure tridimensionnelle	

	B. Exemple du pseudo-noeud APKA27G: vue stéréoscopique de la structure du pseudo-noeud	31
Figure 1-5:	Site de "frameshift" du VIH	32
	A. Séquence du site de "frameshift" du mRNA pleine longueur du VIH	
	B. Représentation du site de "frameshift" du VIH montrant le repliement de la séquence palindromique en tige-boucle	
Figure 1-6:	Modèle du mécanisme du glissement simultané selon Jacks <i>et al.</i> (1988b)	35
Figure 1-7:	Modèle du mécanisme du glissement simultané selon Horsfield <i>et al.</i> (1995)	37
Figure 1-8:	Modèle de mécanisme impliquant le glissement d'un seul tRNA (Yelverton <i>et al.</i> , 1994)	39
Figure 2-1:	Séquence des cassettes de DNA synthétique utilisées pour la construction des vecteurs possédant une insertion au début de la séquence codante du gène CAT	48
Figure 2-2:	Principe du CAT-ELISA	57
Figure 3-1:	Construction des vecteurs contenant le gène rapporteur CAT modifié en vue de l'étude du "frameshift" programmé - 1 ribosomique	62
Figure 3-2:	Caractéristiques des vecteurs contenant le gène rapporteur CAT avec l'insertion responsable du "frameshift" programmé - 1 au début de la région codante	63

Figure 3-3:	Profil de sédimentation d'un échantillon d'extrait acellulaire bactérien S30	68
Figure 3-4:	Exemple d'optimisation de la concentration en ions magnésium pour la traduction dans un extrait acellulaire bactérien	70
Figure 3-5:	Reproduction du "frameshift" programmé - 1 du VIH-1 dans un extrait bactérien S30	72
Figure 3-6:	Effet d'antibiotiques sur le "frameshift" programmé du VIH	75
Figure 4-1:	Structure des antibiotiques utilisés pour l'étude du mécanisme du "frameshift" programmé - 1 du VIH	79
Figure 4-2:	Raffinement du modèle du glissement simultané	83

Liste des sigles et des abréviations

A	Adénine
aa-tRNA	Aminoacyl-tRNA
ATP	Adénosine triphosphate
C	Cytosine
CAT	Chloramphénicol acétyltransférase
DNA	Acide désoxyribonucléique
DNAse	Désoxyribonucléase
D.O.	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acide éthylènediamine tétra-acétique
eEF-1	Facteur d'élongation eucaryote 1
eEF-2	Facteur d'élongation eucaryote 2
EF-1 α	Facteur d'élongation 1 α de la levure
EF-G	Facteur d'élongation procaryote G
EF-Tu	Facteur d'élongation procaryote Tu
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay
ex.	Exemple
F	Phénylalanine
Fig.	Figure
G	Guanine
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
Hepes	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthanesulfonique
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
IS	Séquence d'insertion
kDa	kilo Dalton

L	Leucine
LB	Luria-Bertani
mRNA	RNA messenger
Néa	Néamine
nt	Nucléotide
N-terminale	Extrémité NH ₂ de la protéine
NTP	Ribonucléosides 5' triphosphates
PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
PAP	Protéine antivirale du "pokeweed"
pb	Paires de bases
PEG	Polyéthylène glycol
PEP	Phosphoénol pyruvate
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
p/v	Poids par volume
R	Arginine
RF2	Facteur de terminaison 2 ("Release factor" 2)
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RNA	Acide ribonucléique
RNAse	Ribonucléase
rRNA	RNA ribosomique
S	Svedberg (1 S = 10 ⁻¹³ seconde)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Shine-Dalgarno
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SIDA	Syndrôme d'immunodéficience acquise
site A	Site accepteur du ribosome
site E	Site de sortie ("Exit") du ribosome
site P	Site peptidyle ou donneur du ribosome
site T	Site transitoire ou d'entrée du ribosome
Sm	Streptomycine

snoRNA	Petit RNA nucléolaire ("small nucleolar RNA")
Sp	Spectinomycine
TCA	Acide trichloroacétique
Tris	Tris(hydroxyl)aminométhane
tRNA	RNA de transfert
U	Uracile
UV	Ultra-violet
VBI	Virus de la bronchite infectieuse du poulet
VHLT-II	Virus humain de la leucémie des cellules T de type II
VIH-1	Virus de l'immunodéficience humaine de type I
VIH-2	Virus de l'immunodéficience humaine de type 2
VSR	Virus du sarcome de Rous
VTMS	Virus de la tumeur mammaire de la souris

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Dr. Léa Brakier-Gingras de m'avoir accueillie dans son laboratoire, de m'avoir ainsi permis de découvrir le monde du ribosome et de ses facéties, et de me l'avoir fait apprécier. Merci aussi pour votre grande disponibilité, vos conseils et toute l'aide que vous m'avez apportée tout au long de ma maîtrise.

Je voudrais également remercier mes collègues passés et actuels du laboratoire du ribosome. Merci à Pierre Melançon et à Catherine Payant de leur patience, de leur aide et de leurs conseils si précieux. Merci à Catherine Spickler de m'avoir initié aux joies du pipetman et de l'ordinateur. Merci aux garçons, et plus particulièrement à Alex et Francis, d'avoir tenté de me faire comprendre la psychologie d'un ordinateur, et d'avoir si souvent joué les diplomates en cas de déclaration de guerre informatique (l'ordinateur vous remercie aussi de lui avoir sauvé la vie plus d'une fois). Merci également à Martin Beaulieu pour ses conseils et son soutien, et à Dominic pour son aide. Vous avez été / êtes tous de merveilleux collègues de travail, mais je voudrais également vous remercier d'avoir été ma famille québécoise pendant ces deux années, de m'avoir fait aimer votre pays, et d'être devenus mes amis.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans un énorme merci à mes parents. Merci de m'avoir laissée partir voir ce qu'il y avait de ce côté-ci de l'Atlantique, et surtout merci de m'avoir constamment soutenue et encouragée depuis toujours dans toutes mes entreprises.

Finalement, je voudrais remercier le FCAR (Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche) et le CRM (Conseil de Recherches Médicales du Canada) pour leur soutien financier.

Chapitre I

-Introduction-

L'expression des gènes comporte deux grandes étapes, la transcription du DNA en RNA messenger (mRNA), qui est effectuée par une RNA polymérase-DNA-dépendante, et la traduction du messenger en protéines. C'est le ribosome, un complexe ribonucléoprotéique, qui assure la synthèse des protéines dans tous les organismes. Les protéines remplissant la quasi-totalité des fonctions cellulaires, le ribosome a évolué de manière à établir un compromis entre vitesse de production et fidélité de traduction afin de répondre aux besoins des cellules. Différents mécanismes de contrôle de la fidélité de traduction lui permettent de minimiser les erreurs commises au cours de l'élongation de la traduction. Le ribosome est donc devenu un véritable bolide traductionnel capable de rajouter, dans les cellules mammifères, 3 à 6 résidus par seconde à un polypeptide en croissance (Hershey, 1991) tout en ayant un taux d'erreurs limité à environ 5×10^{-4} erreurs par acide aminé incorporé.

Au cours de l'élongation, le ribosome commet essentiellement trois types d'erreurs: les erreurs de sens qui consistent en une mauvaise sélection du tRNA aminoacylé lors de la lecture d'un codon, les erreurs de processivité qui conduisent à une terminaison précoce de la traduction, et les changements de cadre de lecture. Une minorité de gènes semblent s'être inspirés de ces erreurs accidentelles pour déjouer les règles conventionnelles du décodage lors de la traduction de leurs messagers. C'est ce que l'on appelle le "recoding". Ce phénomène est largement réparti à travers les organismes, et repose sur le fait que l'information apportée par le messenger ne se limite pas au simple décodage de la séquence nucléotidique. Certains gènes ont évolué de manière à intégrer dans la séquence de leur messenger des signaux capables de transformer le ribosome en véritable acrobate.

Trois catégories de "recoding" sont connues à l'heure actuelle. Dans la première catégorie appelée "readthrough", la signification de certains codons stop spécifiques est modifiée de telle sorte qu'ils permettent l'incorporation de sélénocystéine, de tryptophane, ou de glutamine. La deuxième catégorie correspond à des changements de cadre de lecture programmés ("frameshifts" programmés). Ici, le ribosome glisse d'un nucléotide vers la droite ("frameshift" +1), ou vers la gauche ("frameshift" -1), ce qui l'amène dans un nouveau cadre de lecture où il poursuit la lecture du messenger jusqu'au prochain codon stop. La troisième et dernière catégorie de "recoding" correspond à des sauts du ribosome,

c'est-à-dire que le ribosome peut passer d'un point du messenger à un autre sans lire la séquence qui les sépare. Ainsi, dans le cas de la traduction du mRNA du gène 60 du bactériophage T4, qui code pour une sous-unité de la topoisomérase, le ribosome fait un saut de 50 nucléotides.

La première section de cette introduction présente un bref rappel des étapes de la traduction et des mécanismes employés par le ribosome pour maintenir la fidélité de traduction. Les sections suivantes seront consacrées à la deuxième catégorie de "recoding", le "frameshift" programmé, et plus particulièrement au "frameshift" programmé -1, qui est l'objet de notre projet de recherche.

1.1 LE RIBOSOME ET LA FIDÉLITÉ DE LECTURE

Le ribosome, organe cellulaire responsable de la traduction des RNA messagers en protéines, est aussi complexe au niveau structural qu'au niveau fonctionnel. Constitué de deux sous-unités, le ribosome est un complexe ribonucléoprotéique comportant 3 RNA ribosomiques (rRNA), et plus de 50 protéines différentes chez les procaryotes, ou 4 rRNA et plus de 80 protéines différentes dans le cas des ribosomes eucaryotes (Tableau I-I). Afin d'assurer sa fonction dans la traduction, le ribosome doit fournir des sites de liaisons spécifiques pour le mRNA, les RNA de transfert (tRNA), et les différents facteurs de traduction. De plus, il catalyse la formation du lien peptidique, stabilise l'interaction codon-anticodon, et doit maintenir le cadre de lecture du messenger. Le ribosome, au cours des différentes étapes de la synthèse protéique, garantit donc la fidélité de lecture du messenger essentielle au fonctionnement de toute cellule procaryote ou eucaryote.

1.1.1 LES ÉTAPES DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE

Chez les procaryotes, tout comme chez les eucaryotes, la traduction d'un mRNA en protéine est une pièce de théâtre qui se joue en trois actes: l'initiation, l'élongation et la terminaison. Alors que les mécanismes de l'élongation et de la terminaison (revue dans Buckingham *et al.*, 1997) sont similaires, celui de l'initiation est plus complexe chez les

eucaryotes que chez les procaryotes (revue dans Londei, 1998). L'intrigue du "frameshift" programmé survenant au cours de l'élongation de la chaîne polypeptidique, voici un rappel des événements qui se déroulent habituellement durant cette étape de la synthèse protéique.

1.1.1.1 L'élongation chez les procaryotes

Une vue d'ensemble du mécanisme de l'élongation (Fig. 1-1) justifie l'appellation de "cycle de l'élongation". En effet, une chaîne polypeptidique naissante s'allongeant d'un acide aminé à la fois, son élongation consiste donc en une série de cycles successifs au cours desquels tous les composants du système, à l'exception des acides aminés, sont recyclés afin d'être réutilisés dans les cycles ultérieurs. Chaque cycle de l'élongation comprend trois sous-étapes.

Selon le modèle traditionnel proposé par Watson en 1964, la première sous-étape de l'élongation a pour but de sélectionner un tRNA aminoacylé (aa-tRNA) correspondant au codon devant être lu sur le messager. Tout d'abord, un aa-tRNA se lie à un facteur d'élongation Tu (EF-Tu), lui-même lié à une molécule de GTP, pour former un complexe ternaire. Ce complexe ternaire interagit avec le ribosome au site accepteur (site A) du site de décodage localisé sur le rRNA 16S de la sous-unité 30S, et va être testé selon la complémentarité des bases de l'anticodon de l'aa-tRNA, et du codon à lire sur le mRNA. Si le complexe ternaire ne convient pas, il est rejeté. Dans le cas contraire, le GTP est hydrolysé en GDP, le complexe EF-Tu•GDP se dissocie du ribosome, et l'aa-tRNA occupe le site A qui s'étend sur les deux sous-unités ribosomiques. Le complexe EF-Tu•GDP est ensuite régénéré en EF-Tu•GTP par l'intermédiaire du facteur d'élongation Ts, et peut lier un nouvel aa-tRNA. De son côté, l'aa-tRNA lié au site A va subir la deuxième sous-étape de l'élongation, c'est-à-dire la formation du lien peptidique. Lors de cette sous-étape, le polypeptide en croissance porté par le tRNA ayant décodé le codon précédent, et maintenant situé au site donneur du site de décodage (site P), va être transféré sur le groupement amino de l'aa-tRNA localisé au site A. Ce transfert s'accompagne de la

Tableau I-I: Exemples de composition de ribosomes (d'après Voet et Voet, second edition, 1995)

	Constante de sédimentation		Protéines	
	Eucaryote ^a	Procaryote ^b	Eucaryote ^a	Procaryote ^b
Ribosome	80S	70S		
Petite sous-unité ribosomique	40S	30S	33 (S1 à S33)	21 (S1 à S21)
Grande sous-unité ribosomique	60S	50S	49 (L1 à L49)	32 (L1 à L34 ^c)
rRNA de la petite sous-unité ribosomique	18S (1874 nt)	16S (1542 nt)		
rRNA de la grande sous-unité ribosomique	- 28S (4718 nt) - 5,8S (160 nt) - 5S (120 nt)	- 23S (2904 nt) - 5S (120 nt)		

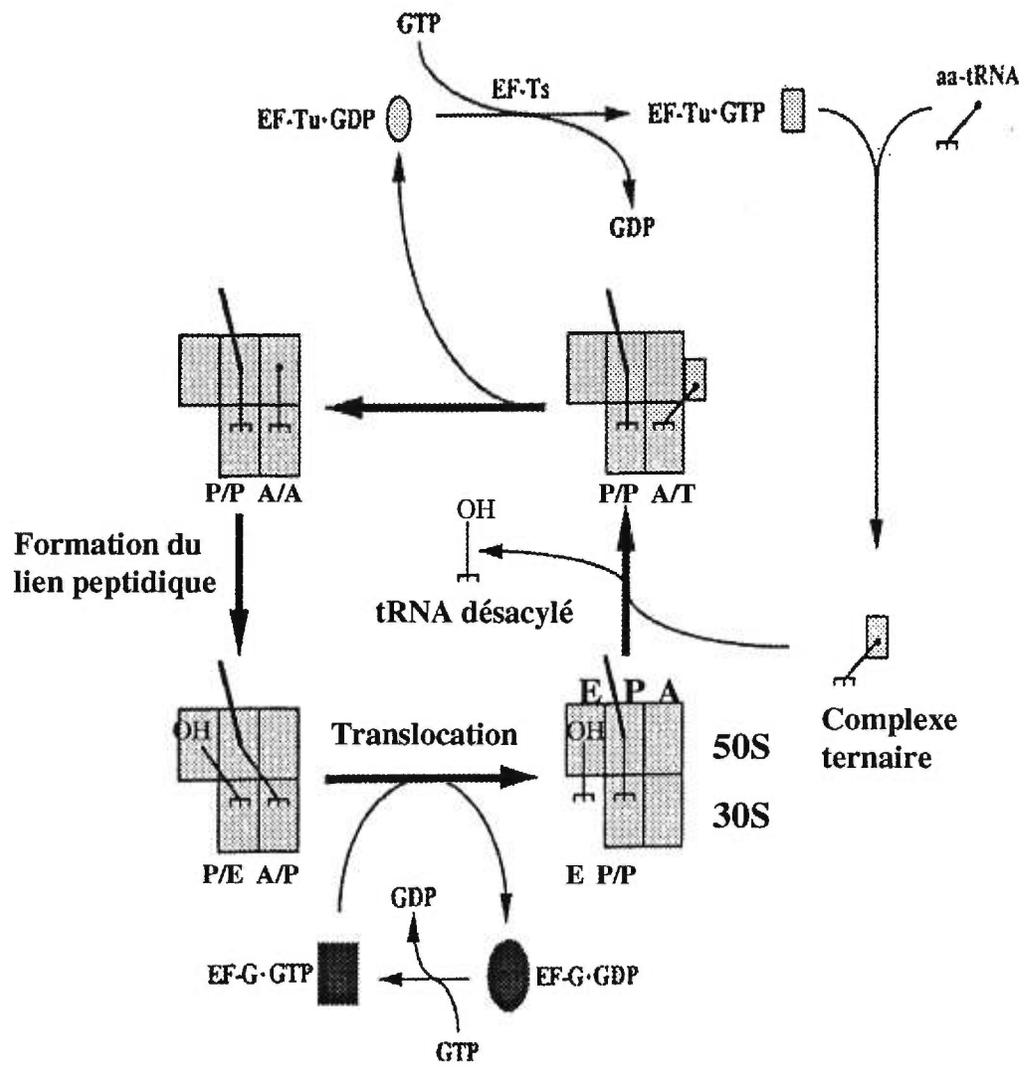
a: Les données correspondent aux ribosomes de foie de rat.

b: Les données correspondent aux ribosomes d'*E. coli*.

c: Les ribosomes ne comporte qu'une molécule de chaque protéine, à l'exception des protéines L7 et L12 qui sont présentes en deux exemplaires.

Figure 1-1: Modèle du cycle d'élongation de la traduction chez les procaryotes.

Les ribosomes sont schématisés de manière à représenter la liaison des tRNA selon le modèle des sites hybrides proposé par Moazed et Noller (1989b). La sous-unité 50S (en haut) comporte trois rectangles, et la sous-unité 30S (en bas) en comporte deux. Le site T est le site d'entrée du ribosome localisé sur la sous-unité 50S, les sites A et P sont respectivement les sites accepteurs et donneurs des sous-unités ribosomiques, le site E est le site de sortie situé sur la sous-unité 50S. Les tRNA sont représentés par une fourche, la partie fourchue symbolisant la boucle de l'anticodon. Le polypeptide en croissance est représenté par un trait incliné. L'état de liaison des tRNA par rapport à chacune des sous-unités ribosomiques est indiqué sous chaque dessin du ribosome, A/P indiquant, par exemple, que l'anticodon du tRNA interagit avec le site A de la sous-unité 30S, et que son extrémité 3' terminale interagit avec le site P de la sous-unité 50S. Tiré de Kurland *et al.* (1996).



formation du lien peptidique catalysée par l'activité peptidyl-transférase de la sous-unité 50S. Au cours de la troisième et dernière sous-étape du cycle de l'élongation, le nouveau peptidyl-tRNA, lié au mRNA par l'interaction codon-anticodon, va se déplacer avec le mRNA du site A au site P du centre de décodage du ribosome. Quant au tRNA désaminoacylé, il quitte le site P pour se diriger vers la sortie du ribosome, et être libéré. Ce mouvement de translocation libère donc le site A, positionne le prochain codon dans la fenêtre de lecture du site de décodage, et permet ainsi de réinitier le cycle de l'élongation. La translocation est catalysée par le facteur d'élongation G (EF-G), et nécessite l'énergie libérée par l'hydrolyse d'une molécule de GTP, liée à EF-G, en GDP. Le complexe EF-G•GTP est ensuite régénéré afin de préparer les futures translocations (revue dans Kurland *et al.*, 1996).

Cette description du mécanisme de l'élongation, basée sur l'existence de trois sites de liaison des tRNA sur le ribosome présente une vue un peu simpliste du mécanisme de l'élongation. En effet, deux raffinements majeurs peuvent être apportés à ce modèle. Tout d'abord, il s'avère qu'il n'y a pas trois, mais quatre sites de liaison des tRNA sur le ribosome (Rheinberger *et al.*, 1981). Le quatrième site, appelé site E pour "exit", est localisé sur la sous-unité 50S (revue dans Wilson et Noller, 1998), et serait le dernier site d'interaction du tRNA désacylé avec le ribosome avant de le quitter. D'autre part, des attaques chimiques de ribosomes liés à des tRNA ont révélé que les tRNA protégeaient des bases spécifiques des rRNA (Moazed et Noller, 1986, 1989a). D'après ces résultats, un même tRNA pourrait être lié simultanément par son anticodon à l'un des sites de la sous-unité 30S (site A ou P), et par son extrémité CCA terminale à un site différent de la 50S (site P, ou E). L'interprétation de ces données a conduit à un modèle du mécanisme de l'élongation dit à "sites hybrides" (Moazed et Noller, 1989b). A la fin d'un cycle d'élongation, le peptidyl-tRNA est situé au site P/P, qui correspond au site P classique, et le site A/A, correspondant au site A classique, est libre. Lorsque le complexe ternaire se fixe sur le ribosome, il se place d'abord au site d'entrée du ribosome, dit site A/T, c'est-à-dire que l'anticodon de l'aa-tRNA se lie au site A de la sous-unité 30S, alors que son extrémité CCA terminale est liée à un site autre que le site A de la sous-unité 50S, appelé

site T. En fait, l'extrémité CCA terminale de l'aa-tRNA est liée à EF-Tu, lui-même lié à un site spécifique de la sous-unité 50S. Dans le cas d'un aa-tRNA correct, ce dernier se place au site A/A suite à l'hydrolyse du GTP et au relargage du complexe EF-Tu•GDP. Puis l'extrémité CCA terminale de l'aa-tRNA passe au site P de la sous-unité 50S, le lien peptidique se forme, et la tige du tRNA désacylé passe au site E de la 50S. Donc, après la formation du lien peptidique, le nouveau peptidyl tRNA se retrouve au site A/P, c'est-à-dire que son anticodon est au site A de la 30S, alors que son extrémité CCA terminale est au site P de la 50S. Quant au tRNA désacylé, son anticodon est au site P de la 30S, et son extrémité CCA terminale est au site E de la 50S; ceci le place donc dans un site P/E. Pour finir le cycle d'élongation, le complexe EF-G•GTP induit la translocation qui amène le peptidyl-tRNA au site P/P, et le tRNA désacylé au site E. Il est à noter que les déplacements dans les sites hybrides sont spontanés, et se font indépendamment de EF-G et du GTP. Les données apportées par les diverses études menées depuis 1989 sur l'élongation ont permis de raffiner le modèle des "états hybrides" (revue dans Wilson et Noller, 1998).

1.1.1.2 L'élongation chez les eucaryotes

Les mécanismes du cycle de l'élongation chez les eucaryotes et chez les procaryotes sont analogues, seuls les facteurs d'élongation diffèrent. Ainsi, chez les eucaryotes, les fonctions de EF-Tu sont assumées par les deux sous-unités qui constituent le facteur d'élongation eEF-1. Le facteur eEF-2, quant à lui, est équivalent au facteur EF-G. Il est cependant à noter que les facteurs d'élongation procaryotes et eucaryotes ne sont pas interchangeables, et qu'il existe un troisième facteur d'élongation chez certaines espèces de champignons inférieurs qui pourrait jouer un rôle dans le mécanisme assurant la fidélité de lecture chez la levure (revue dans Proud, 1994).

1.1.2 LA FIDÉLITÉ DE TRADUCTION

La fidélité de traduction d'un mRNA est assurée par un mécanisme similaire chez les eucaryotes et chez les procaryotes (Proud, 1994), mais les données qui vont suivre dépeignent la situation chez les procaryotes. Afin de répondre aux besoins de la cellule, le ribosome doit optimiser son efficacité de traduction, et sa précision de lecture du messenger. Ces deux objectifs étant antagonistes, mais néanmoins interdépendants, le ribosome commet différents types d'erreurs, tout en parvenant à limiter son taux d'erreur à environ 5×10^{-4} par acide aminé incorporé (revue par Parker, 1989). Cependant, une telle valeur ne s'applique qu'à un ribosome de type sauvage. En effet, il existe toute une panoplie de mutations affectant soit le rRNA, soit des protéines ribosomiques qui influencent la précision de lecture du ribosome (revue dans Kurland *et al.*, 1997). Au cours de l'élongation, cette précision repose sur le maintien de la fidélité de lecture du messenger, et sur le maintien du cadre de lecture.

1.1.2.1 Le maintien de la fidélité de lecture

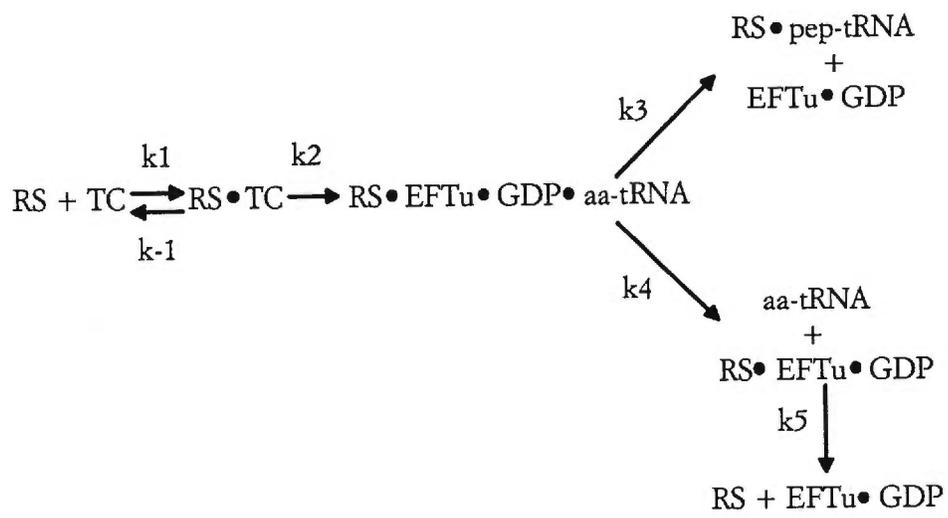
Le faible taux d'erreurs commis par le ribosome sous-entend une sélection particulièrement soignée des aa-tRNA incorporés dans le peptide en croissance au cours de l'élongation. Cette sélection s'effectue en deux étapes (Fig. 1-2): la sélection initiale, et le "proofreading" (revue dans Kurland *et al.*, 1996).

Dans un premier temps, un complexe ternaire va se lier de façon rapide et réversible sur un ribosome en cours d'élongation. Cette interaction initiale ne nécessite pas la reconnaissance du codon à lire (Rodnina *et al.*, 1995). Puis, le complexe ternaire occupe le site A/T du ribosome. Si l'anticodon de l'aa-tRNA n'est pas complémentaire au codon du messenger, le complexe ternaire "non-correct" se dissocie du ribosome avant l'hydrolyse du GTP. En cas d'appariement, le GTP est hydrolysé. Diverse études menées chez les procaryotes ont montré que plusieurs régions du rRNA 16S, dont le site de décodage, et certaines protéines ribosomiques, comme la protéine S12, sont impliquées dans l'étape de

Figure 1-2: Modèle cinétique du maintien de la fidélité de lecture

Le maintien de la fidélité de lecture fait intervenir un mécanisme de sélection des aa-tRNA en deux étapes, la sélection initiale et le "proofreading". RS: ribosome lié au messenger et à un peptidyl-tRNA localisé au site P du ribosome; TC: complexe ternaire, c'est-à-dire un aa-tRNA lié au complexe EF-Tu • GTP; pep-tRNA: peptidyl-tRNA; k_{-1} à k_5 : constantes de vitesse des différentes étapes de la sélection de l'aa-tRNA.

Tiré de Thompson (1988).



Sélection initiale

"Proofreading"

sélection initiale des tRNA. Il semble également que l'interaction rRNA-tRNA au site P influence la précision du décodage au site A (revue dans Kurland *et al.*, 1996).

Après l'hydrolyse du GTP, le complexe EF-Tu•GDP reste encore lié à l'aa-tRNA pendant une courte période. Au cours de ce temps de latence, le ribosome va pouvoir éliminer la majorité des aa-tRNA "pseudo-corrects" qui auraient échappé à la première étape de sélection, c'est-à-dire des aa-tRNA ne pouvant appairer que deux bases sur trois de leur anticodon avec le codon à lire sur le mRNA. Cette deuxième étape de sélection des aa-tRNA est dénommée "proofreading". Les aa-tRNA "pseudo-corrects" sont rejetés avant le départ du complexe EF-Tu•GDP. Quant aux aa-tRNA corrects, ils restent accrochés au site A/T jusqu'au départ de ce complexe, pour se retrouver ensuite localisés au site A/A, et participer à la formation du lien peptidique.

De plus, pour que la traduction d'un mRNA en protéine soit fidèle au message contenu dans la séquence nucléotidique, le ribosome doit maintenir jusqu'au codon de terminaison le cadre de lecture défini lors de l'initiation de la traduction.

1.1.2.2 Le maintien du cadre de lecture

Le maintien du cadre de lecture est essentiel pour l'intégrité de la chaîne polypeptidique en croissance. En effet, un changement du cadre de lecture se solderait soit par l'obtention d'une protéine différente de la protéine originale et probablement inactive, ou par une traduction avortée, les codons stop étant fréquents dans les cadres de lecture alternatifs. En fait, le ribosome parvient à maintenir son taux d'erreur de cadre de lecture, ou taux de "frameshift" spontané, à moins de 5×10^{-5} erreurs par codon (revue dans Farabaugh, 1996a), ce qui représente seulement un dixième du taux des erreurs totales commises par le ribosome. Néanmoins, les mécanismes qui régissent le maintien du cadre de lecture sont encore mal connus.

1.1.2.2.1 Mécanisme du maintien du cadre de lecture

En 1987, Trifonov proposait un mécanisme de contrôle du cadre de lecture impliquant des interactions entre le rRNA 16S et le messenger au niveau de motifs GNN-GNN (N pouvant être n'importe quelle base) disposés périodiquement le long de la séquence codante. Cependant, diverses études menées sur la suppression de mutations modifiant le cadre de lecture des messagers indiquent que le maintien de ce cadre de lecture est assuré par les agents du mécanisme de sélection des tRNA. Ainsi, des mutants de facteurs d'élongation procaryotes (EF-Tu; Hughes *et al.*, 1987), et eucaryotes (EF-1 α ; revue dans Farabaugh, 1996a) augmentent le taux de "frameshift" spontané. D'autre part, des mutations du rRNA 16S dans la région du site de décodage, et dans d'autres régions également impliquées dans la sélection des tRNAs, stimulent aussi le changement de cadre de lecture accidentel (O'Connor *et al.*, 1997). Ces mutations provoqueraient le glissement du tRNA situé au site P en interrompant les contacts tRNA-mRNA, et favoriseraient la liaison hors du cadre de lecture de l'aa-tRNA en diminuant la stringence de la sélection des tRNA au site A. Un autre outil permet de mettre en valeur le rôle du ribosome dans le maintien du cadre de lecture: la streptomycine (Sm). Cet antibiotique qui se lie au site de décodage du rRNA 16S, est connu pour induire des erreurs de lecture lors de la traduction, et pour stimuler le "frameshift". D'autre part, des ribosomes résistants à la Sm en raison d'une mutation dans la protéine S12, et caractérisés pour leur faible taux d'erreurs de lecture, diminuent ce même "frameshift" (Atkins *et al.*, 1972). Donc, le maintien de la fidélité et celui du cadre de lecture sont intimement liés. Toutefois, d'autres composants du ribosome, tels que le rRNA 5S comme le suggèrent des expériences de mutagenèse, pourraient aussi intervenir dans le maintien du cadre de lecture (Dinman et Wickner, 1995).

1.1.2.2.2 Perturbations occasionnelles du cadre de lecture

Puisque la sélection des tRNA est un pilier du maintien du cadre de lecture, il n'est pas étonnant de constater que, dans certaines conditions structurales ou physiologiques, les tRNAs peuvent être responsables d'un changement du cadre de lecture. Ainsi certains

tRNA sont capables de se lier à des doublets de bases du mRNA aussi bien qu'à des triplets en raison d'une forte interaction codon-anticodon. Un excès de tels tRNA peut donc provoquer un changement du cadre de lecture (revue dans Farabaugh, 1996a). A l'inverse, l'absence de certains acides aminés, ou la faible abondance de certains aa-tRNA dans les cellules, peut aussi induire un changement de cadre de lecture en raison d'une compétition entre des aa-tRNA corrects, et incorrects pour la lecture du codon situé au site A. Chez *Escherichia coli*, le codon AAG codant pour la lysine, et le codon UGG codant pour le tryptophane sont lus par des aa-tRNA présents en faible quantité dans la cellule. La présence de ces codons dans un contexte précis favorise un changement du cadre de lecture (Kolor *et al.*, 1993; Weiss et Gallant, 1986). D'une manière plus générale, le taux de "frameshift" varie selon la phase de croissance d'une culture bactérienne: il augmente entre la phase exponentielle de croissance et le début de la phase stationnaire avant de diminuer au cours de cette dernière (Wentzel *et al.*, 1998).

En conclusion, le "frameshift" spontané résulte de la compétition entre un décodage normal du messenger, et un décodage anormal provoqué par des changements structuraux (mutations dans les tRNA, dans le rRNA, dans les protéines ribosomiques, et dans les facteurs d'élongation), ou des changements physiologiques (présence d'antibiotiques, rareté de certains acides aminés, état de croissance de la culture bactérienne). Cependant, dans certains cas, le messenger peut contenir des informations qui conduisent à la réalisation, voulue cette fois-ci, d'un changement de cadre de lecture. On parle alors de changements programmés de cadre de lecture, ou "frameshifts" programmés.

1. 2. LES "FRAMESHIFTS" PROGRAMMÉS

Dans la section précédente, le "frameshift" spontané était présenté comme une erreur de lecture du messenger se produisant très rarement. Cependant, il semble que certains gènes se soient inspirés de ces erreurs de changement de cadre de lecture pour moduler leur expression afin de répondre aux besoins de la cellule, ou de permettre le cycle viral de

certains virus. Le pourcentage de réalisation de tels évènements peut aller jusqu'à 50%, voire plus selon les cas.

1.2.1 DÉFINITION ET DISTRIBUTION DES "FRAMESHIFTS" PROGRAMMÉS

La plupart des "frameshifts" programmés étudiés consistent en un glissement du ribosome soit d'un nucléotide vers le côté 5' du messenger ("frameshift" - 1), soit d'un nucléotide en direction 3' ("frameshift" + 1). Les "frameshifts" programmés, quel que soit leur type, se produisent au niveau d'un site spécifique de la séquence codante du messenger. Ainsi, suite au changement de cadre de lecture, deux protéines peuvent être produites à partir du même messenger. Les séquences de ces protéines seront identiques de leur extrémité N-terminale jusqu'au site de glissement, puis différeront, le cadre de lecture ayant changé. Les éléments du messenger et les mécanismes responsables de la réalisation des deux types de "frameshift" diffèrent (revue par Farabaugh 1996a et b, et par Larsen *et al.*, 1995). Ceux impliqués dans le "frameshift" programmé - 1 seront développés dans la section 1.3.

Le plus renommé des "frameshifts" programmés est le "frameshift" - 1 du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Cependant, ce type de "frameshift" se retrouve chez de nombreux autres virus affectant non seulement des cellules de mammifères, mais aussi des cellules végétales. En effet, de très nombreux virus à RNA de plantes utilisent un "frameshift" programmé - 1 pour produire leurs protéines, et la plupart de ces "frameshifts" possèdent un mécanisme similaire à celui des rétrovirus comme le VIH (revue dans Gesteland et Atkins, 1996). Le "frameshift" programmé - 1 est aussi employé par des rétrotransposons de la *Drosophile*, par des virus de la levure, des bactériophages, des séquences d'insertion (IS) d'*E. coli*, et même par un gène chromosomique conventionnel de cette bactérie, le gène *dnaX*. Une telle distribution à travers des organismes aussi éloignés du point de vue de l'évolution, et l'analogie existant entre les différentes séquences dirigeant le "frameshift" programmé - 1, suggèrent que de tels sites ont probablement évolué de façon indépendante pour converger vers une solution unique (revue par Farabaugh, 1996a).

De leur côté, les "frameshift" programmés + 1 sont plus rares, mais ils sont également distribués à travers des organismes évolutivement différents. En effet, on les retrouve aussi bien chez des rétrotransposons de la levure, que dans le gène chromosomique bactérien codant pour le facteur de terminaison 2 (RF2). Il est d'ailleurs à noter que le seul cas connu à l'heure actuelle de "frameshift" programmé intervenant dans l'expression d'un gène de mammifère est un "frameshift" + 1 qui intervient dans l'expression du gène codant pour l'antizyme de l'ornithine décarboxylase, un enzyme de dégradation de l'ornithine décarboxylase (Matsufuji *et al.*, 1995). La comparaison des mécanismes du "frameshift" + 1, et du "frameshift" spontané semble montrer que les "frameshift" programmé + 1 auraient évolué de manière à amplifier l'efficacité de glissement des "frameshift" spontanés, ce qui les classerait dans la catégorie d'erreurs de lecture amplifiées (revue dans Farabaugh, 1996b).

Le Tableau I-II donne une liste non-exhaustive d'exemples de "frameshifts" - 1, et de "frameshifts" +1.

1.2.2 FONCTIONS DES "FRAMESHIFTS" PROGRAMMÉS

Les fonctions des "frameshifts" programmés peuvent être regroupées en trois catégories: l'autorégulation de gènes, la production d'activités enzymatiques alternatives, et la production d'activités catalytiques. Cette dernière fonction concerne surtout les rétrovirus pour lesquels les "frameshifts" programmés présentent plusieurs avantages.

1.2.2.1 Exemple d'autorégulation de gène: cas du gène *prfB*

Le gène bactérien *prfB* code pour le facteur de terminaison 2 ("release factor 2" ou RF2). La régulation de la production de RF2 repose sur la quantité de ce facteur disponible dans la cellule. Elle fait intervenir un "frameshift" programmé +1, qui fut d'ailleurs l'un des premiers à avoir été identifié (revue dans Farabaugh, 1996b).

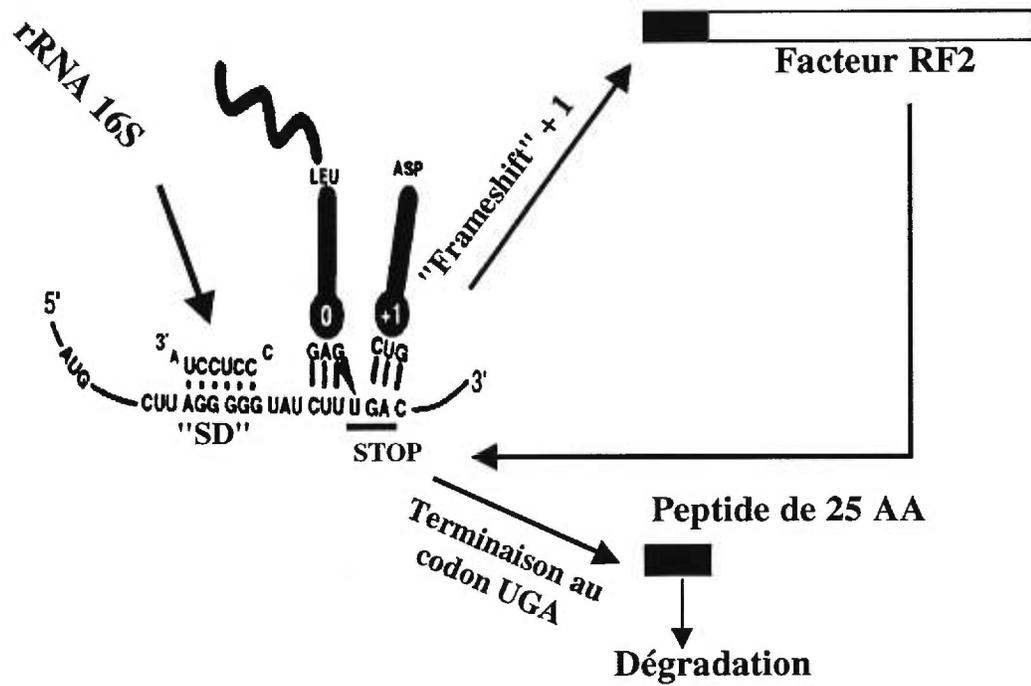
Tableau I-II: Distribution des "frameshifts" programmés à travers les organismes (d'après Brierley, 1995)

Types de "frameshift" programmé	Organismes	Exemples
"Frameshift" -1	Mammifères	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Rétrovirus</u>: ex.: <ul style="list-style-type: none"> - virus de l'immunodéficience humaine (VIH), (Jacks <i>et al.</i>, 1988a) - virus de la tumeur mammaire de la souris (VTMS), (Moore <i>et al.</i>, 1987; Jacks <i>et al.</i>, 1987) - virus humain de la leucémie des cellules T de type II (VHLT-II), (Mador <i>et al.</i>, 1989) • <u>Coronavirus</u>: ex.: coronavirus humain, (Herold <i>et al.</i>, 1993) • <u>Astrovirus</u>: ex.: astrovirus humain de sérotype I, (Marzinke <i>et al.</i>, 1994)
	Oiseaux	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Coronavirus</u>: ex.: virus de la bronchite infectieuse, (Brierley <i>et al.</i>, 1987)
	Insectes	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Rétrotransposons de la Drosophile</u>: ex.: élément transposable gypsy de <i>Drosophila melanogaster</i> (Marlor <i>et al.</i>, 1986)
	Plantes	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Luteovirus</u>: ex.: virus du nanisme jaune de l'orge (Brault et Miller, 1992) • <u>Dianthevirus</u>: ex.: virus de la mosaïque nécrotique du trèfle rouge (Kim et Lommel, 1994)
	Levures	<ul style="list-style-type: none"> • Virus L-A à RNA double brin de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Dinmann <i>et al.</i>, 1991) • Virus à RNA double brin de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de type L1 (Tzeng <i>et al.</i>, 1992)
	Bactéries	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Bactériophage</u>: ex.: T7 (Condron <i>et al.</i>, 1991) • <u>Séquences d'insertion</u>: ex: ISI (Escoubas <i>et al.</i>, 1991) • <u>Gène chromosomique</u>: gène <i>dnaX</i> (revue dans Farabaugh, 1996a)
"Frameshift" +1	Mammifères	<ul style="list-style-type: none"> • Gène de l'antizyme ornithine décarboxylase (Matsufuji <i>et al.</i>, 1995)
	Levures	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Rétrotransposons de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></u>: ex.: Ty1 et Ty3 (revue dans Farabaugh, 1996a)
	Bactéries	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Gène chromosomique</u>: gène <i>prf B</i> (Craigien <i>et al.</i>, 1986)

Figure 1-3: Exemple de "frameshifts" programmés

A: Modèle de régulation de l'expression du gène bactérien du RF2, un exemple d'autorégulation de gènes par un "frameshift" programmé ribosomique + 1

Lorsque le ribosome arrive au niveau de la séquence CUU UGA, et que le codon stop UGA est placé dans la fenêtre de lecture du site A, deux cas peuvent se produire. Le facteur RF2, présent en quantité suffisante dans la cellule, reconnaît le codon UGA, et induit la terminaison de la traduction. Si la cellule manque de RF2, le ribosome glisse du cadre de lecture 0 au cadre de lecture + 1. Le facteur RF2 est alors produit. "SD": séquence du mRNA de RF2 capable de s'apparier à la séquence anti-Shine-Dalgarno du rRNA 16S; tRNA "0": dernier tRNA incorporé dans le cadre de lecture 0; tRNA "+ 1": premier tRNA incorporé dans le cadre de lecture + 1.



Le facteur RF2 reconnaît spécifiquement le codon de terminaison UGA. C'est ce même codon que l'on retrouve à la position 26 du messenger codant pour RF2. Pour pouvoir traduire les 340 codons restants du gène, le ribosome doit glisser dans un cadre de lecture +1. Le codon précédant le codon UGA est un codon CUU codant pour une leucine. Lorsque le ribosome arrive à ce codon, deux cas peuvent se produire (Fig. 1-3 A). Si le facteur RF2 est en quantité abondante dans la cellule, il reconnaît le codon de terminaison, et se lie au ribosome, ce qui entraîne une terminaison précoce de la traduction de la protéine. En revanche, si la cellule manque de RF2, le ribosome fait une pause au 26^{ème} codon, et glisse d'un nucléotide en direction 3' du messenger. Ceci permet au leucyl-tRNA porteur du polypeptide en croissance et placé au site P de se désappairer du codon CUU du cadre de lecture 0, et de s'apparier au codon UUU du cadre de lecture +1. La traduction de RF2 peut alors se poursuivre jusqu'au codon stop final. La concentration de RF2 dans la cellule régule donc directement le "frameshift" programmé qui permet l'expression de ce facteur de terminaison, comme l'ont montré l'ajout *in vitro* de RF2 exogène (Craigén et Caskey, 1986), et l'étude *in vivo* de mutants du gène *prfB* (Kawakami et Nakamura, 1990).

Outre l'importance de la nature du codon stop en 26^{ème} position (Weiss *et al.*, 1987), deux autres éléments favorisent le changement de cadre de lecture dans le cas du gène *prfB*. Tout d'abord, le choix du leucyl-tRNA correspondant au codon CUU est essentiel, car même après le glissement, deux nucléotides sur trois de son anticodon peuvent toujours s'apparier au codon du messenger dans le nouveau cadre de lecture. Finalement, la présence en amont des codons CUU et UGA d'une séquence riche en purines ressemblant à la séquence Shine-Dalgarno stimule le "frameshift" programmé, et cette stimulation s'opère via un appariement avec le rRNA 16S (revue dans Farabaugh, 1996a).

1.2.2.2 Production d'activités enzymatiques alternatives: cas du gène *dnaX* d'*E. coli*.

Actuellement, le seul exemple connu de "frameshift" programmé -1 intervenant dans l'expression d'un gène chromosomique bactérien est le gène *dnaX* d'*E. coli*. Ce gène code pour les sous-unités γ et τ de l'holoenzyme de la DNA polymérase III responsable de la réplication du DNA du chromosome bactérien. La sous-unité τ est une protéine de 71 kDa

essentielle à la croissance cellulaire, et qui confère une forte processivité à la DNA polymérase III. Elle serait impliquée dans la production du brin de DNA à synthèse continue. Quant à la sous-unité γ , il s'agit d'une protéine de 47 kDa. Associée au noyau de la DNA polymérase III (c'est-à-dire aux sous-unités α , ϵ , et θ), et à la sous-unité β , elle constitue un complexe moins processif que celui associé à la sous-unité τ , et qui serait impliqué dans la production du brin de DNA à synthèse discontinue. En fait, cette sous-unité s'avère être un fragment de la partie N-terminale de la sous-unité τ . En effet, alors que cette dernière est le produit de la traduction complète du messenger transcrit à partir du gène *dnaX*, la sous-unité γ résulte d'un "frameshift" -1 se produisant au niveau d'un site spécifique situé aux deux tiers de la région codante pour la sous-unité τ . Les ribosomes ayant glissé dans le cadre de lecture -1 rencontrent un codon de terminaison deux codons après le glissement (Fig. 1-3 B). Une séquence Shine-Dalgarno en 5' du site de glissement, et une tige-boucle localisée en 3' stimulent l'efficacité du "frameshift" (revue dans Farabaugh, 1996b, et dans Gesteland et Atkins, 1996).

1.2.2.3 Production d'activités catalytiques: exemple de la production de la protéine de fusion "Gag-Pol" du VIH

Les rétrovirus comme le VSR, le VTMS, ou le VIH, utilisent le "frameshift" programmé -1 pour produire certains précurseurs des protéines virales. Ainsi, deux des précurseurs des protéines du VIH, la protéine "Gag" et la protéine de fusion "Gag-Pol", sont produits à partir d'un même mRNA, le RNA génomique viral pleine longueur. La traduction de ces deux protéines débute au même codon d'initiation. La majorité des ribosomes achèvent la traduction du mRNA au codon stop de la protéine "Gag" (Fig. 1-3 C), produisant ainsi cette dernière qui est le précurseur des protéines structurales du virus, dont les protéines de la matrice, de la capsid, et de la nucléocapsid. Cependant, dans 10 % des cas, les ribosomes glissent dans un cadre de lecture "-1" au niveau d'une séquence spécifique avant de rencontrer le codon stop de "Gag". Ce changement de cadre de lecture permet la production de la protéine de fusion "Gag-Pol" dont la séquence en acide aminés est identique à celle de "Gag" dans la portion N-terminale, mais diffère après le site de

Figure 1-3: Exemple de "frameshifts" programmés

B: Modèle de régulation de l'expression du gène *dnaX*, un exemple de production d'activités enzymatiques alternatives par un "frameshift" programmé -1

Dans 50 % des cas, les ribosomes traduisent le messenger du gène *dnaX* en restant dans le cadre de lecture 0, ce qui conduit à la production de la sous-unité τ de la DNA polymérase III. L'autre moitié des ribosomes, lorsqu'ils arrivent au niveau de la séquence glissante AAA AAG, glissent d'un nucléotide en direction 5', et continuent la traduction du mRNA dans le cadre de lecture -1. Ceci permet la production de la sous-unité γ de la DNA polymérase III. Le mRNA est représenté avec les stimulateurs en 3' et 5' de ce "frameshift", qui sont respectivement une séquence capable de s'apparier avec la séquence anti-Shine-Dalgarno du rRNA 16S ("SD"), et une structure secondaire en tige-boucle.

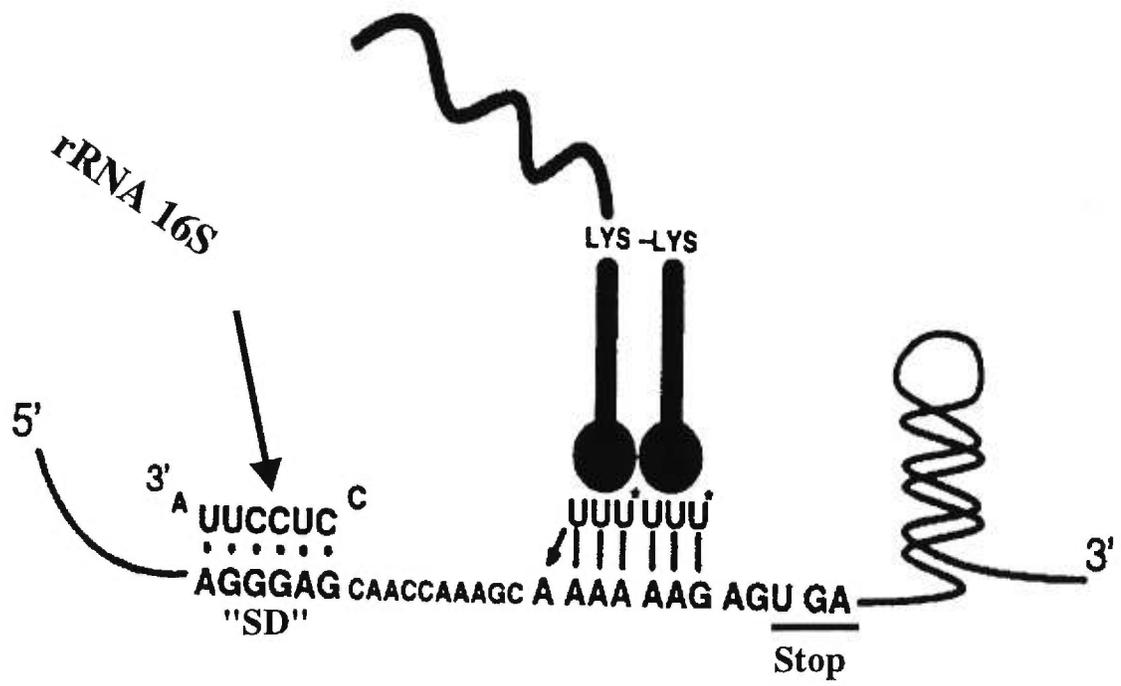
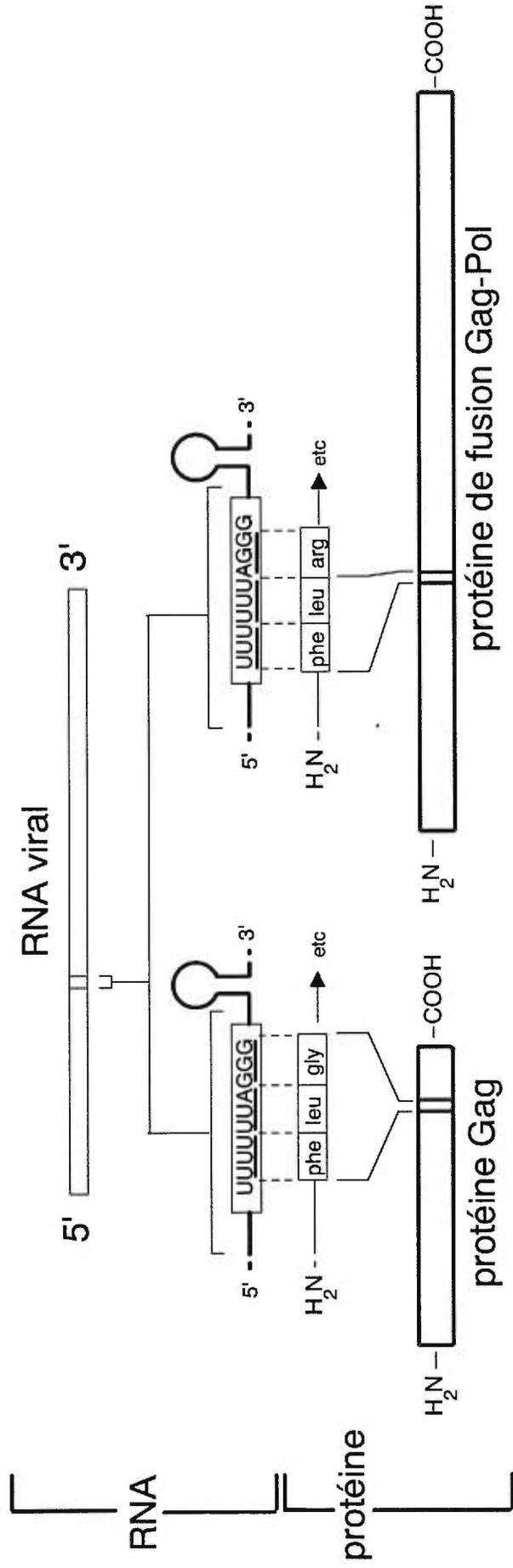


Figure 1-3: Exemple de "frameshifts" programmés

C: Production de la protéine de fusion "Gag-Pol" du VIH, un exemple de production d'activités catalytiques par un "frameshift" programmé -1

La plupart du temps, les ribosomes traduisent le mRNA viral jusqu'au codon stop de la protéine "Gag". Mais dans environ 10 % des cas, ils glissent d'un nucléotide en direction 5' lorsqu'ils rencontrent le site de "frameshift" comprenant une séquence glissante suivie d'une tige boucle. Ainsi placés dans le cadre de lecture -1, les ribosomes produisent la protéine de fusion "Gag-Pol".



PAS DE FRAMESHIFT
(environ 90 % des ribosomes)

FRAME SHIFT
(environ 10 % des ribosomes)

glissement. La protéine de fusion "Gag-Pol" constitue le précurseur des protéines enzymatiques du virus, c'est-à-dire la protéase, les enzymes de réplication, la transcriptase inverse, et l'intégrase (Hatfield et Oroszlan, 1990). La traduction terminée, la portion "Gag" de la protéine de fusion "Gag-Pol" la dirige vers le lieu d'assemblage de la particule virale, et participe à cet assemblage en s'associant avec des protéines "Gag". Ceci assure l'encapsidation de la partie "Pol" qui lui est liée, et donc des protéines enzymatiques du virus (Swanstrom et Wills, 1997).

1.2.2.4 Avantages procurés aux rétrovirus par le "frameshift" programmé

D'après la section précédente, le "frameshift" programmé procure au moins deux avantages aux rétrovirus comme le VIH. Tout d'abord, en permettant la traduction de deux précurseurs des protéines virales à partir du même messenger, il permet aux virus de minimiser la taille de leur génome. D'autre part, la protéine de fusion "Gag-Pol", produite suite au "frameshift" - 1, garantit l'encapsidation des protéines enzymatiques du virus nécessaires à sa propagation, la partie "Gag" de la protéine participant à la formation de la particule virale (voir section 1.2.2.3) .

Un autre avantage du "frameshift" est qu'il permet d'assurer le maintien du rapport entre les protéines structurales, et les protéines enzymatiques, c'est-à-dire le rapport "Gag"/"Gag-Pol". Il semble, en effet, que le maintien de ce rapport soit essentiel à la prolifération du virus. Un changement dans la stoechiométrie de ce rapport empêche la formation du virion dans le cas du virus de la leucémie murine de Moloney (Felsenstein et Goff, 1988), comme dans le cas du VIH 1 (Park et Morrow, 1991; Karacostas *et al.*, 1993).

Finalement, le "frameshift" pourrait également empêcher l'encapsidation de RNA viraux défectueux. En effet, chez les rétrovirus, le signal d'encapsidation est localisé de tel sorte que seuls les RNA non-épissés peuvent être encapsidés (revue dans Brierley, 1995).

1.2.3 ETUDE DES "FRAMESHIFTS" PROGRAMMÉS

Depuis leur découverte dans les années 80, les "frameshifts" programmés ont fait l'objet de nombreuses études dans le but, notamment, de trouver une arme contre les virus qui les utilisent. Mais les "frameshifts" programmés sont également étudiés dans un but plus fondamental. En effet, quel que soit leur type, ils parviennent à biaiser les règles du maintien du cadre de lecture en interagissant d'une manière ou d'une autre avec les agents responsables de ce maintien. Ceci fait des "frameshifts" programmés d'excellents outils pour approfondir les connaissances sur la traduction, et plus particulièrement sur la fidélité de traduction. Leur étude permet, entre autre, de déterminer quelles sont les étapes de l'élongation qui sont les plus sensibles au changement de cadre de lecture, et d'identifier les agents impliqués dans son maintien (revue dans Farabaugh, 1996a). Il a ainsi été montré que le rRNA 5S et le facteur EF-Tu/EF-1 α ont un rôle à jouer dans le maintien du cadre de lecture (Dinman et Wickner, 1995; Farabaugh et Vimaladithan, 1998).

L'étude des "frameshifts" programmés des virus d'eucaryotes supérieurs a nécessité le développement de modèles d'étude pour faciliter les expériences en laboratoire. C'est le développement de ces modèles qui a permis de montrer que les mécanismes du "frameshift" programmé - 1 (voir section 1.3.1.2) étaient conservés chez les eucaryotes inférieurs et supérieurs (Stahl *et al.*, 1995), et même chez les bactéries (Yelverton *et al.*, 1994). Ces modèles permettent notamment de tester l'efficacité de différents composés sur les "frameshifts" programmés, dont des antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique. De tels antibiotiques offrent un double avantage: des antibiotiques agissant à certaines étapes précises de l'élongation permettent de déterminer à quel moment le changement de cadre de lecture se réalise, et fournissent des informations précieuses pour la modélisation de nouveaux agents antiviraux. L'efficacité de ces derniers pourra être testée dans un premier temps dans les modèles d'étude, comme la levure. Les "frameshifts" programmés sont donc un bel exemple pour montrer que recherche fondamentale et recherche appliquée dépendent étroitement l'une de l'autre.

1.3 LE "FRAMESHIFT" PROGRAMMÉ -1

Les "frameshifts" programmés -1 sont les plus abondants, et se rencontrent aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes. Il semble d'ailleurs que leurs mécanismes se soient conservés au cours de l'évolution.

1.3.1 LE "FRAMESHIFT" PROGRAMMÉ -1 CHEZ LES EUCARYOTES

Jusqu'en 1985, deux modèles rivalisaient pour expliquer la production de la protéine de fusion "Gag-Pol" des rétrovirus. Le messenger viral est-il épissé de manière à positionner les séquences codantes des protéines "Gag" et "Pol" dans un même cadre de lecture, ou les ribosomes changent-ils de cadre de lecture pour passer d'une séquence codante à l'autre? Finalement, le séquençage de polypeptides permit au groupe de Varmus de démontrer que la production de la protéine de fusion "Gag-Pol", chez le virus du sarcome de Rous (VSR), était due à un "frameshift" programmé -1 (Jacks et Varmus, 1985). L'analyse de la séquence responsable de ce "frameshift" chez le VRS montra que le glissement du ribosome s'effectuait au niveau d'une séquence dite "glissante", et suggéra un mécanisme expliquant le "frameshift" programmé -1, le mécanisme du glissement simultané, applicable à différents rétrovirus dont le VIH (Jacks *et al.*, 1988b), (voir section 1.3.2).

1.3.1.1 Le site de "frameshift" programmé -1

Le site du "frameshift" programmé -1 chez les eucaryotes comporte deux éléments distincts: une séquence glissante où les ribosomes glissent dans le cadre de lecture -1, et une structure secondaire, localisée quelques nucléotides en aval, qui joue le rôle de stimulateur du "frameshift".

1.3.1.1.1 La séquence glissante

La séquence glissante est localisée à l'intérieur de la zone de chevauchement des séquences codantes des protéines "Gag" et "Gag-Pol". Ainsi dans le cas du VSR, elle se trouve juste avant le codon stop de la protéine "Gag". Par contre, chez le VIH, elle est située 234 nucléotides en amont du codon stop de la protéine "Gag" (Hatfield et Orozlan, 1990).

La comparaison de différentes séquences glissantes (Tableau I-III) révèle l'existence d'un motif commun. Ce motif consiste en une séquence heptamérique du type $X_1-X_2X_3Y_4-Y_5Y_6Z_7$, X pouvant être identique à Y. Les codons $X_2X_3Y_4$ et $Y_5Y_6Z_7$ sont ceux du cadre de lecture 0. Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que l'intégrité de la séquence de cet heptamère est essentielle pour le "frameshift". En effet, le changement des bases X_1 , X_2 , ou X_3 de la séquence du VSR en cytosine diminue cinq fois l'efficacité du "frameshift" programmé, alors que le changement d'une des bases Y_4 , Y_5 , ou Y_6 , en adénine, cytosine, ou guanine diminue plus de dix fois cette efficacité (Jacks *et al.*, 1988b). De même, le remplacement des bases Y_4 , Y_5 , et Y_6 par un triplet GGG, ou CCC réduit considérablement le "frameshift" (Brierley *et al.*, 1992; Dinman *et al.*, 1991). Parallèlement, la modification de la septième position de l'heptamère du VTMS diminue jusqu'à dix fois l'efficacité du "frameshift" (Chamorro *et al.*, 1992). Ces données suggèrent que la séquence de l'heptamère guide la sélection de tRNA capables de glisser dans le nouveau cadre de lecture, tout en leur permettant d'y rester appariés.

Néanmoins, si ces expériences de mutagenèse dirigée indiquent clairement l'importance de la séquence heptamérique dans la réalisation du "frameshift" programmé, celle-ci n'est pas suffisante pour garantir une bonne efficacité de "frameshift". Une structure secondaire du messenger située quelques nucléotides en aval doit jouer le rôle de stimulateur (Chamorro *et al.*, 1992; Reil *et al.*, 1993).

Tableau I-III: Exemples de sites de "frameshift" programmé -1 de virus à RNA (d'après Brierley, 1995)

Virus	Séquence glissante	Structure secondaire	Distance séparant la séquence glissante de la structure secondaire
Virus de l'immunodéficience humaine de type 1 et 2 (VIH-1, VIH-2)	U UUU UUA	Tige-boucle	7 nucléotides
Virus humain de la leucémie des cellules T de type II (VHLT-II)	A AAA AAC	Tige-boucle	7 nucléotides
Virus de la tumeur mammaire de la souris (VTMS)	A AAA AAC	Pseudo-noeud	7 nucléotides
Virus du sarcome de Rous (VSR)	AAA UUU A	Pseudo-noeud potentiel	6 nucléotides
Virus de la bronchite infectieuse du poulet (VBI)	U UUA AAC	Pseudo-noeud	6 nucléotides
Coronavirus humain	U UUA AAC	Pseudo-noeud	5 nucléotides
Astrovirus humain de sérotype I	A AAA AAC	Tige-boucle	6 nucléotides
Virus L-A à RNA double brin de <i>S. cerevisiae</i>	G GGU UUA	Pseudo-noeud	5 nucléotides

1.3.1.1.2 Les structures secondaires de RNA stimulatrices du "frameshift" programmé

Comme le montre l'échantillon de sites de "frameshift" programmé du Tableau I-III, ce sont majoritairement des pseudo-noeuds qui jouent le rôle de stimulateurs de l'efficacité du "frameshift" programmé, bien que quelques virus, comme le VIH, soient dotés d'une simple tige-boucle.

1.3.1.2.1 Les pseudo-noeuds

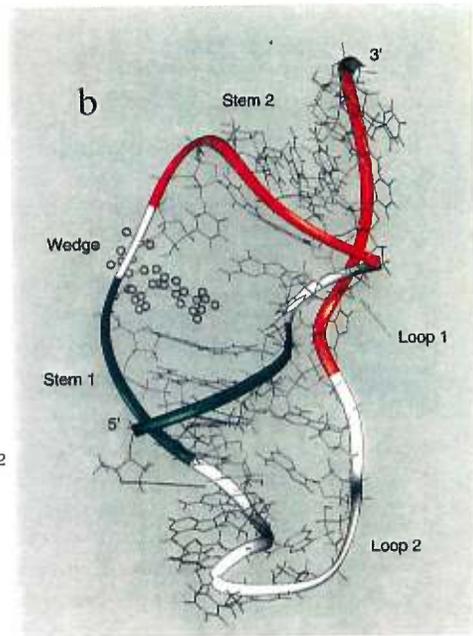
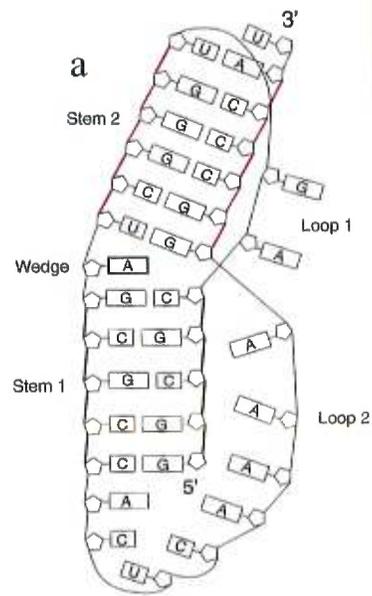
Un pseudo-noeud est une structure secondaire de RNA résultant de l'appariement de la boucle d'une épingle à cheveux avec une structure en simple brin de manière à former une seconde hélice (Fig 1-4 A). C'est l'étude par mutagenèse dirigée du coronavirus de la bronchite infectieuse du poulet (VBI) qui établit pour la première fois l'existence d'un pseudo-noeud et son implication dans un "frameshift" programmé -1 (Brierley *et al.*, 1989). Le même type d'expérience permet également de démontrer l'existence de pseudo-noeuds chez plusieurs autres virus, dont le VTMS (Chamorro *et al.*, 1992). D'après ces expériences, des mutations empêchant la formation du pseudo-noeud inhibent le "frameshift" programmé, alors que des mutations compensatoires rétablissant la structure secondaire restaurent le "frameshift", même si l'efficacité de ce dernier reste plus faible que dans le cas du pseudo-noeud original. Comment expliquer cette différence de stimulation?

Initialement, il fut proposé que le rôle du pseudo-noeud était de ralentir la progression des ribosomes au cours de l'élongation afin de les forcer à faire une pause. C'est cette pause qui leur permettrait de glisser dans le cadre de lecture -1 au niveau de la séquence glissante (Jacks *et al.*, 1987). Deux équipes de recherches, celles de Bruenn et de Brierley, démontrèrent l'existence de cette pause par deux approches différentes (Tu *et al.*, 1992; Somogyi *et al.*, 1993). L'équipe de Bruenn appliqua la technique du "heelprint" au mRNA du virus à RNA double brin de *Saccharomyces cerevisiae* de type L1 incubé dans du lysat de réticulocytes de lapin. Cette technique permet d'identifier des régions de RNA protégées

Figure 1-4: Modèles de pseudo-noeuds stimulateurs du "frameshift" programmé -1

A: Exemple du pseudo-noeud du VTMS

a) Représentation graphique du pseudo-noeud du VTMS. b) Modèle atomique de la structure tridimensionnelle du pseudo-noeud du VTMS réalisé à partir de l'analyse par RMN de ce pseudo-noeud. "Loop": boucle; "Stem": tige correspondant à une hélice; "Wedge": courbure du pseudo-noeud. Tiré de Gesteland et Atkins (1996).



contre l'attaque de nucléases. Le pseudo-noeud du site de "frameshift" du mRNA viral induit une augmentation de la protection dans la région située juste en amont, ce qui indique que les ribosomes s'arrêtent dans cette région du site de "frameshift". De plus, des mutations détruisant le pseudo-noeud réduisent cette protection (Tu *et al.*, 1992). De son côté, l'équipe de Brierley introduisit la séquence codant pour le pseudo-noeud du VBI dans le gène du virus PB1 de la grippe utilisé comme gène rapporteur. La traduction *in vitro* de cette construction démontra également un arrêt transitoire des ribosomes au niveau du pseudo-noeud. Mais il semble que la capacité d'induire une pause ne soit pas suffisante pour expliquer le rôle du pseudo-noeud dans le "frameshift" programmé. En effet, des mutants du pseudo-noeud du VBI restent capables d'induire un arrêt, même plus bref, des ribosomes, mais ne stimulent pas forcément le "frameshift" programmé (Somogyi *et al.*, 1993). Il fut alors proposé que le rôle du pseudo-noeud ne se limitait probablement pas à celui de simple barrière énergétique provoquant un arrêt des ribosomes, mais devait aussi impliquer une caractéristique conformationnelle essentielle à la stimulation du frameshift (Chen *et al.*, 1995).

Afin de voir quelles caractéristiques structurales pouvaient expliquer l'efficacité de certains pseudo-noeuds à stimuler le "frameshift" programmé - 1, le but des études ultérieures fut de déterminer la structure tridimensionnelle de différents pseudo-noeuds stimulateurs, ou non, de ce "frameshift". Ainsi, la structure tridimensionnelle de différents pseudo-noeuds fut sondée à l'aide d'enzymes et d'agents chimiques (Chen *et al.*, 1995), et des données de résonance magnétique nucléaire (RMN) permirent d'établir des modèles de structure (Kang et Tinoco, 1997; Chen *et al.*, 1996; Shen et Tinoco, 1995). Les données obtenues ont été confirmées par des tests fonctionnels (Sung *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1995). D'après l'ensemble de ces études, tous les pseudo-noeuds capables de stimuler le "frameshift" programmé -1 possèdent des caractéristiques structurales communes. Les deux hélices du pseudo-noeud sont de forme "A", et comprennent à leur jonction un nucléotide non païré, une adénine. Cette adénine empêche l'empilement coaxial des deux hélices, et provoque une courbure entre elles. Ainsi, l'hélice 1 se penche vers la boucle 1 qui traverse le sillon majeur de l'hélice 2. La boucle 2, quant à elle, traverse le sillon mineur de l'hélice 1

(Fig. 1-4 B). L'orientation de la courbure est essentielle pour la fonction de stimulateur du "frameshift" programmé (Chen *et al.*, 1996). Ces caractéristiques structurales communes permettraient aux pseudo-noeuds d'être reconnus par les ribosomes, ou par un facteur cellulaire soluble. Cependant, l'existence d'un tel facteur cellulaire n'a pu être démontrée à ce jour (Chen *et al.*, 1995; ten Dam *et al.*, 1994). D'autre part, la distance entre la séquence glissante et le pseudo-noeud étant cruciale pour l'efficacité du "frameshift" (ten Dam *et al.*, 1994), il semble plus probable que les pseudo-noeuds interagissent avec le rRNA ou des protéines ribosomiques, ou encore avec un facteur étroitement associé au ribosome au cours de la traduction. Une telle interaction ne dépendrait que de la conformation du pseudo-noeud, et non pas de sa séquence (Kang et Tinoco, 1997).

1.3.1.2.2 La tige-boucle

Alors que le pseudo-noeud détient le quasi monopole de la structure secondaire de RNA stimulatrice du "frameshift" programmé -1, quelques virus ne semblent pas posséder de structure secondaire apparente, ou se contentent d'une simple tige-boucle (ten Dam *et al.*, 1990). Cette structure secondaire paraît moins efficace que le pseudo-noeud comme stimulateur du "frameshift" programmé -1 (Chen *et al.*, 1995; Chamorro *et al.*, 1992), mais elle satisfait aux virus qui possèdent une séquence heptamérique très glissante comme le VIH. La tige-boucle de ce virus a d'ailleurs une histoire très mouvementée. Pendant très longtemps, son existence fut uniquement suggérée par la présence d'une séquence palindromique située en aval de la séquence glissante, et sur des expériences de mutagenèse dirigée. Il fut même proposé que la séquence palindromique interagissait avec la séquence la séparant de la séquence glissante pour former un pseudo-noeud (Du *et al.*, 1996). Récemment, l'existence d'une structure en tige-boucle au niveau du site du "frameshift" du VIH a été prouvée par analyse de l'effet de la température sur l'absorption aux UV d'un segment de RNA codant pour la séquence de la tige-boucle hypothétique, et aussi par des attaques chimiques de ces segments de RNA (Kang, 1998), (Fig. 1-5).

L'utilité de cette tige-boucle fut également mise en question lorsque le groupe de

Figure 1-4: Modèles de pseudo-noeuds stimulateurs du "frameshift" programmé -1

B: Exemple du pseudo-noeud APKA27G: vue stéréoscopique de la structure obtenue à partir de données de RMN

"Stem": tige désignant une hélice; "loop": boucle. La tige 1 (en bleu), et la tige 2 (en blanc) ne sont pas empilées de façon coaxiale, mais forment un angle qui donne sa courbure au pseudo-noeud. Le nucléotide non apparié situé entre les deux tiges, et responsable de la courbure, est indiqué en rouge. La boucle 1 (en vert) traverse le sillon majeur profond de la tige 2, et la boucle 2 (en jaune) traverse l'étroit sillon mineur de la tige 1. Tiré de Kang et Tinoco (1997).

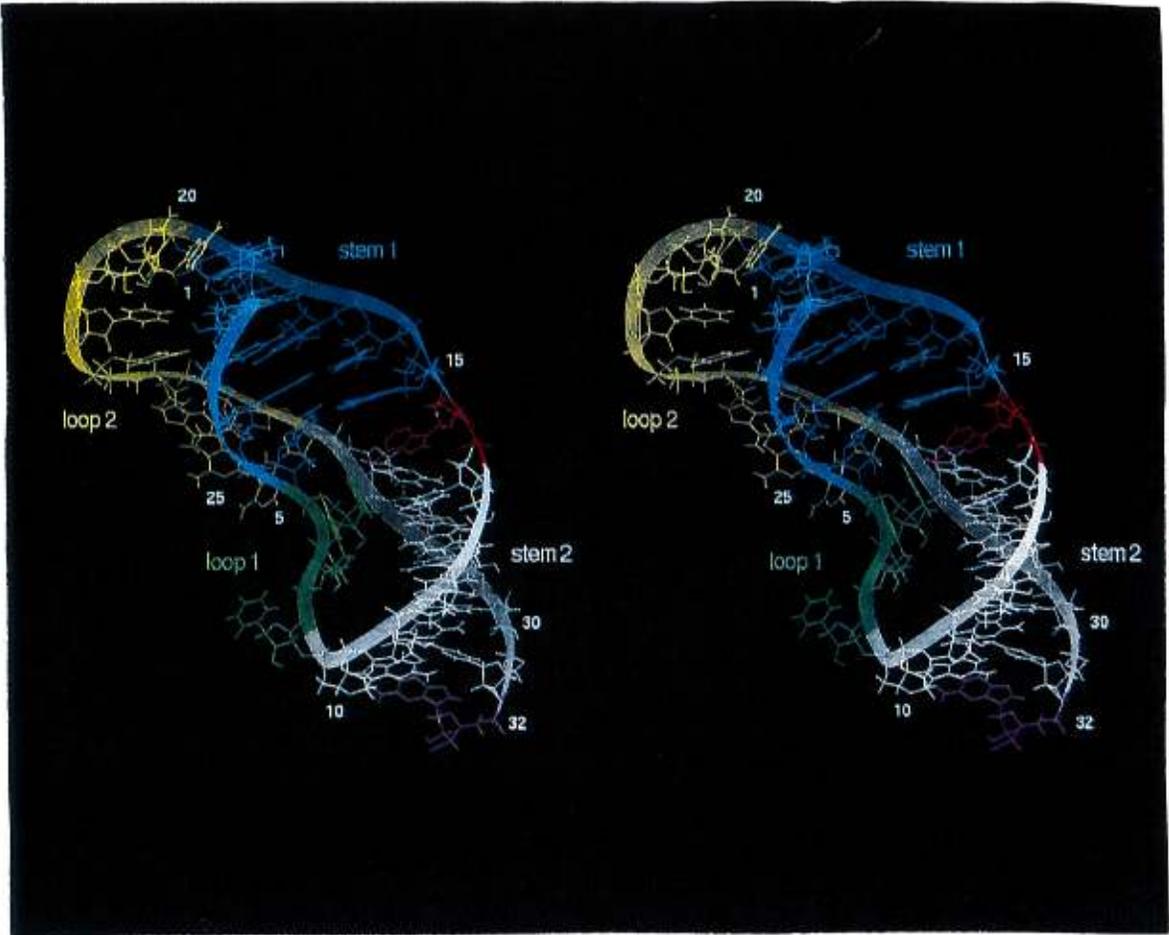


Figure 1-5: Site de "frameshift" du VIH.

A: Séquence du site de "frameshift" du mRNA pleine longueur du VIH. La séquence glissante est entourée d'un rectangle, la séquence palindromique codant pour la tige-boucle est en caractère gras.

B: Représentation du site de "frameshift" du VIH montrant le repliement de la séquence palindromique en tige-boucle.

D'après Kang (1998).

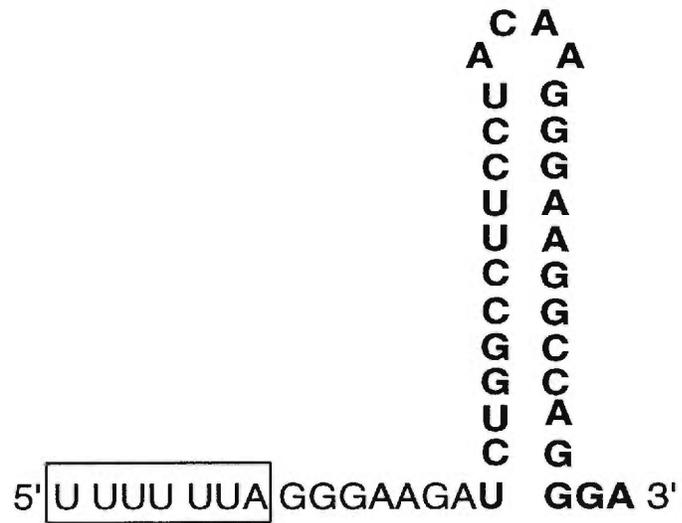
A

5' UUUUUUA GGGAAGAUCUGGCCUCCUACAAGGGAAGGCCAGGGA 3'

**Séquence
glissante**

Séquence codant pour la tige-boucle

B



Kingsman affirma que la séquence glissante du VIH était suffisante pour promouvoir un "frameshift" efficace aussi bien dans des lysats de réticulocytes de lapin, que dans des levures (Wilson *et al.*, 1988). Cependant ces résultats ont été contredits par des études ultérieures qui montrèrent que la délétion de la tige-boucle, ou l'introduction de mutations diminuant sa stabilité abaissait l'efficacité du "frameshift" programmé du VIH aussi bien dans les levures, les lysats de réticulocytes de lapin, que dans les cellules de mammifères en culture (Parkin *et al.*, 1992; Reil *et al.*, 1993; Stahl *et al.*, 1995; Bidou *et al.*, 1997). Ces résultats suggèrent que les mécanismes responsables du "frameshift" programmé -1 sont conservés chez les eucaryotes inférieurs et supérieurs. La tige-boucle pourrait donc, comme le pseudo-noeud, jouer un rôle de barrière énergétique qui forcerait les ribosomes à ralentir leur progression au niveau du site du "frameshift". Mais, même si certaines études suggèrent que la fonction de la tige-boucle repose sur sa stabilité (Bidou *et al.*, 1997), il ne faut pas écarter la possibilité que cette structure puisse interagir avec une des composantes du ribosome, ou avec une autre protéine capable de la reconnaître. Cette reconnaissance pourrait impliquer des caractéristiques structurales particulières, et/ou une séquence spécifique. En effet, des mutations dans la séquence de la tige-boucle du virus humain de la leucémie des cellules T de type II (VHLT-II) n'affectant pas sa stabilité provoquent une légère baisse de l'efficacité du "frameshift" (Kollmus *et al.*, 1994). Il a été démontré que la liaison de protéines cytoplasmiques spécifiques à la tige-boucle de l'élément de réponse au fer introduite en aval de la séquence glissante du VIH 1 régule l'efficacité du "frameshift" programmé -1 *in vitro* (Kollmus *et al.*, 1996). Mais aucun facteur susceptible de reconnaître et de lier la tige-boucle du VIH n'a été identifié. Un criblage génétique semblable à celui réalisé par Dinman et Wickner chez la levure pourrait peut-être révéler l'existence d'un tel facteur (Dinman et Wickner, 1995). D'autre part, il a été montré que chez le VIH, tout comme chez le VHLT-II, la distance optimale entre la séquence glissante et la tige-boucle est de 7 bases. Toute variation de cette distance altère l'efficacité du "frameshift" du VHLT-II (Kollmus *et al.*, 1994), ce qui favorise l'hypothèse d'une interaction entre la tige-boucle et le ribosome.

Cependant, si l'on considère le fait qu'une tige-boucle stimule moins efficacement le "frameshift" programmé -1 qu'un pseudo-noeud, on peut se demander pourquoi certains virus ont sélectionné cette structure secondaire. Un élément de réponse réside peut-être dans le rapport "Gag/Gag-Pol" dont toute variation affecte la propagation des virus (voir section 1.2.2.4). Ce rapport, qui varie d'un virus à l'autre, est défini pour chacun d'entre eux. Grâce au "frameshift" programmé, il est étroitement contrôlé. Ainsi, la séquence glissante du VIH-1 associée au pseudo-noeud du VTMS permet, *in vitro*, une efficacité de "frameshift" six fois plus importante que lorsqu'elle est associée à la tige-boucle du VIH-1 (Chamorro *et al.*, 1992). *In vivo*, une telle efficacité accrue ne devrait pas permettre une meilleure propagation du virus (Karacostas *et al.*, 1993). D'autre part, la production de certaines protéines nécessaires au cycle viral du VTMS requiert deux événements de "frameshift" programmé, le deuxième dépendant de la réalisation du premier (revue dans Gesteland et Atkins, 1996). Ceci pourrait expliquer pourquoi le VTMS a sélectionné un pseudo-noeud comme structure stimulatrice de son premier site de "frameshift".

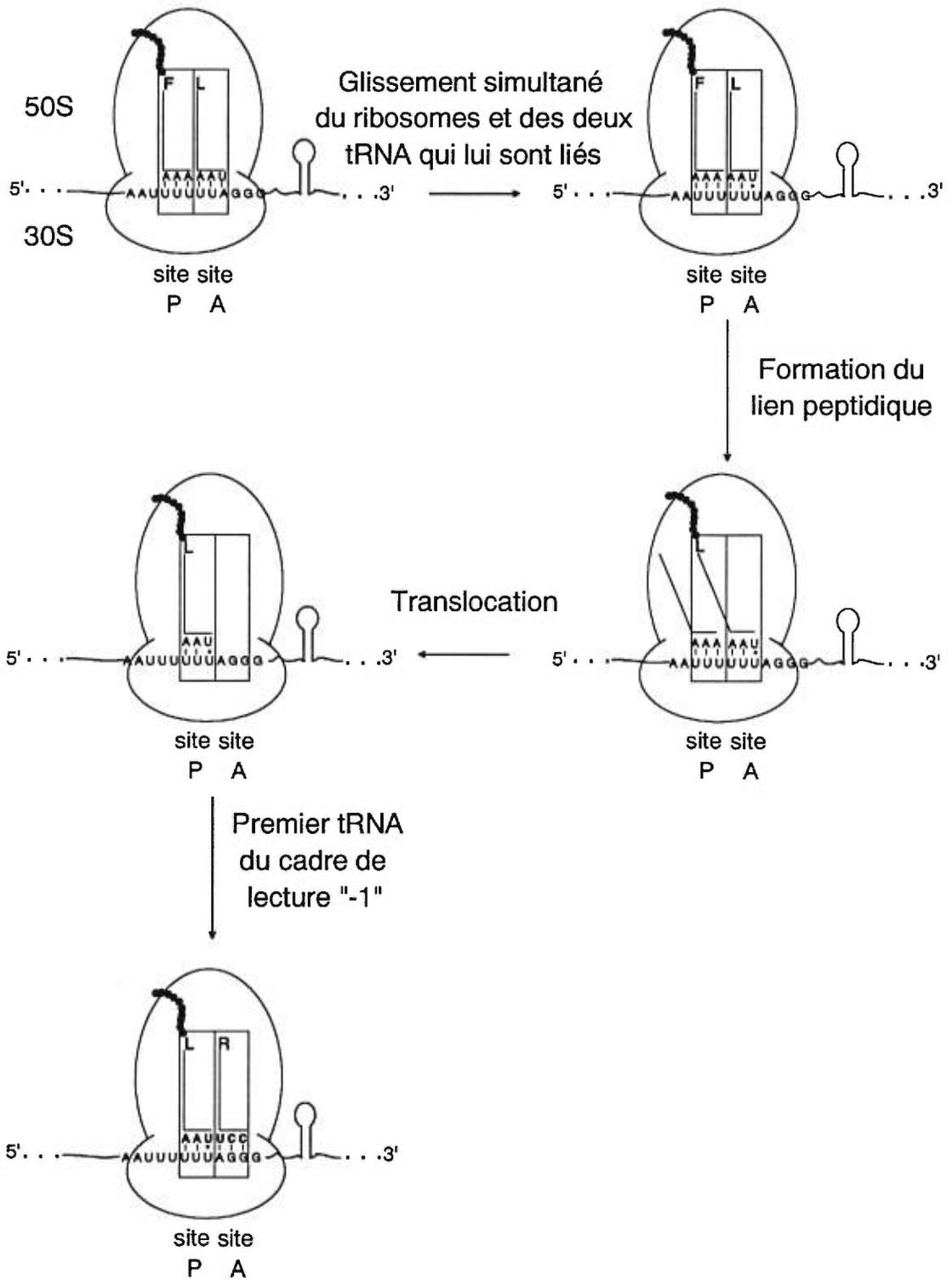
1.3.1.2 Les modèles de mécanismes de "frameshift" programmé -1

Lorsque l'équipe de Varmus identifia les signaux du messenger nécessaires au "frameshift" programmé -1 du VSR en utilisant un système de traduction eucaryote *in vitro*, elle montra également, à l'aide de mutations dans la séquence glissante, que le "frameshift" implique le glissement de deux tRNA adjacents (Jacks *et al.*, 1988b). Un modèle de mécanisme tenant compte de l'ensemble des données obtenues fut alors proposé, et intitulé le "modèle du glissement simultané".

Ce modèle (Fig. 1-6) propose que le ribosome et les deux tRNA qui lui sont liés se déplacent simultanément d'un nucléotide en direction 5' du mRNA, ce qui les fait glisser du cadre de lecture 0 au cadre de lecture -1. L'allure générale de la séquence glissante étant de type $X_1 X_2 X_3 Y_4 Y_5 Y_6 Z_7$, les deux tRNA liés aux codons $X_2 X_3 Y_4$ et $Y_5 Y_6 Z_7$ du cadre de lecture 0 se retrouvent respectivement liés aux codons $X_1 X_2 X_3$ et $Y_4 Y_5 Y_6$ du cadre de lecture -1 suite au glissement. Ceci permet d'expliquer pourquoi l'acide aminé

Figure 1-6: Modèle du mécanisme du glissement simultané selon Jacks *et al.* (1988b)

Le glissement simultané du ribosome et des deux tRNA qui lui sont liés s'effectue avant la formation du lien peptidique alors que le phénylalanyl-tRNA porteur du polypeptide en croissance occupe le site P/P, et que le leucyl-tRNA est au site A/A. Le premier acide aminé du cadre de lecture -1 à être incorporé est une arginine. "F": phénylalanine; "L": leucine; "R": arginine.

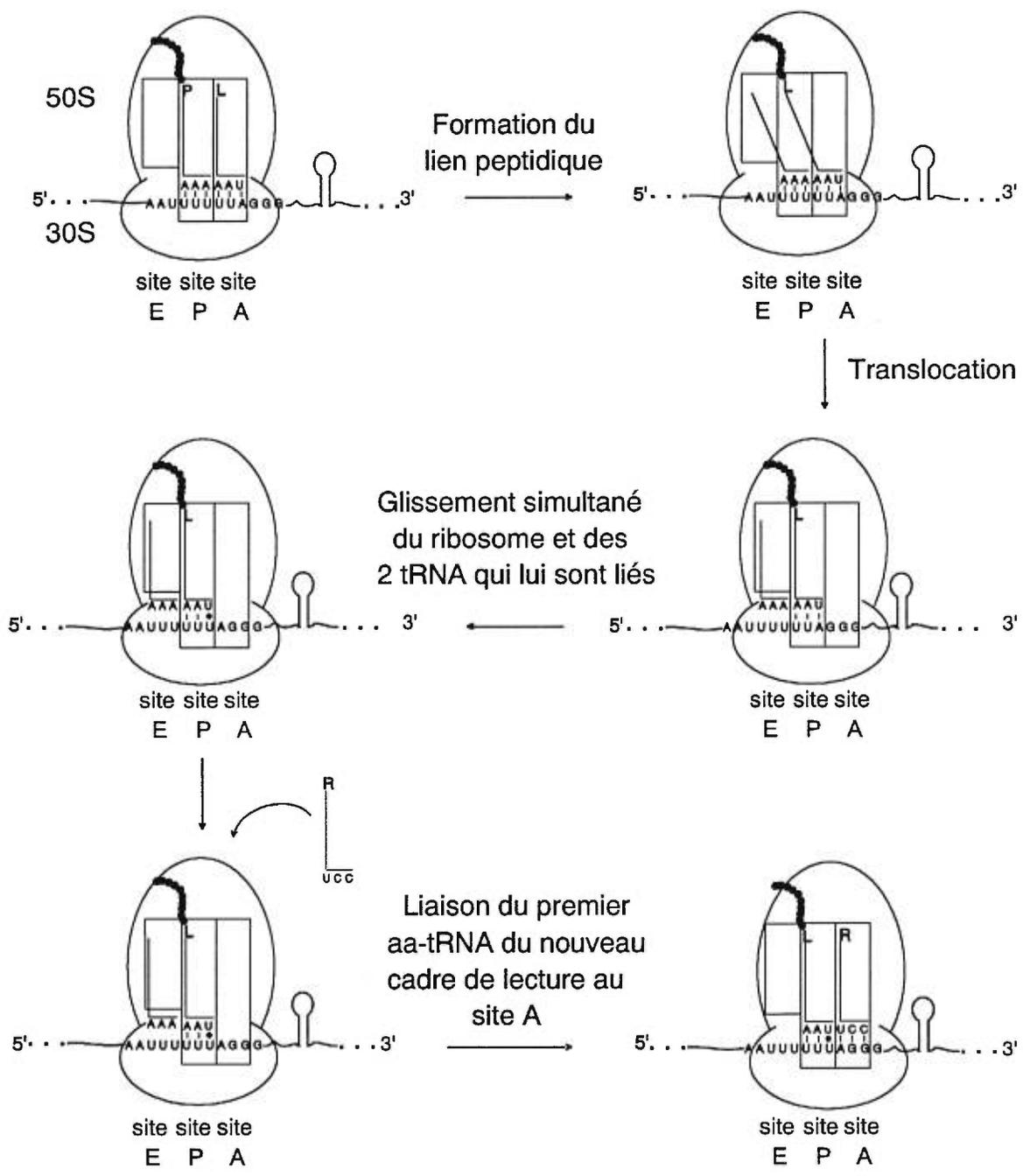


correspondant au codon $Y_5Y_6Z_7$ est incorporé dans la protéine issue de la traduction avec changement de cadre de lecture. De plus, d'après ce modèle, le "frameshift" programmé ne peut se produire qu'avec des tRNA capables de s'apparier dans le cadre de lecture -1 par au moins deux des trois bases de leur anticodon. La séquence glissante aiderait à satisfaire cette condition, la succession des triplets XXX et YYY permettant aux tRNA de rester appariés par les deux premières bases de leur anticodon (revue dans Farabaugh, 1996a). Ce modèle permet également d'intégrer le fait qu'une structure secondaire, située quelques nucléotides en aval de la séquence glissante, participe au "frameshift" en induisant une pause dans la progression des ribosomes. Cette pause augmenterait la probabilité que le ribosome et les deux tRNA qui lui sont liés glissent simultanément dans le cadre de lecture - 1.

Comme l'illustre la Figure 1.6, le modèle original du glissement simultané (Jacks *et al.*, 1988b) propose que le glissement dans le cadre de lecture -1 se fait avant la formation du lien peptidique, alors que l'aminoacyl-tRNA occupe le site A/A, et que le peptidyl-tRNA occupe le site P/P. D'autres groupes ont tenté de raffiner ce modèle en étudiant *in vivo* le mécanisme du "frameshift" programmé - 1 du VTMS ou du VIH chez *E. coli*. Ainsi, le groupe de Gesteland avait proposé que le glissement simultané des deux tRNA liés au ribosome se fait après la formation du lien peptidique, avant ou au cours de la translocation (Weiss *et al.*, 1989). Cependant, l'absence d'effet de la protéine antivirale du "pokeweed" (PAP), un inhibiteur spécifique de la translocation, sur le "frameshift" programmé -1 suggère que le changement de cadre de lecture ne s'effectue pas après la réaction peptidyl-transférase (Tumer *et al.*, 1998). Un troisième modèle propose que le glissement simultané s'effectue après la translocation, alors que les tRNA occupent les sites P/E et P/P (Horsfield *et al.*, 1995; Fig. 1-7). Ce modèle est basé sur la constatation que l'introduction d'un codon stop, immédiatement en 3' de la séquence glissante du VIH, peut influencer l'efficacité du "frameshift" par un mécanisme faisant intervenir le facteur de terminaison. Mais ce modèle présente un inconvénient: le glissement simultané du ribosome et des deux tRNA qui lui sont liés suppose que ces derniers participent à une interaction codon-anticodon avec le mRNA. Or, un tRNA situé au site E n'est plus impliqué dans une telle

Figure 1-7: Modèle du mécanisme du glissement simultané selon Horsfield *et al.* (1995)

Le glissement simultané du ribosome est des deux tRNA qui lui sont liés s'effectue après la translocation, alors que le leucyl-tRNA porteur du polypeptide en croissance occupe le site P/P, et que le tRNA désaminoacylé est au site de sortie du ribosome (site E) situé sur la sous-unité 50S. Le premier acide aminé du cadre de lecture - 1 a être incorporé dans la protéine est une arginine. "F": phénylalanine; "L": leucine; "R": arginine.



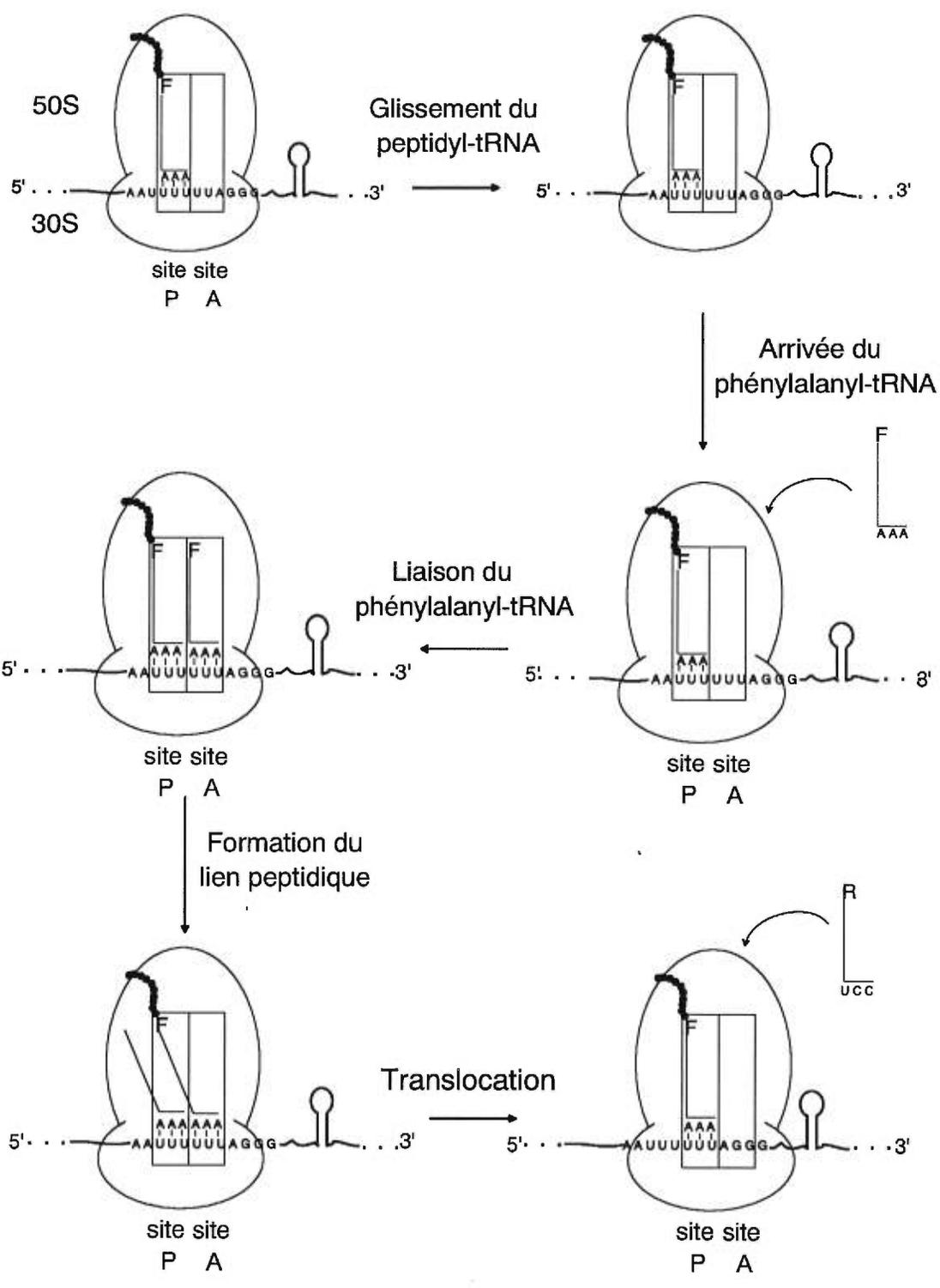
interaction (revue dans Green et Noller, 1997). Les résultats obtenus par Horsfield *et al.* peuvent néanmoins être expliqués par un autre type de mécanisme, lui aussi post-translocationnel, mais n'impliquant le glissement que d'un seul tRNA localisé au site P (Yelverton *et al.*, 1994; voir ci-dessous). Même si le modèle du glissement simultané proposé par l'équipe de Varmus semble être largement favorisé dans la littérature, il ne permet pas d'expliquer la totalité du phénomène du "frameshift" programmé - 1. Ceci suggère que plus d'un mécanisme intervient dans la réalisation du changement de cadre de lecture. Dans le cas du VIH, le séquençage des protéines a montré que dans environ 70% des cas, l'heptamère U UUU UUA guide la production d'une protéine "Gag-Pol" dans laquelle une leucine, correspondant au codon UUA du cadre de lecture 0, a été incorporée. La production d'une telle protéine "Gag-Pol" peut être expliquée par le mécanisme du glissement simultané. Mais, dans 30% des cas, le séquençage montre que la leucine est remplacée par une phénylalanine qui correspond au codon UUU (Jacks *et al.*, 1988a). Ceci signifie que le glissement a eu lieu avant que le leucyl-tRNA ne se lie au ribosome, et suggère un mécanisme impliquant le glissement d'un seul tRNA, le peptidyl-tRNA localisé au site P/P (Fig. 1-8). D'après ce mécanisme, le phénylalaninyl-tRNA porteur du polypeptide en croissance glisserait du cadre de lecture 0 au cadre de lecture -1 alors qu'il occupe le site P/P du ribosome, et que le site A est vide, donc après la translocation. De cette façon, le prochain codon à être lu est un codon UUU, qui est en fait le premier codon du cadre de lecture -1 (Yelverton *et al.*, 1994). Le glissement du ribosome selon un tel mécanisme pourrait aussi avoir lieu alors que le leucyl-tRNA porteur de la chaîne polypeptidique naissante occupe le site P/P, ce qui expliquerait les résultats de Horsfield *et al.* Dans ce cas, le premier acide aminé du cadre de lecture - 1 incorporé dans la protéine serait une arginine, comme dans le modèle du glissement simultané.

1.3.2 LE "FRAMESHIFT" PROGRAMMÉ - 1 CHEZ LES PROCARYOTES

Les "frameshifts" programmés -1 procaryotes constituent un groupe plus disparate que leur homologues eucaryotes quant aux éléments nécessaires à leur réalisation. Tout comme chez les eucaryotes, le changement de cadre de lecture s'effectue au niveau d'une séquence

Figure 1-8: Modèle de mécanisme impliquant le glissement d'un seul tRNA (Yelverton *et al.*, 1994)

Le glissement s'effectue après la translocation, alors que le phénylalanyl-tRNA porteur du polypeptide en croissance est au site P/P, et que le site A est libre. Le prochain aa-tRNA n'interagit avec le ribosome qu'après la réalisation du changement de cadre de lecture. Le premier acide aminé du cadre de lecture - 1 a être incorporé dans la protéine est une phénylalanine. "F": phénylalanine; "R": arginine.



glissante. Celle-ci peut être heptamérique et de type conventionnel X XXY YYZ comme dans le cas du gène *dnaX*, mais il existe des exceptions. Parmi ces exceptions, se trouvent la séquence d'insertion (SI) *I*. Les SI sont des éléments transposables des bactéries qui codent pour une transposase responsable de l'insertion de leurs copies dans le chromosome bactérien. Dans le cas de la SI *I*, bien que le site de "frameshift" contienne un heptamère AAA AAC, seules les quatre premières adénines sont nécessaires au changement de cadre de lecture (Sekine *et al.*, 1992). Une telle séquence implique que le "frameshift" résulte du glissement d'un seul tRNA localisé au site P, comme celui proposé par Yelverton *et al.* (1994) dans le cas du VIH.

Du point de vue des éléments stimulateurs de l'efficacité du "frameshift", les "frameshifts" programmés -1 procaryotes diffèrent des eucaryotes. En effet, le pseudo-noeud du site de "frameshift" de la SI 3 constitue le seul cas connu de pseudo-noeud impliqué dans l'efficacité du "frameshift" programmé -1 chez les procaryotes (Sekine *et al.*, 1994). La plupart des sites de "frameshift" sont dotés d'une tige-boucle en 3' de leur séquence glissante. De plus, la tige-boucle serait aussi, sinon plus efficace que le pseudo-noeud pour stimuler le "frameshift" programmé -1 chez les procaryotes (Brierley *et al.*, 1997). D'autre part, la nature et le nombre des stimulateurs chez les procaryotes varie d'un cas à l'autre. Ainsi, le site de "frameshift" qui assure le passage entre les cadres de lecture des gènes G et T de la queue du bactériophage λ ne possède aucune structure secondaire stimulatrice apparente (Levin *et al.*, 1993), alors que deux éléments stimulateurs sont nécessaires au "frameshift" du gène *dnaX* de *E. coli* (voir section 1.2.2.2, Fig.1-2B). En plus d'être doté d'une tige-boucle en 3' de la séquence glissante (Larsen *et al.*, 1997), le site de "frameshift" du gène *dnaX* comporte aussi une séquence de type Shine-Dalgarno localisée 10 nucléotides en amont de la séquence glissante, et interagissant avec le rRNA 16S (Larsen *et al.*, 1994). Ces deux stimulateurs sont essentiels pour maintenir la forte efficacité de ce "frameshift" qui est de 50 %, et leurs actions sont indépendantes (Larsen *et al.*, 1997). La distance séparant la séquence Shine-Dalgarno de la séquence glissante est aussi un élément essentiel à la réalisation d'un "frameshift" efficace. La distance optimale se situe entre 10 et 13 nucléotides (Larsen *et al.*, 1994). Toute diminution ou augmentation de

la longueur de cette distance entraîne une baisse de l'efficacité du "frameshift". Chose curieuse, le même type de séquence Shine-Dalgarno stimule le "frameshift" programmé + 1 du gène *prfB*, mais cette séquence n'est séparée que de 3 nucléotides de la séquence glissante (revue dans Farabaugh, 1996b). Il est probable que, dans le cas du gène *dnaX*, l'interaction rRNA-mRNA stimule le "frameshift" programmé - 1 en créant une tension, alors que dans le cas du gène *prfB* cette même interaction créerait une compression qui stimulerait l'efficacité du "frameshift" programmé +1 (revue dans Larsen *et al.*, 1995).

1.4 BUT DU PROJET DE RECHERCHE

Le but de notre projet de recherche est de raffiner le modèle du glissement simultané proposé par le groupe de Varmus. Comme mentionné à la section 1.3.2, ce modèle propose que le changement du cadre de lecture s'effectue avant la formation du lien peptidique, alors que l'aminocyl-tRNA et le peptidyl-tRNA sont aux sites A/A, et P/P respectivement. Cependant, une fois que l'aminocyl-tRNA occupe le site A/A, la formation du lien peptidique s'effectue très rapidement (Bilgin *et al.*, 1991), ce qui ne laisserait pas beaucoup de temps aux ribosomes pour glisser du cadre de lecture 0 au cadre de lecture - 1. Nous proposons donc que le glissement simultané s'effectuerait avant la formation du lien peptidique, alors que le peptidyl-tRNA est au site P/P, et que l'aminocyl-tRNA est au site A/T.

Pour tester notre hypothèse, nous avons choisi d'étudier l'effet d'agents inhibant spécifiquement certaines étapes de l'élongation. Les agents que nous avons choisis étant des antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique des bactéries, il nous fallait un système de traduction procaryote. Jusqu'à présent, le "frameshift" programmé -1 du VIH-1 n'avait jamais été reproduit dans un système de traduction procaryote *in vitro*. La première étape du projet consiste donc à reproduire ce "frameshift" dans un système acellulaire d'*E. coli*, l'extrait S30. Pour cela, nous avons construit le vecteur pCPCAT(-1) en modifiant le gène rapporteur de la chloramphénicol acétyltransférase (CAT) contenu dans un plasmide dérivé de Bluescript, et placé sous contrôle du promoteur du phage T7. Nous avons inséré, au

début de la région codante de la protéine CAT, la séquence du "frameshift" du VIH-1. La séquence insérée comporte la séquence glissante suivie, quelques nucléotides en aval, de la séquence palindromique codant pour la tige-boucle. Avec une telle construction, la protéine CAT n'est produite que par les ribosomes qui changent de cadre de lecture. Nous avons aussi construit un vecteur contrôle, pCPCAT(0). Pour la construction de ce vecteur, la séquence insérée contient un nucléotide de plus à la base de la tige-boucle de telle sorte que seuls les ribosomes qui ne changent pas de cadre de lecture produisent la protéine CAT. Les messagers CPCAT(-1) et CPCAT(0) sont obtenus par transcription *in vitro*, puis traduits dans l'extrait S30 en présence, ou en absence de [³⁵S]methionine. Les produits de traduction marqués radioactivement sont séparés par SDS-PAGE, puis les gels sont autoradiographiés, et la quantité de protéine CAT produite dans chaque cas est évaluée par analyse densitométrique des bandes correspondant à la protéine CAT. Les protéines non marquées radioactivement sont utilisées pour quantifier la protéine CAT produite soit par une méthode immunologique (CAT ELISA), soit par la mesure de l'activité enzymatique de la protéine CAT produite. Les résultats obtenus montrent que le "frameshift" programmé -1 du VIH-1 est reproductible dans un système de traduction procaryote *in vitro*.

Nous avons ensuite étudiés l'effet de trois antibiotiques, la néamine, la spectinomycine et la streptomycine (Vázquez, 1979), sur le "frameshift" programmé - 1 du VIH-1. Nous avons donc traduits les messagers CPCAT(0) et CPCAT(-1) en absence ou en présence de faibles doses de chacun de ces trois agents. La néamine accélérant l'occupation du site A/A au cours de la synthèse protéique devrait, d'après notre hypothèse, diminuer l'efficacité du "frameshift" programmé - 1. La spectinomycine, quant à elle, bloque spécifiquement la translocation en interférant avec l'action du facteur EF-G. Par conséquent, elle ne devrait pas affecter l'efficacité du "frameshift" programmé -1 selon notre hypothèse. La streptomycine accélère tout comme la néamine l'occupation du site A/A. Nous nous attendions donc à ce qu'elle ait un effet similaire à la néamine, mais cet antibiotique nous réservait des surprises... Les résultats que nous avons obtenus confirment notre hypothèse, mais supportent également l'idée que le "frameshift" programmé - 1 du VIH-1 peut avoir lieu à deux étapes différentes du cycle de l'élongation, et faire ainsi intervenir deux

mécanismes distincts de changement de cadre de lecture comme l'avait proposé Yelverton *et al.* (1994).

Chapitre II

-Matériel et méthodes-

2.1 SOUCHES BACTÉRIENNES, ENZYMES ET PRODUITS CHIMIQUES

Les expériences de clonage ont été effectuées dans les bactéries *E. coli* XL1 Blue (recA1 endA1 gyrA96 thi⁻ hsdR17 supE44 relA1 lac⁻ F' [proA⁺B⁺ lacI^q ΔlacZM15 Tn10(tet^r)] ; Stratagene) contenant l'épisome F' de résistance à la tétracycline. Les expériences de mutagenèse dirigée ont fait intervenir la souche *E. coli* CJ236 (dut⁻ ung⁻ thi⁻ relA; pCJ105 (Cm^r); Bio-Rad). Les extraits acellulaires bactériens ont été préparés à partir de bactéries *E. coli* RD100 (sup⁻ rns⁻ pnp⁻ laZ⁻ met⁻ relA1 trpD9778; Dottin et Pearson, 1973).

Les enzymes de restriction, la T4 DNA ligase, la RNA-guard (inhibiteur de RNAses), les ribonucléotides 5'-triphosphates, et la DNase I exempte de RNAses proviennent de Pharmacia. Le phosphoénol pyruvate, la pyruvate kinase, le GTP sous forme de sel de dilithium, les tRNA désaminoacylés de bactéries *E. coli* MRE600, l'IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside), la RNase A, l'ampicilline et la tétracycline proviennent de Boehringer-Mannheim. Les acides aminés, le glutamate de potassium, l'acide folinique (leucovorine), la pyrophosphatase inorganique, le n-butyryl coenzyme A et la spectinomycine (sous forme de sulfate de spectinomycine) proviennent de Sigma. La [³⁵S]méthionine, le scintillant Universol et la néamine proviennent d'ICN. L'Amplify et la [³H]phénylalanine proviennent d'Amersham, le [³H]chloramphénicol de New England Nuclear. Le PEG 8000 provient de Fisher, et la streptomycine (sous forme de sulfate de streptomycine) de Gibco BRL. La RNA polymérase du phage T7 a été préparée à partir du plasmide pAR1219 produit par la souche *E. coli* BL21 (F', ompT, r_B⁻, m_B⁻; Novagen; voir section 2.4.1).

Les oligonucléotides synthétiques ont été synthétisés avec l'appareil Gene Assembler de Pharmacia. L'appareil utilisé pour analyser les profils de migration sur gradient de sucrose est le ISCO UA-6. Les techniques classiques de biologie moléculaire utilisée dans cette étude sont adaptées de Maniatis *et al.* (1982), et de Sambrook *et al.* (1989).

2.2 TAMPONS

A. Tampons servant à la préparation de la RNA polymérase du phage T7:

- Tampon A1: Tris HCl 20 mM pH 8.1; NaCl 20 mM; EDTA 2 mM.
- Tampon A2: Tris HCl 50 mM pH 8.1; NaCl 20 mM; EDTA 2 mM; DTT 1 mM.
- Tampon A3: Phosphate de sodium 20 mM pH 7.7; EDTA 1 mM; DTT 1 mM; 5% glycérol contenant soit 100 mM NaCl (Tampon A3 / 100 mM NaCl), soit 10 mM NaCl (Tampon A3 / 10 mM NaCl).

B. Tampons servant à la préparation des extraits S30:

- Tampon B1: Tris acétate 10 mM pH 7.8; Mg(OAc)₂ 14 mM ; KOAc 60 mM; β-mercaptoéthanol 6 mM.
- Tampon B2: identique au tampon B1, mais contient 1 mM de DTT au lieu de 6 mM de β-mercaptoéthanol.
- Tampon B3: identique au tampon B1, mais contient 0.1 mM d'EDTA au lieu de 6 mM de β-mercaptoéthanol.

C. Tampons utilisés dans les électrophorèses:

- Tampon TBE: Tris base 89 mM; borate 89 mM; EDTA 2 mM, pH 8.0.
- Tampon de Laemmli 2X: Tris HCl 125 mM pH 6.8; glycérol 20 %; SDS 4 %; β-mercaptoéthanol 1.43 M; bromophénol 0.0025 %.
- Tampon SDS: Tris base 3 g, glycine 14.4 g et SDS 1 g par litre, pH 8.3.

D. Tampon utilisé dans la préparation des gradients de sucrose:

- Tampon C': Tris HCl 20 mM pH 7.8, Mg(Cl₂) 20 mM, NH₄Cl 100 mM, β-mercaptoéthanol 6 mM.

E. Milieu de culture:

- Milieu LB: bacto-tryptone 10 g, extrait de levure 5 g et NaCl 10 g par litre de solution, pH 7.0.

2.3 CONSTRUCTION DES VECTEURS pCPCAT(-1), ET pCPCAT(0)

Les vecteurs pCPCAT(-1) et pCPCAT(0) sont des plasmides qui contiennent le gène de la chloramphénicol acétyltransférase (CAT) modifié sous contrôle du promoteur T7. Le gène CAT du plasmide pCPCAT(-1) contient au début de sa séquence codante une insertion comportant la séquence glissante et la tige-boucle du VIH-1. Le gène CAT du plasmide pCPCAT(0) contient la même insertion, mais avec une paire de bases (pb) supplémentaire située en 5' de la séquence palindromique qui code pour la tige-boucle.

Ces deux vecteurs ont été construits à partir du plasmide pLRCAT (Rémy, 1994). Ce plasmide est un dérivé du phagemide pBluescript SK⁻ (Bullock *et al.*, 1987) dans lequel a été inséré un fragment Taq I -Taq I du plasmide pACY184 (Chang et Cohen, 1978; Rose, 1988) contenant le gène CAT. En plus de contenir la totalité de la séquence codante de la protéine CAT qui est de 660 pb, l'insertion du plasmide pACY184 comprend également une portion des régions 3' (87 pb) et 5' (29 pb) non traduites, incluant deux séquences Shine-Dalgarno.

La première étape de la construction des vecteurs pCPCAT(-1) et pCPCAT(0) fut la création, par mutagénèse dirigée selon la méthode de Kunkel (Kunkel, 1985; Kunkel *et al.*, 1987), d'un site de restriction Sph I au début de la séquence codante de la protéine CAT contenue dans le plasmide pLRCAT. Le plasmide issu de cette mutagénèse, dénommé pLRCCAT, possède donc un site Sph I unique qui permet de cliver immédiatement en 3' du codon initiateur du gène CAT. Ce plasmide a ensuite été digéré par l'enzyme Sph I, et ligasé par la T4 DNA ligase à 16°C pendant 16 heures avec un fragment de DNA synthétique de 62 bases pour la construction du vecteur pCPCAT(-1), ou de 63 bases pour la construction du vecteur pCPCAT(0) (Fig. 2-1). Pour la construction du vecteur

Figure 2-1 : Séquence des cassettes de DNA synthétique utilisées pour la construction des vecteurs possédant une insertion au début de la séquence codante du gène CAT

A: Séquence de la cassette de 62 nucléotides utilisée dans la construction du vecteur pCPCAT(-1) pour lequel l'expression du gène CAT dépend du changement de cadre de lecture.

B: Séquence de la cassette de 63 nucléotides utilisée dans la construction du vecteur pCPCAT(0). Le nucléotide supplémentaire qui permet de placer le site de "frameshift" du VIH, et la séquence codante de la protéine CAT dans le même cadre de lecture que le codon initiateur, est en caractère gras et est souligné.

Les nucléotides correspondant aux extrémités cohésives du site Sph I sont en italique, et sont soulignés.

Cassette de DNA synthétique pour la construction du plasmide pPCAT(-1):

*Sph*I
(brin -) 5' GGTCGACAGGCTAA TTTT TT AGGGAAGAT CTGGCCTT CCTACAAGGGAAGGCCA GGGA CATG 3'
(brin +) 3' GTACCCAGCTGTCCGA TT AAAAAA TCCC TTCTA GACCCGGAAGGATGTT CCCTT CCGGT CCC T *Sph*I

Cassette de DNA synthétique pour la construction du plasmide pPCAT(0):

*Sph*I
(brin -) 5' GGTCGACAGGCTAA TTTT TT AGGGAAGA A T CTGGCCTT CC TACAAGGGA GGCA GGGA CATG 3'
(brin +) 3' GTACCCAGCTGTCCGATT AAAAAA TCCC TTCT T AGACCCGGAAGG ATGTT CCCTT CCGGT CCC T *Sph*I

pCPCAT(-1), le fragment synthétique de DNA contient la séquence glissante et la tige-boucle du VIH-1, et possède des extrémités cohésives pour le site Sph I. Le fragment de DNA synthétique utilisé pour la construction du plasmide pCPCAT(0) est identique au précédent, mais possède une paire de bases supplémentaire en 5' de la séquence palindromique qui dirige la formation de la tige-boucle dans le messenger correspondant (Fig. 2-1 B). Des bactéries XL1 Blue compétentes ont ensuite été transformées avec les plasmides résultant de la ligation, et furent étalées sur gélose LB-agar contenant de l'ampicilline (150 µg/ml) et de la tétracycline (12.5 µg/ml). Les transformants ont été repiqués et cultivés dans un milieu LB liquide contenant les mêmes antibiotiques. Une mini-préparation de plasmide par la méthode de lyse alcaline a permis d'extraire le DNA plasmidique des bactéries. Ce DNA a été digéré par différents enzymes de restriction, puis les fragments de restriction obtenus ont été analysés par une électrophorèse sur gel d'agarose 1% (p/v) dans le tampon TBE afin d'identifier les clones positifs, c'est-à-dire ceux dont le plasmide possède l'insertion du VIH 1 dans la bonne orientation.

Il est à noter que les vecteurs pCPCAT(0) et pCPCAT(-1) ont été modifiés par mutagénèse dirigée afin de rendre l'environnement du codon initiateur "Kozak" (Kozak, 1989), ce qui permet de traduire efficacement les messagers correspondants dans un système de traduction eucaryote.

Toutes les constructions obtenues ont été vérifiées par séquençage selon la méthode de Sanger.

2.4 TRANSCRIPTION *IN VITRO*

2.4.1 PRÉPARATION DE LA RNA POLYMÉRASE DU PHAGE T7

La RNA polymérase du phage T7 est préparée dans le laboratoire selon la méthode de Zawadski et Gross (1991). Le plasmide pAR1219 (Sturdier et Moffat, 1986) contient le gène de la RNA polymérase du phage T7 sous contrôle du promoteur inductible *lac* UV5. Des cellules provenant de la souche *E. coli* BL21 (DE3), qui possèdent le plasmide pAR1219, sont cultivées jusqu'à une densité optique de 0.5 unité d'absorbance à 600 nm. Afin d'induire l'expression du gène de la RNA polymérase du phage T7, de l'IPTG est

ajouté de manière à avoir une concentration finale de 0.5 mM. Quatre heures après le début de l'induction, les cellules sont récoltées par une centrifugation de 15 minutes à 4000 rpm dans une Sorvall RC-3, puis elles sont lavées deux fois avec 100 ml de tampon A1 froid avant d'être stockées à -70°C jusqu'à utilisation. Après décongélation, les cellules sont resuspendues dans 24 ml de tampon A2 froid en présence d'inhibiteurs de protéases ("phénylméthylsulfonyl fluoride" (PMSF), leupeptine, et benzamidine). Les bactéries sont lysées avec du lysozyme fraîchement préparé. Ensuite, 2.5 ml de désoxylate de sodium d'une dilution à 0.8 % sont ajoutés, et le mélange est laissé sur la glace 20 minutes afin de compléter la lyse. La viscosité de l'extrait cellulaire est alors diminuée par sonication avec le sonicateur Heat System W185D. L'extrait cellulaire est ensuite précipité une première fois avec du sulfate d'ammonium 2 M et de la polyéthylamine, puis une seconde fois au sulfate d'ammonium seul. Le précipité est récolté par une centrifugation de 10 minutes à 4°C à 12 000 g, et le culot resuspendu dans 15 ml de tampon A3 / 100 mM NaCl avant d'être dialysé toute une nuit contre un litre de tampon A3 / 100 mM NaCl en présence d'inhibiteurs de protéases. La RNA polymérase du phage T7 est ensuite purifiée sur une colonne S-Sepharose FF (Pharmacia), et les fractions contenant l'enzyme, identifiées d'après leur activité transcriptionnelle, sont dialysées toute une nuit contre deux fois 500 ml de tampon A3 / 10 mM NaCl. Le lendemain, le précipité formé dans le sac à dialyse est récolté en centrifugeant 5 minutes à 10 000 g. Le culot est resuspendu dans 10 ml de Tampon A3 (100 mM NaCl), et est dialysé toute une nuit contre 900 ml de Tampon A3 / 100 mM NaCl. Le lendemain, le dialysat est aliquoté, et l'enzyme est stockée à - 80 °C. L'activité enzymatique de la T7 RNA polymérase est évaluée par comparaison avec la RNA polymérase du phage T7 commerciale (Pharmacia). Une telle méthode permet d'obtenir à partir d'un litre de culture bactérienne (soit environ 8 g de bactéries) une préparation de 42 000 unités de RNA polymérase du phage T7.

2.4.2 TRANSCRIPTION *IN VITRO* DU GÈNE CAT

Les RNA messagers CPCAT(-1) et CPCAT(0) sont générés par transcription *in vitro* des plasmides pCPCAT(-1) et pCPCAT(0) respectivement. Ces deux plasmides possèdent le

gène CAT modifié directement en aval du promoteur T7. Ils sont linéarisés au site BamH I situé dans la région 3' non traduite du gène CAT. La transcription *in vitro* (Beckler, 1993) est effectuée dans un volume total de 200 µl. Le mélange réactionnel a la composition suivante: Hepes-KOH 80 mM pH 7.5, MgCl₂ 12 mM, spermidine 2 mM, DTT 40 mM, 3 mM de chaque NTP, 20 unités de RNA-guard (inhibiteur de RNAses), 1 unité de pyrophosphatase inorganique, 20 µg de plasmide digéré, et 60 unités de RNA polymérase du phage T7. Le mélange est incubé 2 heures à 37°C, puis 15 minutes à 37°C avec 7.5 unités de DNase 1 de pancréas de bovin exempt de ribonucléases. Ensuite, 20 µl d'EDTA 0.5 M pH 8.0 sont ajoutés pour chélater les cations divalents. Deux extractions au phénol-chloroforme et une au chloroforme sont réalisées avant de précipiter les messagers à l'éthanol. Les culots sont resuspendus dans 100 µl d'eau Millipore, puis les messagers sont purifiés sur colonne MicroSpin™ G-50 (Pharmacia). La quantité de RNA messenger obtenu est évaluée par mesure de la densité optique à 260 nm (1 D.O. = 40 µg/ml de RNA), et leur pureté est vérifiée par une électrophorèse sur gel dénaturant 4% polyacrylamide/ 8M urée dans le tampon TBE. La taille des RNA messagers est contrôlée en faisant migrer parallèlement le messenger généré par la transcription du vecteur pLRCCAT. Les RNA messagers sont ensuite aliquotés et conservés à - 80 °C. Le rendement de la transcription est d'environ 10 µg de RNA pour 1 µg de plasmide.

2.5 PRÉPARATION DE L'EXTRAIT BACTÉRIEN S30

La méthode de préparation de l'extrait bactérien S30 est adaptée des méthodes décrites par Mackie *et al.* (1990), et par Nierhaus et Dohme (1981).

2.5.1 CULTURE CELLULAIRE ET PRÉPARATION DES EXTRAITS

L'extrait bactérien S30 est un extrait acellulaire préparé à partir de la souche *E. coli* RD100. Il est dépourvu de DNA et de messagers endogènes, mais contient tous les enzymes et les facteurs nécessaires à la traduction. En lui fournissant un messenger exogène, des acides aminés un système générateur d'énergie (PEP / pyruvate kinase) et certains

cofacteurs, l'extrait S30 produit uniquement la protéine correspondant au messenger fourni. Cet extrait permet la production de protéines enzymatiques actives telles que la protéine CAT, la luciférase, ou la β -galactosidase dont les activités peuvent être testées directement. D'autre part, l'extrait S30 permet de contrôler la synthèse protéique en ajoutant des acides aminés radioactifs comme la [35 S]méthionine. Les protéines ainsi marquées peuvent être visualisées par autoradiographie après électrophorèse. Il est à noter que l'extrait S30 est également fréquemment utilisé dans des systèmes de transcription/traduction couplées. Cependant, nous avons préféré l'utiliser comme simple système de traduction afin de pouvoir contrôler la quantité de messenger traduit.

Les cultures bactériennes d'*E. coli* sont réalisées dans 6 litres (12 x 500 ml) de milieu L.B. contenant 1 % de glucose. Les bactéries sont cultivées jusqu'à une densité optique de 0.7 unité d'absorbance à 660 nm ("mid-log phase"), puis elles sont refroidies rapidement dans un bain d'éthanol / glace sèche ("quick cool"). Dans ces conditions, les ribosomes restent figés sur le messenger qu'ils sont en train de traduire. Les bactéries sont ensuite récoltées par une centrifugation de 20 minutes à 4°C à 4 000 rpm dans une centrifugeuse Sorvall RC-3, et le culot est lavé dans 20 ml de tampon B1. Les bactéries sont recueillies après une centrifugation de 10 minutes à 4°C à 15 000 rpm dans un rotor SS-34. Le culot de bactéries est ensuite pesé, puis broyé avec deux fois son poids d'alumine dans un mortier refroidi sur la glace. Le broyat cellulaire mélangé à l'alumine est resuspendu dans 10 ml de tampon B2, et centrifugé à 4°C 10 minutes à 39 000 g afin de se débarrasser de l'alumine. Le surnageant est centrifugé à 4°C 30 minutes à 30 000 g pour enlever les débris cellulaires. Le surnageant (S30) est ensuite dialysé toute la nuit à 4°C contre un litre de tampon B3. L'extrait S30 est réparti en aliquotes de 130 μ l, et est conservé à - 80°C. Les extraits S30 sont caractérisés par la mesure de leur densité optique à 260 et 280 nm, et leur concentration en protéines est évaluée par dosage avec le réactif de Bradford (Bio-Rad) en utilisant la sérumalbumine de boeuf comme étalon. Il est à noter que la concentration des aliquots en ions magnésium est de 14 mM.

La quantité de ribosomes 70S contenus dans chaque préparation d'extrait S30 est évaluée en comparant le profil de migration sur gradient 10 % - 30 % de sucrose d'un échantillon de chaque extrait à celui d'une quantité connue de ribosomes 70S de la même souche purifiés. Les gradients sont préparés dans le tampon C' contenant 20 mM d'ions magnésium. Leur centrifugation est effectuée à 4°C pendant 20 heures à 20 000 rpm dans un rotor SW 41 Ti (Beckman).

2.5.2 PRÉINCUBATION DE L'EXTRAIT S30

Avant chaque traduction, le nombre d'aliqotes d'extrait S30 nécessaires est décongelé sur la glace. Pour chaque aliqote de 130 µl, 40 µl de mélange de préincubation sont ajoutés, et le mélange réactionnel est incubé 15 minutes à 37°C. La composition du mélange de préincubation est la suivante: Tris acétate 325 mM pH 7.8; PEP (fraîchement préparé) 29.3 mM; ATP 2.6 mM; Mg(OAc)₂ 9.1 mM; DTT 3.25 µM; acides aminés: 32.5 µM de chaque; pyruvate kinase 0.025 unité/µl. La concentration en ions magnésium de l'extrait S30 après la préincubation est de 13 mM.

2.5.3 OPTIMISATION DE L'EXTRAIT S30

Afin d'optimiser l'efficacité de la traduction, différents paramètres doivent être déterminés, dont la concentration optimale en ion magnésium qui est un paramètre critique pour le fonctionnement de l'extrait bactérien. La valeur exacte de cette concentration varie légèrement d'un extrait à l'autre. Elle est déterminée en estimant la stimulation de l'incorporation de [³H]phénylalanine (voir section 2.6) lors de la traduction du messenger sans insertion, le messenger issu de la transcription du plasmide pLRCCAT, dans l'extrait S30 en présence de différentes quantités de magnésium. Cette méthode est aussi employée pour déterminer la quantité optimale d'extrait S30 à ajouter au mélange réactionnel, ainsi que la quantité optimale de messenger à traduire.

2.6 TRADUCTION IN VITRO DANS L'EXTRAIT S30

Le protocole de traduction est adapté de Lesley, 1995.

Afin de visualiser l'effet d'antibiotiques sur le "frameshift" programmé -1, les messagers CPCAT(-1) et CPCAT(0) ont été traduits dans l'extrait S30 préincubé en absence et en présence de faibles quantités de néamine, de spectinomycine, ou de streptomycine. Les doses adéquates d'antibiotiques à utiliser pour nos expériences ont été déterminées empiriquement de manière à minimiser leur effet inhibiteur sur la synthèse protéique. Ces doses correspondent à un rapport (nombre de moles d'antibiotique)/(nombre de moles de ribosomes) de 12 pour 1 en ce qui concerne la néamine et la spectinomycine, et à un rapport de 6 pour 1 pour la streptomycine.

Les messagers sont décongelés sur la glace, réactivés par chauffage pendant 10 minutes à 65°C, puis remis sur la glace. La synthèse protéique est réalisée dans un volume de 50 µl en incubant 2 µg de messenger CPCAT(-1), ou CPCAT(0) (correspondant à environ 7 pmols) en présence, ou en absence d'antibiotiques, avec 10 µl de mélange réactionnel Lesley 2X (Tris acétate 175 mM pH 8.0; glutamate de potassium 950 mM pH 8.0; NH₄(OAc)₄ 150 mM; DTT 10 mM; Mg(OAc)₂ 40 mM; ATP 10 mM pH 7.0; GTP sous forme de sel de dilithium 2.5 mM pH 7.0; PEP (fraîchement préparé) 100 mM; tRNA désaminoacylés d'*E. coli* MRE600 0.5mg/ml; PEG 8000 175 mg/ml; acide folinique (leucovorine) 100 µg/ml), 10 µl d'un mélange contenant 1 mM de chacun des 20 acides aminés, de 40 unités de RNA-guard, et d'environ 2 unités de D.O._{260 nm} d'extrait S30, ce qui correspond à 1.1 unités de D.O._{260 nm} de ribosomes 70S soit 530 pmol/ml de 70S (pour les ribosomes 70S, 1 D.O._{260 nm} = 24 pmol/ml). La composition exacte du mélange traductionnel est la suivante: Tris acétate 69 mM pH 7.9, glutamate de potassium 190 mM pH 8.0, NH₄(OAc)₄ 30 mM, Mg(OAc)₂ 13 mM, KOAc 18 mM, DTT 2 mM, ATP 2 mM, GTP sous forme de sel de dilithium 0.5 mM, PEP 23 mM, tRNA d'*E. coli* 0.1 mg/ml, leucovorine 20 µg/ml, 23 µM de chaque acide aminé, PEG 8000 3.5 mg/ml, 0.12 unité de pyruvate kinase, 40 unités de RNA-guard, environ 2 unités de D.O._{260nm} d'extrait S30, 2 µg de messenger, et environ 20

ng/ml de néamine, de spectinomycine, ou de streptomycine. Le mélange traductionnel est incubé 20 minutes à 37°C. Puis, 5 µl de RNase A à 20 mg/ml sont rajoutés au mélange traductionnel qui est incubé 15 minutes supplémentaires à 37°C. Ce traitement permet d'arrêter la synthèse protéique.

Dans le cas d'une traduction en présence de [³⁵S]méthionine, le mélange d'acides aminés utilisé ne contient pas de méthionine, et de 1a [³⁵S]méthionine est ajouté de manière à avoir une concentration finale de 0.25 µM (soit 15 µCi par échantillon).

Pour optimiser l'efficacité de traduction de chaque extrait S30 (voir section 2.5.3), les extraits ont été incubés en absence et en présence du messenger sans insertion, LRCCAT. L'acide aminé marqué radioactivement ajouté au milieu traductionnel est la [³H]phénylalanine, sa concentration finale étant de 2 µM (soit 2.5 µCi par échantillon). Le mélange d'acides aminés utilisé est dépourvu de phénylalanine. La traduction terminée, les protéines marquées radioactivement sont précipitées avec de l'acide trichloroacétique (TCA) à une dilution de 5 % contenant 0.01 mg/ml de phénylalanine, mis sur la glace pendant 15 minutes, puis bouillis 3 minutes avant d'être filtrés sur des filtres de verre (Whatman). La quantité de radioactivité retenue sur les filtres est déterminée par un compteur β à scintillation (Rackbeta LKB de Wallac).

2.7 QUANTIFICATION DE L'EFFICACITÉ DU "FRAMESHIFT" PROGRAMMÉ **-1**

Afin d'évaluer l'efficacité du "frameshift" programmé lors de la traduction du messenger CPCAT(-1) dans l'extrait S30, trois méthodes différentes de quantification de la protéine CAT produite ont été expérimentées: la mesure par un test immunologique de la quantité de protéine CAT produite, le dosage de l'activité enzymatique de la protéine CAT produite, et la mesure de la quantité de protéine CAT marquée à la [³⁵S]méthionine après séparation des produits de la traduction par SDS-PAGE.

2.7.1 DÉTERMINATION PAR TEST IMMUNOLOGIQUE DE LA QUANTITÉ DE PROTÉINE CAT PRODUITE

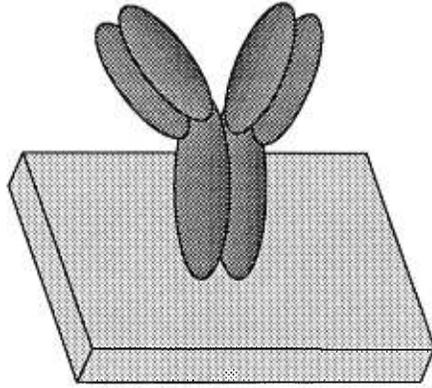
Nous avons utilisé la trousse de CAT-ELISA ("enzyme-linked immunosorbant assay") de Boehringer-Mannheim. La méthode du CAT-ELISA est une méthode immunologique de quantification de la protéine CAT. Le principe de cette technique est le suivant (Fig. 2-2): des dilutions du volume traductionnel contenant la protéine CAT sont mises dans des puits de titration où la protéine CAT est liée par des anticorps anti-CAT recouvrant les puits. Puis, des anticorps anti-CAT couplés à la digoxigénine sont ajoutés, et se lient à la protéine CAT qui est alors prise en sandwich entre deux types d'anticorps. La digoxigénine est ensuite liée à son tour par des anticorps anti-digoxigénine conjugués à la peroxydase. Finalement, le substrat de la peroxydase, l'ABTS[®], est ajouté dans les puits. L'enzyme catalyse le clivage du substrat, ce qui conduit à la formation d'un produit de réaction coloré. L'absorbance de l'échantillon est déterminée en utilisant un lecteur de plaques ELISA (Dynatech, modèle MR600), et est directement proportionnelle à la quantité de CAT présente dans le puits. La lecture des plaques se fait à une longueur d'onde de 405 nm.

2.7.2 DOSAGE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA PROTÉINE CAT

Chez les souches *d'E.coli* résistantes au chloramphénicol, la protéine CAT inactive cet antibiotique en acétylant ses groupements hydroxyles. Le chloramphénicol modifié ne peut alors plus se lier aux ribosomes. L'activité enzymatique de la protéine CAT peut être reproduite *in vitro* en incubant la protéine en présence de [³H]chloramphénicol, et de n-butyryl coenzyme A. Ce dernier est utilisé comme donneur de groupements butyryles qui peuvent remplacer les groupements acétyles. L'activité de la protéine CAT étant proportionnelle à la quantité de protéine CAT présente dans le mélange réactionnel, nous avons dosé l'activité de la protéine CAT produite par la traduction de nos messagers dans l'extrait S30. La composition du mélange réactionnel est la suivante: une quantité variable de la protéine CAT provenant du mélange traductionnel, 3.2 μM [³H]chloramphénicol

Figure 2.2: Principe du CAT-ELISA

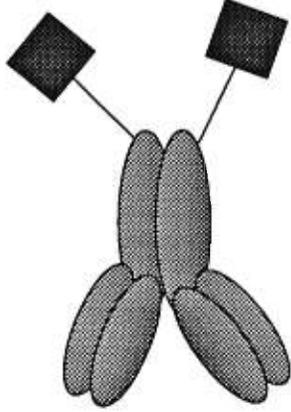
La protéine CAT provenant des échantillons à analyser est prise en "sandwich" entre les anticorps anti-CAT qui recouvrent les puits de la plaque de titration, et des anticorps anti-CAT couplés à la digoxigénine. Cette protéine est liée à son tour par des anticorps anti-digoxigénine couplés à la peroxydase. La présence des complexes antigène-anticorps, et donc de la protéine CAT, est révélée en ajoutant le substrat de la peroxydase, l'ABTS[®], dont le clivage conduit à la formation d'un produit de réaction coloré. D'après le catalogue de Boehringer-Mannheim (1998).



Puits recouvert d'anticorps anti-CAT



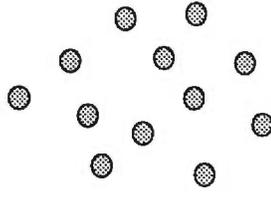
Protéine CAT



Anticorps anti-CAT couplé à la digoxigénine



Anticorps anti-digoxigénine couplé à la peroxydase



ABTS, substrat de la peroxydase

(200Ci/mol), 0.2 mg/ml n-butyryl coenzyme A. Le volume réactionnel est complété à 125 μ l avec du Tris HCl 0.25 M pH 8.0. Le mélange est incubé 2 heures à 37 °C, puis trois extractions au xylène sont réalisées. Ces extractions permettent de séparer le [³H]chloramphénicol du [³H]chloramphénicol butyrylé qui est soluble dans la phase organique (Seed et Sheen, 1988). Ce dernier peut donc être quantifié par mesure de la radioactivité contenue dans la phase organique à l'aide d'un compteur β à scintillation (Rackbeta LKB de Wallac) après avoir ajouter du scintillant Universol. Une courbe de calibration réalisée avec des quantités connues de CAT commerciale (Promega) a permis de contrôler le dosage de l'activité CAT provenant des échantillons de traduction.

2.7.3 QUANTIFICATION DE LA PROTÉINE CAT MARQUÉE À LA [³⁵S]MÉTHIONINE APRÈS SÉPARATION DES PRODUITS DE LA TRADUCTION SUR SDS-PAGE

La quantité de protéine CAT produite lors de la traduction des messagers CPCAT(0) et CPCAT(-1) dans un extrait S30 peut être évaluée en incorporant de la [³⁵S]méthionine dans les produits de la traduction qui sont ensuite séparés sur SDS-PAGE. Les gels obtenus sont autoradiographiés, et l'intensité des bandes correspondant à la protéine CAT quantifiée à l'aide d'un densitomètre.

Après la traduction, les protéines sont précipitées avec 6 volumes d'acétone, et placées à -20°C pendant une heure. Elles sont récoltées par une centrifugation de 15 minutes à 13 000 rpm (centrifugeuse Baxter de Canlab), et les culots sont lyophilisés. Les protéines sont ensuite resuspendues dans le tampon de Laemmli, bouillies 3 minutes, puis placées sur la glace avant d'être mises sur un gel de polyacrylamide / SDS 0.1 %. La concentration en polyacrylamide du "stacking gel" est de 6%, celle du gel de séparation est de 17.5 %. La migration des protéines est réalisée dans du tampon SDS. Tant que les protéines n'ont pas quitté le "stacking gel", la migration se fait sous un courant de 100 volts, puis le voltage est augmenté à 180 volts. Sur le même gel, nous avons fait migrer un mélange de marqueurs de poids moléculaire précolorés dit "low range" (Bio-Rad) afin de contrôler la migration

des protéines, et de pouvoir déterminer l'emplacement de la protéine CAT produite par la traduction des messagers CPCAT(0), et CPCAT(-1). La migration des protéines terminée, le gel est trempé pendant 15 à 20 minutes dans une solution 40 % méthanol, 10 % acide acétique afin de fixer les protéines. Puis, le gel est trempé pendant 30 minutes dans une solution d'Amplify (Amersham). Le gel est ensuite séché avec un sécheur de gel (Gel Dryer modèle 583 de Bio-Rad), puis autoradiographié. L'intensité des bandes de l'autoradiogramme correspondant à la protéine CAT est ensuite quantifiée à l'aide du densitomètre LKB Ultrascan XL Laser.

Chapitre III

-Résultats-

3.1 CONSTRUCTION DES VECTEURS CONTENANT LE GÈNE RAPPORTEUR CAT EN VUE DE L'ÉTUDE DU "FRAMESHIFT" PROGRAMMÉ - 1 RIBOSOMIQUE

La première étape de notre travail a consisté à construire un vecteur contenant un gène rapporteur dont l'expression dépend d'un changement de cadre de lecture ribosomique programmé, ou "frameshift" programmé -1. Le gène rapporteur que nous avons choisi d'utiliser est celui de la chloramphénicol acétyltransférase (CAT), une protéine bactérienne produite par les souches d'*E. coli* résistantes au chloramphénicol. Pour construire les vecteurs qui allaient être utilisés dans notre étude, nous avons modifié le plasmide pLRCAT (Rémy, 1994), qui est un dérivé du phagemide pBluescript SK. Le plasmide pLRCAT contient, sous contrôle du promoteur du phage T7, la séquence codante du gène CAT (660 pb) encadrée par une portion de la région 3' non traduite (87 pb), et une portion de la région 5' non traduite (29 pb) incluant deux séquences Shine-Dalgarno. Dans un premier temps, nous avons créé, par mutagenèse dirigée, un site de restriction Sph I permettant de cliver immédiatement en 3' du codon initiateur du gène CAT (voir Fig. 3-1). Le vecteur ainsi obtenu a été nommé pLRCCAT. A partir de ce plasmide, nous avons construit le vecteur pCPCAT(-1) pour lequel l'expression du gène CAT dépend du "frameshift" programmé -1 du VIH-1. Le plasmide pLRCCAT a été digéré avec l'enzyme Sph I, et une cassette de DNA synthétique de 62 nucléotides possédant des extrémités cohésives pour le site Sph I a été insérée. Cette cassette contient la séquence de "frameshift" du VIH-1, c'est-à-dire la séquence glissante UUU UUU A suivie de la séquence palindromique dirigeant la formation de la tige-boucle dans le messenger correspondant, les deux séquences étant distantes de 7 nucléotides. L'insertion de cette séquence en 3' du codon initiateur implique que, lors de la traduction du messenger CPCAT(-1), la protéine CAT ne sera produite que par des ribosomes qui auront glissé au niveau de la séquence de "frameshift" dans le cadre de lecture -1. La Figure 3-2 A résume les caractéristiques du vecteur pCPCAT(-1).

Figure 3.1 : Construction des vecteurs contenant le gène rapporteur CAT modifié en vue de l'étude du "frameshift" programmé -1 ribosomique

Le plasmide de départ est le vecteur pLRCAT, un dérivé du phagemide pBluescript SK dans lequel a été insérée, sous contrôle du promoteur T7, la séquence codante de la protéine CAT provenant du plasmide pACY184. pLRCAT a d'abord été modifié par la création, par mutagenèse dirigée, d'un site de restriction Sph I, de manière à pouvoir cliver immédiatement en 3' du codon initiateur du gène CAT. Le plasmide ainsi obtenu est pLRCCAT. Afin de rendre la production de la protéine CAT dépendante d'un "frameshift" programmé -1, le vecteur pLRCCAT a été digéré par l'enzyme Sph I, et une cassette de DNA synthétique a été insérée conduisant à l'obtention du vecteur pCPCAT(-1). La cassette (62 nucléotides) contient la séquence de "frameshift" du VIH-1, c'est-à-dire la séquence glissante et la séquence dirigeant la formation d'une tige-boucle dans le messager correspondant. Un vecteur contrôle, pCPCAT(0), a été construit de manière à placer la séquence de "frameshift" et la séquence codante du gène CAT dans le même cadre de lecture que le codon initiateur. Pour ce faire, il y a eu insertion, dans le vecteur pLRCCAT digéré par l'enzyme Sph I, d'une cassette de DNA synthétique (63 nucléotides) contenant la séquence de "frameshift" du VIH-1, mais avec une paire de bases supplémentaires (base encerclée) située en 5' de la séquence codant pour la tige-boucle. Les nucléotides de l'extrémité 5' de la séquence codante du gène CAT sont représentés par groupe de 3, en tenant compte du glissement pour le vecteur pCPCAT(-1).

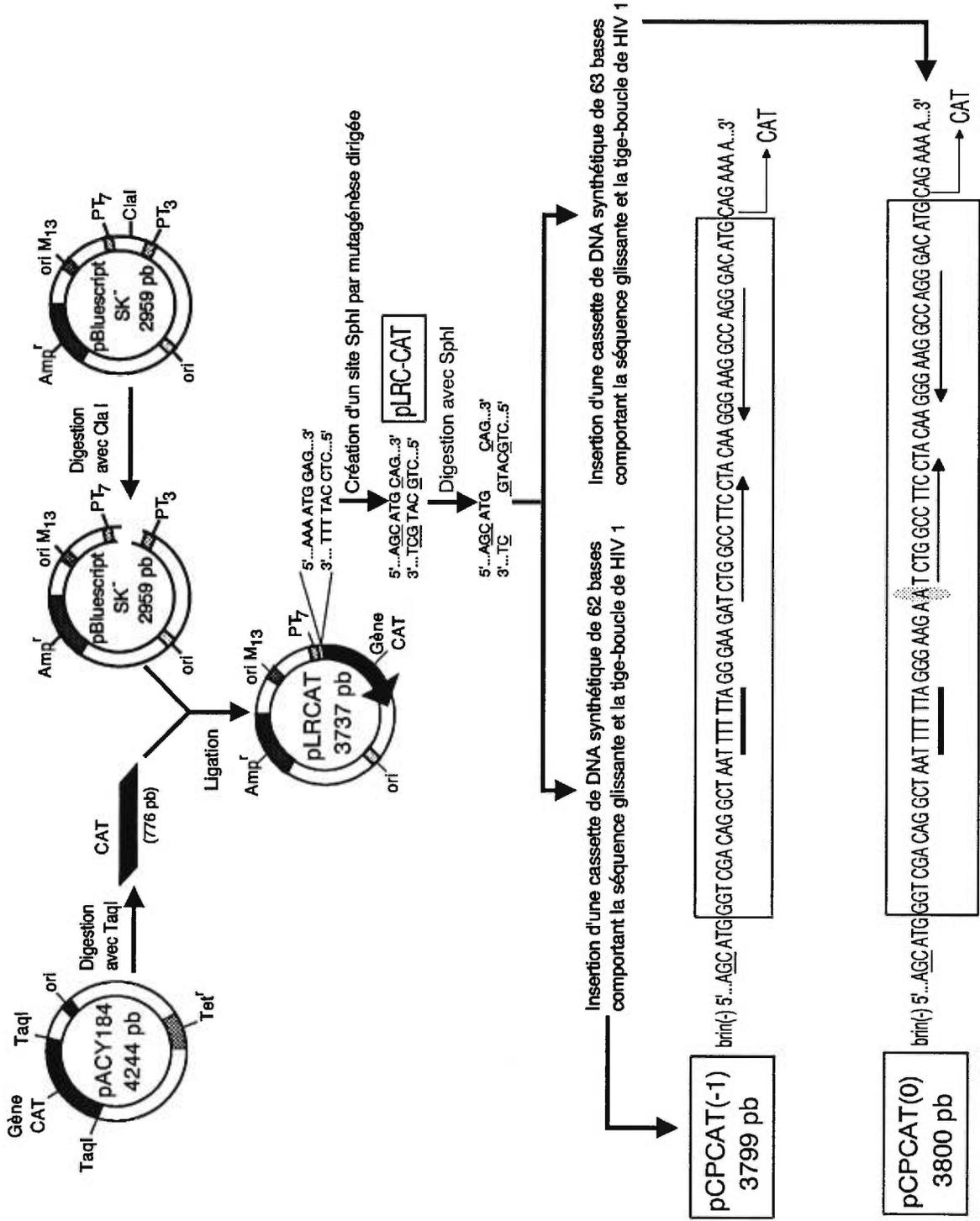
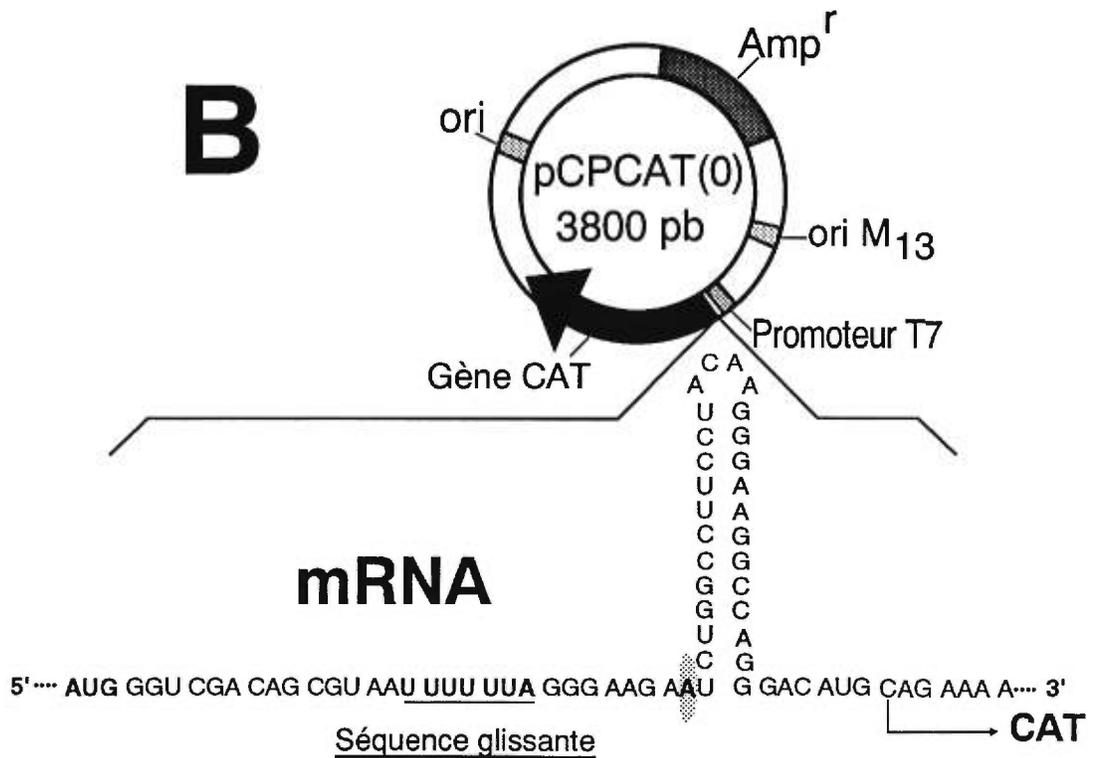
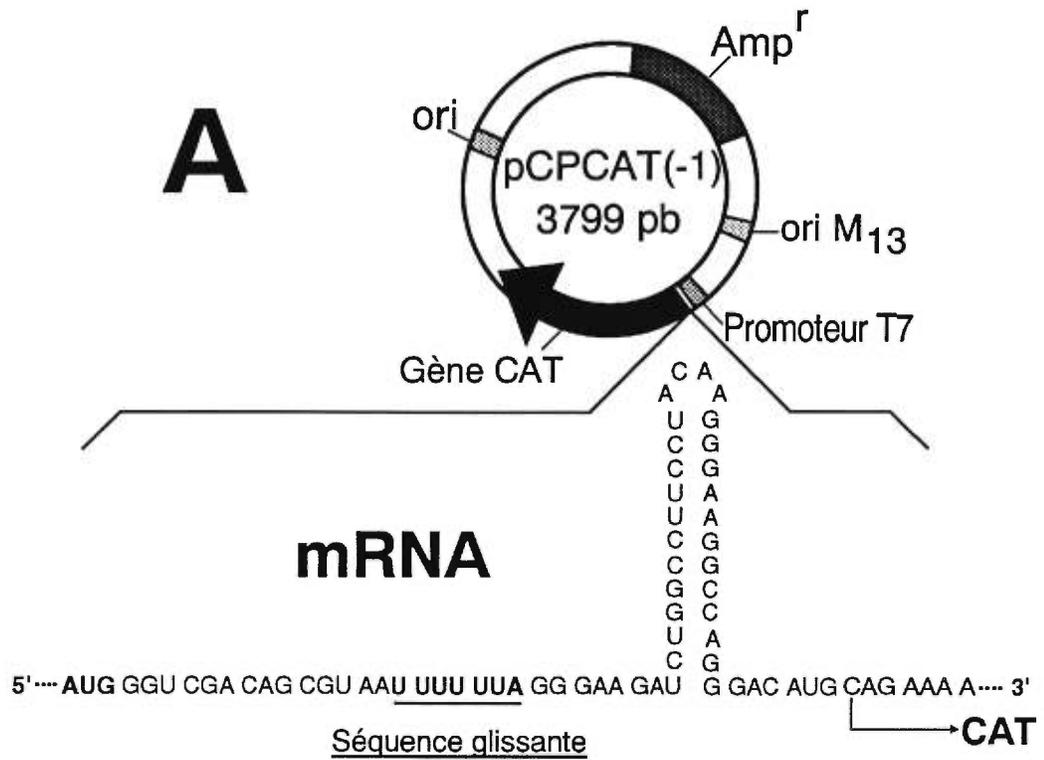


Figure 3-2: Caractéristiques des vecteurs contenant le gène rapporteur CAT avec l'insertion responsable du "frameshift" programmé -1 au début de la région codante

A: Caractéristiques du vecteur pCPCAT(-1). Avec une telle construction, la protéine CAT n'est produite que par les ribosomes qui glissent dans le cadre de lecture - 1 au niveau de la séquence de "frameshift". Les nucléotides de l'extrémité 5' de la séquence codante du gène CAT sont représentés par groupe de 3, en tenant compte du glissement (détails, voir Fig. 3-1).

B: Caractéristiques du vecteur pCPCAT(0). Avec une telle construction, seuls les ribosomes qui ne changent pas de cadre de lecture produisent la protéine CAT (détails, voir Fig 3-1).



L'insertion de 62 nucléotides au début de la séquence codante de la protéine CAT pouvant modifier ses propriétés (activité spécifique, stabilité), nous avons entrepris la construction du vecteur pCPCAT(0) permettant de générer un messenger de référence. Lors de la traduction du messenger CPCAT(0), la protéine CAT ne sera produite que par les ribosomes qui n'effectuent pas de changement de cadre de lecture. Tout comme pour le vecteur pCPCAT(-1), une cassette de DNA synthétique a été insérée dans le plasmide pLRCCAT digéré par l'enzyme de restriction Sph I. La cassette utilisée pour la construction du vecteur pCPCAT(0) contient, elle aussi, la séquence dirigeant le "frameshift" programmé -1 du VIH-1, mais un nucléotide supplémentaire a été rajouté en 5' de la séquence palindromique qui code pour la tige-boucle. Ceci place la séquence du VIH-1 et la séquence codante de la protéine CAT dans le même cadre de lecture que le codon initiateur. Les caractéristiques du vecteur pCPCAT(0) sont résumées à la Figure 3.2 B.

3.2 PRODUCTION DES RNA MESSAGERS CODANT POUR LA PROTÉINE CAT.

Les messagers pour lesquels l'expression de la protéine CAT dépend d'un "frameshift" programmé - 1, c'est-à-dire CPCAT(0), et CPCAT(-1), ainsi que le messenger sans insertion LRCCAT, ont été produits par transcription *in vitro* des plasmides correspondants linéarisés avec l'enzyme de restriction BamH I. Cet enzyme coupe dans la région 3' non-traduite suivant la séquence codante de la protéine CAT, à 123 bases du codon stop si l'on considère le brin utilisé comme matrice pour la transcription du plasmide. La coupure au site BamH I génère une extrémité protubérante en 5' qui permet au gène d'être transcrit efficacement (Lowary *et al.*, 1986). La transcription a été effectuée par la RNA polymérase du phage T7 produite dans le laboratoire (voir section 2.4.1). Le rendement de la transcription était généralement d'environ 10 µg de RNA pour 1 µg de plasmide. Les transcrits ont été purifiés sur colonne MicroSpin™ G-50, et leur qualité a été vérifiée par une électrophorèse sur gel dénaturant 4 % polyacrylamide / 8 M urée suivie d'une coloration au bromure d'éthidium. Nous avons toujours observé une bande unique, bien définie, et migrant à la position attendue, c'est-à-dire à la position théorique de migration

d'un transcrit de 840 bases dans le cas du messenger LRCCAT, ou de transcrits d'environ 900 bases dans les cas des messagers CPCAT(-1) et CPCAT(0), la taille théorique de ces deux messagers étant de 902 et 903 bases respectivement (résultats non présentés).

3.3 PRÉPARATION ET OPTIMISATION DE L'EXTRAIT BACTÉRIEN S30

3.3.1 PRÉPARATION DE L'EXTRAIT S30

La traduction des messagers se fait dans un extrait bactérien, le S30, préparé à partir de bactéries *E. coli* RD100 qui ont poussé dans un milieu L.B. + 1 % de glucose à 37°C jusqu'à ce qu'elles atteignent une densité optique de 0.7 unités d'absorbance à 660 nm. Les bactéries sont ensuite refroidies rapidement dans un bain d'éthanol / glace sèche ("quick cool") afin de figer les ribosomes sur le messenger qu'ils sont en train de traduire. Les bactéries ont été récoltées par centrifugation, broyées avec de l'alumine, et centrifugées 10 minutes à 39 000 g afin de sédimenter l'alumine. Après une deuxième centrifugation à 30 000 g pendant 30 minutes, le surnageant, qui correspond à l'extrait dénommé S30, est recueilli. Cet extrait contient des ribosomes, ainsi que tous les enzymes et facteurs nécessaires à la synthèse protéique. Afin de permettre aux ribosomes d'achever la traduction du messenger sur lequel ils ont été figés au moment du "quick cool", les extraits bactériens sont préincubés 15 minutes à 37°C en présence d'acides aminés et d'un système générateur d'énergie (phosphoénol pyruvate / pyruvate kinase) avant d'être utilisés pour une traduction. Au cours de cette étape, le DNA endogène est dégradé, ainsi que plus de 80 % des messagers présents dans l'extrait S30 (Kitaoka et al., 1996). Par conséquent, quand on lui fournit ensuite un messenger donné, ainsi que des acides aminés, un système générateur d'énergie, et certains cofacteurs, l'extrait S30 produit uniquement la protéine correspondant au messenger fourni. Cet extrait permet la production de protéines enzymatiques actives telles que la chloramphénicol acétyltransférase, la luciférase, ou la β -galactosidase dont les activités peuvent être testées directement. La synthèse protéique peut aussi être évaluée en ajoutant des acides aminés radioactifs comme la [³⁵S]méthionine au milieu traductionnel. Les protéines ainsi marquées peuvent être visualisées par

autoradiographie après SDS-PAGE. Il est à noter que les extraits S30 sont également fréquemment utilisés dans des systèmes de transcription/traduction couplées. Cependant, nous avons préféré l'utiliser comme simple système de traduction afin de pouvoir contrôler la quantité de messenger traduit.

3.3.2 CARACTÉRISATION DES EXTRAITS S30 OBTENUS

Chaque extrait S30 obtenu a été caractérisé par la mesure de sa densité optique à 260 nm, et à 280 nm afin de calculer le rapport $D.O._{260 \text{ nm}} / D.O._{280 \text{ nm}}$ qui dépend de la quantité en protéines de l'extrait. La concentration en protéines de chaque extrait est également évaluée par dosage avec le réactif de Bradford (Bio-Rad), la sérumalbumine de boeuf étant utilisée comme étalon. Le Tableau III-I présente un exemple typique de fiche signalétique d'extrait S30.

Nous avons également évalué la quantité de ribosomes 70 S contenus dans chaque nouvelle préparation d'extrait S30 en comparant le profil de sédimentation sur un gradient 10 % à 30 % de sucrose d'un échantillon de chaque extrait à celui d'une quantité connue de ribosome 70 S purifiés de la même souche. Un exemple de profil de sédimentation d'un extrait S30 est présenté à la Figure 3-3. La migration a été réalisée dans un tampon contenant 10 mM d'ions magnésium, et l'analyse du gradient a été effectuée à 254 nm. Le premier pic correspond à un mélange de protéines. Les pics 2 et 3 correspondent à des sous-unités 30S et 50S respectivement. Ces sous-unités ribosomiques sont probablement inactives, ce qui empêche leur association en ribosomes 70S. En effet, on retrouve ces pics dans le cas de gradients réalisés dans un tampon contenant 20 mM d'ions magnésium, ce qui devrait théoriquement favoriser la réassociation des sous-unités ribosomiques dissociées. Le pic 4 correspond à des ribosomes 70S, alors que le pic 5 correspond à des dimères de 70 S possédant un coefficient de sédimentation de 100S.

TABLEAU III-I: EXEMPLE DE FICHE SIGNALÉTIQUE D'UN EXTRAIT S30

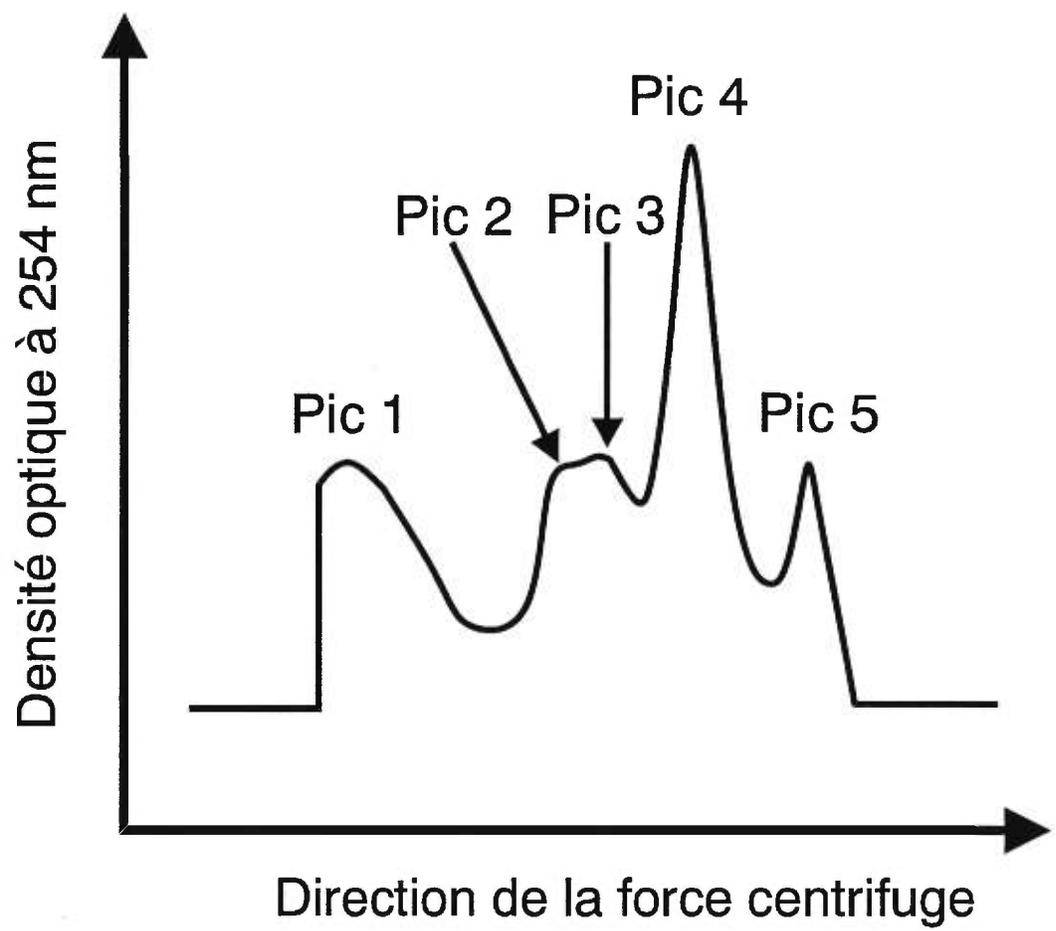
Souche bactérienne utilisée	<i>E. coli</i> RD100
Masse de bactéries récoltées ^a	5 g
Volume de S30 obtenu	10 ml
D.O._{260 nm}	170 unités / ml
D.O._{280 nm}	89 unités / ml
Rapport D.O._{260 nm} / D.O._{280 nm}	1.92
Quantité de ribosomes 70 S	78 D.O. _{260 nm} / ml
Concentration en protéines	10.6 µg / µl
Protéine CAT produite ^b	490 ng

a: La masse indiquée correspond à la quantité de cellules bactériennes récoltées après avoir laissé une culture bactérienne de 3 litres croître jusqu'à une densité optique de 0.7 unité d'absorbance à 660 nm dans un milieu L.B. + 1 % de glucose à 37°C.

b: Quantité de protéine CAT produite mesurée d'après l'activité enzymatique de la protéine CAT produite *in vitro* lors de la traduction de 2 µg de messenger sans insertion (messenger LRCCAT) dans un volume traductionnel de 50 µl contenant environ 2 D.O._{260nm} d'extrait S30.

Figure 3-3: Profil de sédimentation d'un échantillon d'extrait acellulaire bactérien S30

Exemple de profil de sédimentation d'un échantillon d'extrait bactérien S30 obtenu à partir de bactéries *E. coli* RD100 dans un gradient de 10 % à 30 % de sucrose dans un tampon à 10 mM en ions magnésium. La sédimentation a été effectuée à 20 000 rpm pendant 20 heures dans un rotor SW 41 Ti (Beckman). La sédimentation de ribosomes 70S purifiés obtenus à partir de la même souche a été réalisée en parallèle comme contrôle.



3.3.3 OPTIMISATION DES EXTRAITS S30

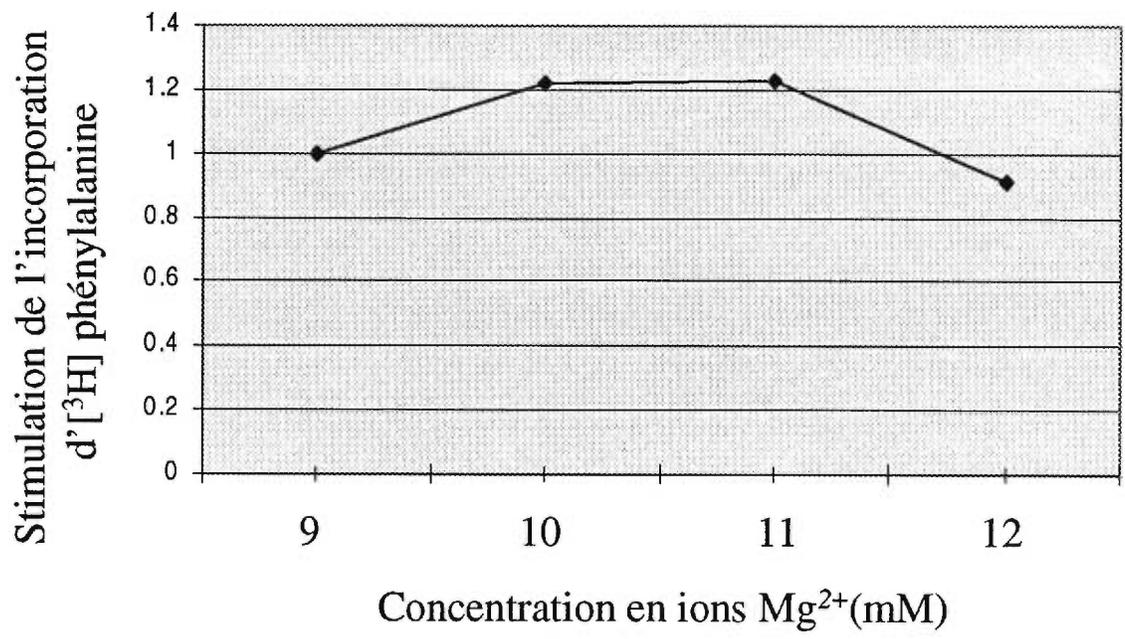
Le fonctionnement optimum des extraits S30 a nécessité la détermination d'un certain nombre de paramètres, et de composants essentiels. Ainsi, il s'est avéré que la présence de glutamate de potassium était cruciale pour permettre une activité efficace de nos extraits. Le glutamate permet probablement une meilleure reproduction de l'environnement ionique de la cellule (Choy, 1997). De plus, le glutamate étant un acide faible, il renforce le pouvoir tampon du tampon de traduction, et participe ainsi au maintien du pH.

La concentration optimale en ions magnésium du mélange traductionnel, ainsi que la quantité d'extrait S30 à utiliser sont deux paramètres déterminés pour chaque nouvelle préparation d'extrait S30. La concentration optimale en ions magnésium constitue un paramètre critique pour le fonctionnement de l'extrait bactérien. La valeur de cette concentration varie légèrement d'un extrait à l'autre. Elle est estimée en déterminant la stimulation de l'incorporation de [³H]phénylalanine lors de la traduction du messenger sans insertion, le messenger LRCCAT, dans l'extrait S30 en présence de différentes quantités de magnésium (Fig.3-4). La quantité optimale d'extrait S30 à ajouter au mélange réactionnel, ainsi que la quantité nécessaire de messenger à utiliser ont également été déterminées par cette méthode.

Pour un extrait S30 préparé à partir de la souche *E. coli* RD100, la concentration optimale en ions magnésium se situe entre 11 et 13 mM, et environ 45 ± 5 D.O._{260 nm} / ml d'extrait S30 sont nécessaires pour une traduction optimale. D'autre part, 2 µg de messenger, soit environ 7 pmols de messenger LRCCAT, CPCAT(-1) ou CPCAT(0), sont suffisants pour atteindre l'optimum de la traduction, de plus grandes quantités de messenger ne permettant pas d'augmenter la production de protéines.

Figure 3.4: Exemple d'optimisation de la concentration en ions magnésium pour la traduction dans un extrait acellulaire bactérien

L'extrait S30 a été incubé en présence et en absence du messenger LRCCAT (messenger sans insertion) dans des milieux traductionnels contenant de la [³H]phénylalanine et différentes concentrations en ions magnésium. Les protéines synthétisées ont ensuite été précipitées, et filtrées sur filtres de verre. La radioactivité retenue sur les filtres a été mesurée à l'aide d'un compteur β à scintillation. La stimulation de l'incorporation d' [³H]phénylalanine a été représentée en fonction de la concentration en ions magnésium du milieu traductionnel. La stimulation obtenue dans un milieu traductionnel contenant 9 mM d'ions magnésium a été arbitrairement normalisée à 1.00.



3.4 MESURE DE L'EFFICACITÉ DU "FRAMESHIFT" PROGRAMMÉ -1 DU VIH-1 DANS L'EXTRAIT S30.

Nous avons utilisé trois méthodes différentes afin de quantifier la protéine CAT produite lors de la traduction des messagers CPCAT(0) et CPCAT(-1), c'est-à-dire les messagers contenant la séquence codante du gène CAT avec l'insertion du VIH-1 dans l'extrait S30.

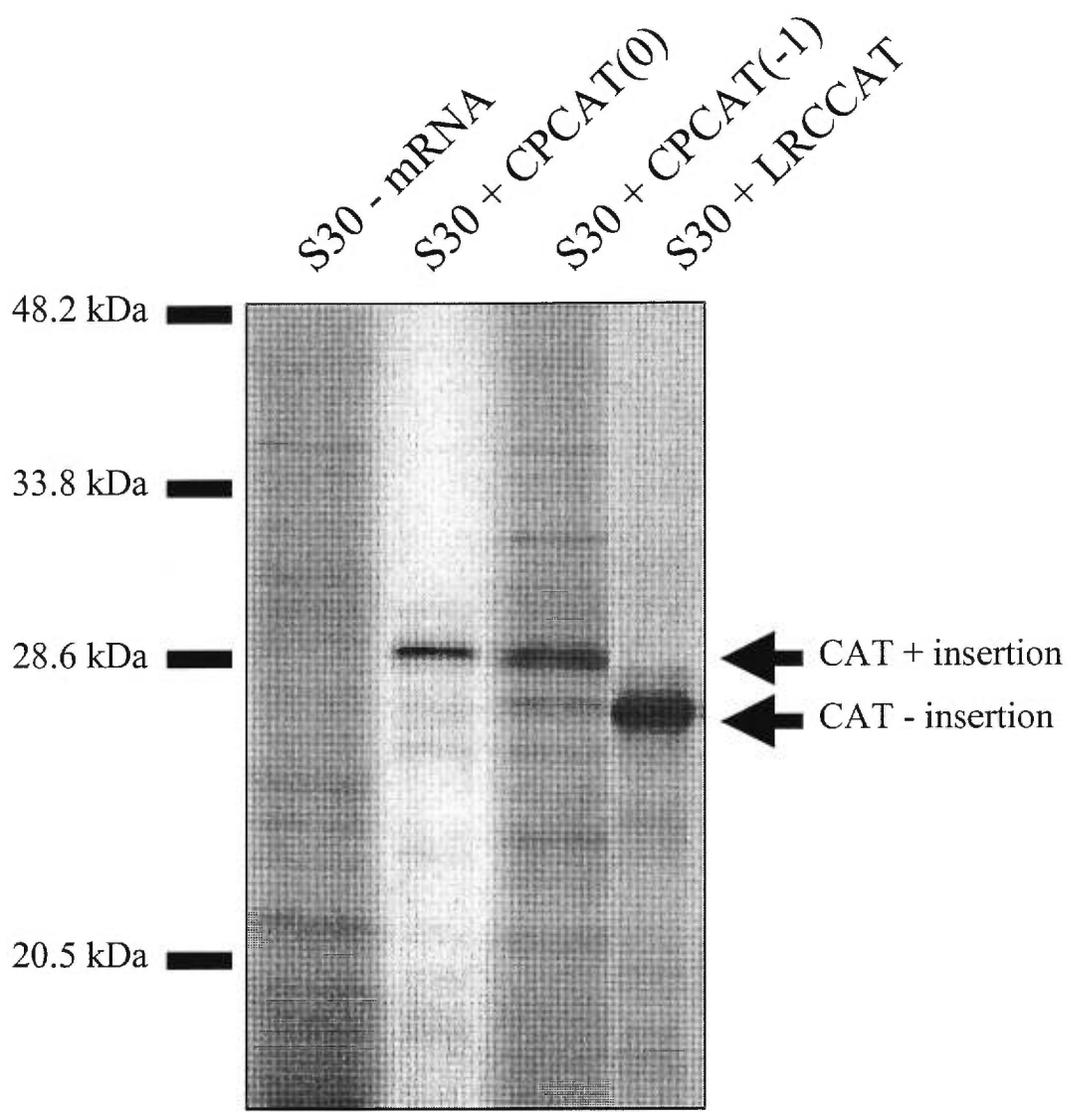
Nous avons évalué la quantité de protéine CAT produite par la traduction des messagers CPCAT(0) et CPCAT(-1) en réalisant des traductions en présence de [³⁵S]méthionine, et en séparant les produits de traduction par SDS-PAGE. Les gels ont ensuite été autoradiographiés, et l'intensité des bandes correspondant à la protéine CAT a été quantifiée à l'aide du densitomètre LKB Ultrascan XL Laser. Comme l'illustre l'autoradiogramme présenté à la Figure 3-5, nous avons réussi à reproduire le "frameshift" programmé -1 du VIH-1 *in vitro* dans un extrait acellulaire bactérien. D'après les marqueurs de poids moléculaire, la protéine CAT produite par la traduction des messagers CPCAT(0) et CPCAT(-1) posséderait un poids moléculaire d'environ 28.6 kDa, son poids moléculaire théorique étant de 27.7 kDa. La différence entre les poids moléculaires prévu et observé n'est pas significative, et peut s'expliquer par le fait que les marqueurs de poids moléculaire que nous avons utilisés étaient pré-colorés. En effet, ces marqueurs pré-colorés ne migrent pas exactement comme les polypeptides non colorés sur des gels de SDS / polyacrylamide (See et Jackowski, Protein Structure, 1990). L'analyse d'une dizaine de gels au densitomètre a permis d'évaluer l'efficacité du "frameshift" programmé - 1 à 9.8 % ± 0.8 %.

Nous avons également tenté de quantifier la protéine CAT par un essai immunologique, le CAT ELISA ("enzyme-linked immunosorbant assay"). Mais les essais immunologiques effectués avec de l'extrait S30 sans messenger ont montré un bruit de fond trop élevé. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les anticorps polyclonaux commerciaux dirigés contre la protéine CAT reconnaissent d'autres protéines présentes dans l'extrait bactérien. Nous avons alors essayé de quantifier la protéine CAT produite dans l'extrait S30 par un dosage

Figure 3.5: Reproduction du "frameshift" programmé -1 du VIH-1 dans un extrait bactérien S30

Autoradiographie des protéines marquées à la [³⁵S]méthionine lors de la traduction, dans un extrait S30, des messagers CPCAT(0), CPCAT(-1) et du messenger sans insertion LRCCAT. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE, puis le gel a été autoradiographié. Deux microgrammes de messenger ont été traduits dans un milieu traductionnel de 50 µl. L'extrait S30 dépourvu de messenger, ainsi que les extraits utilisés pour traduire les messagers CPCAT(0), CPCAT(-1), et LRCCAT ont été bouillis, puis mis sur un gel de polyacrylamide 17.5 % / 0.1 % SDS. Pistes "S30 - mRNA" et "S30 + CPCAT(-1)": la totalité des protéines produites a été mise sur gel. Piste "S30 + CPCAT(0)" et "S30 + LRCCAT": un dixième de la quantité totale de protéines produites a été mis sur gel.

Note: Une protéine de 7.5 kDa est produite par les ribosomes qui n'effectuent pas de "frameshift" lors de la traduction du messenger CPCAT(-1). Cette protéine n'est pas visible sur l'autoradiogramme présenté.



de son activité enzymatique. L'activité de la protéine CAT peut être évaluée par mesure de la butyrylation du chloramphénicol, son substrat naturel. En effet, la protéine CAT, qui est naturellement produite par les souches d'*E. coli* résistantes au chloramphénicol, inactive cet antibiotique en acétylant ses groupements hydroxyles. Cette activité enzymatique peut être reproduite *in vitro* en fournissant à la protéine CAT du [³H]chloramphénicol et du n-butyryl coenzyme A, le groupement butyryle étant un substitut du groupement acétyle. Cependant, l'activité de la protéine produite à partir du messenger CPCAT(-1) s'est avérée très proche du bruit de fond (résultats non présentés). Ceci représente un inconvénient majeur pour la suite de notre projet. En effet, nous désirons tester l'effet d'antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique sur le "frameshift" programmé -1 du VIH-1, ce qui suppose que la quantité de CAT produite en présence de ces agents pourrait être éventuellement diminuée. Dans le cas de la traduction du messenger CPCAT(-1), cette diminution de la quantité de protéines produites se traduirait par une baisse de l'activité enzymatique qui serait alors indiscernable du bruit de fond.

3.5 EFFET D'ANTIBIOTIQUES SUR LE "FRAMESHIFT" PROGRAMMÉ -1 DU VIH-1

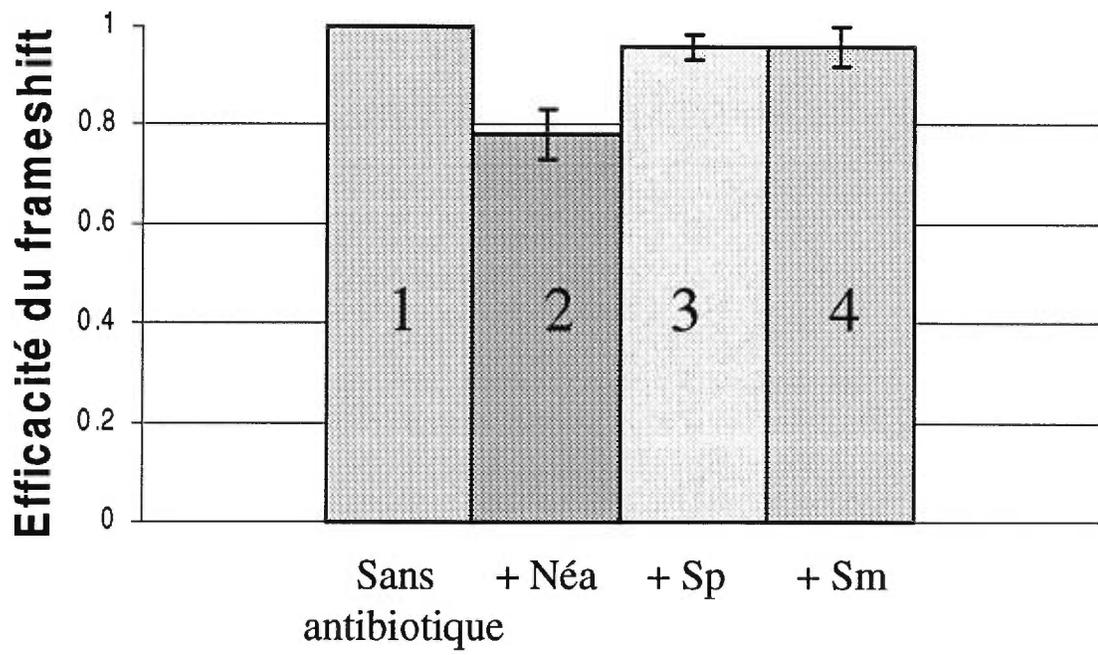
Dans le but de mieux comprendre le mécanisme du "frameshift" programmé -1, nous avons testé l'effet de trois antibiotiques, la néamine, la spectinomycine et la streptomycine, sur la traduction des messagers CPCAT(0) et CPCAT(-1). Ces messagers ont donc été traduits dans l'extrait bactérien S30 en absence et en présence de faibles doses d'antibiotiques, soit 20 ng/ml, ce qui correspond à un rapport antibiotique / ribosome 70S de 12 pour 1 pour la néamine et la spectinomycine, et à un rapport de 6 pour 1 dans le cas de la streptomycine. Ces doses d'antibiotiques ont été déterminées empiriquement de manière à ce que la synthèse protéique diminue de moins de 50 % lors de la traduction du messenger sans insertion LRCCAT. Les traductions des messagers CPCAT(0) et CPCAT(-1) ont été effectuées en présence de [³⁵S]méthionine, et les protéines marquées radioactivement ont été séparées par SDS-PAGE. Les autoradiogrammes obtenus après

exposition des gels ont été analysés au densitomètre. L'histogramme présenté à la Figure 3-4 résume les résultats obtenus.

La présence de la néamine diminue l'efficacité du "frameshift" programmé -1. La diminution observée est faible ($22 \% \pm 5 \%$), mais elle est significative et reproductible. En revanche, la spectinomycine ne diminue pas significativement l'efficacité du "frameshift" programmé qui ne semble pas non plus être affectée par la streptomycine. Ceci est surprenant, car la streptomycine, tout comme la néamine, accélère l'occupation du site A ribosomique. Nous nous attendions donc à obtenir des résultats similaires avec ces deux antibiotiques. Cependant, la sélection des aa-tRNA n'est pas la seule étape de l'élongation de la traduction affectée par la streptomycine. En effet, cet antibiotique déstabilise aussi l'interaction du peptidyl-tRNA au site P (Karimi et Ehrenberg, 1996). Nous proposons donc que la streptomycine ait deux effets distincts sur le "frameshift" programmé. Elle inhiberait, comme la néamine, un changement de cadre de lecture effectué selon le mécanisme du glissement simultané, mais elle stimulerait également le glissement du ribosome alors que le peptidyl-tRNA est au site P, et que le site A est vacant (voir section 4.2.2). Les deux effets s'équilibrent, la streptomycine n'aurait pas d'effet apparent sur le "frameshift" programmé -1 du VIH-1.

Figure 3-6: Effet d'antibiotiques sur le "frameshift" programmé du VIH

Histogramme résumant l'effet de la néamine, de la spectinomycine et de la streptomycine sur l'efficacité du "frameshift" programmé du VIH-1. Deux microgrammes des messagers CPCAT(0) ou CPCAT(-1) ont été traduits en présence de [³⁵S]méthionine dans un extrait bactérien S30 en absence, ou en présence de 20 ng/ml de néamine, de spectinomycine ou de streptomycine. Les protéines issues des traductions ont été séparées par SDS-PAGE. Le gel a été autoradiographié, puis l'intensité des bandes correspondant à la protéine CAT déterminée au densitomètre. L'efficacité du frameshift correspond au rapport [quantité de protéine CAT produite par la traduction du messenger CPCAT(-1)] / [quantité de protéine CAT produite par la traduction des messagers CPCAT(0) et CPCAT(-1)] X 100. Colonne 1: efficacité du frameshift en absence d'antibiotique normalisée arbitrairement à une valeur de 1.00; Colonne 2: efficacité du frameshift en présence de 20 ng / ml de néamine; colonne 3: efficacité du frameshift en présence de 20 ng / ml de spectinomycine; colonne 4: efficacité du frameshift en présence de 20 ng / ml de streptomycine. Les résultats résumant les données de cinq expériences indépendantes (\pm la déviation standard).



Chapitre IV

-Discussion-

Il y a une quinzaine d'années encore, on aurait pu comparer le ribosome à un élève sage et appliqué traduisant méticuleusement, mais efficacement, le message contenu dans la séquence nucléotidique des mRNA en protéines. Un seul reproche aurait pu être fait à ce grand adepte de la fidélité de traduction: son manque d'originalité. Notamment, il semblait qu'une des règles d'or du ribosome était de maintenir le cadre de lecture défini par le codon initiateur en déchiffrant scrupuleusement trois par trois les bases du mRNA. Mais il s'est avéré que le ribosome était un véritable expert en acrobaties traductionnelles regroupées sous le nom de "recoding". Le "frameshift" programmé - 1 est l'une des deux acrobaties du ribosome, avec le "frameshift" programmé + 1, qui parvient à déjouer les règles du maintien du cadre de lecture, en forçant le ribosome à changer de cadre de lecture suite à la rencontre de signaux spécifiques du mRNA. Outre le fait que son étude peut permettre de comprendre les mécanismes encore mal connus du maintien du cadre de lecture, le "frameshift" programmé - 1 est devenu un sujet de recherche d'actualité. En effet, il est utilisé entre autre par les rétrovirus, dont le VIH responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), pour réguler la production de la protéine de fusion "Gag-Pol", le précurseur des activités enzymatiques virales. Lors de la traduction des mRNA viraux pleine longueur, la plupart des ribosomes vont arrêter la lecture du messenger au codon stop de la région codante de la protéine "Gag", permettant ainsi la production de ce précurseur des protéines structurales. Mais une minorité d'entre eux vont changer de cadre de lecture avant de rencontrer ce codon stop, ce qui entraînera la production de la protéine de fusion "Gag-Pol". Le rapport "Gag" / "Gag-Pol" est critique pour la propagation des virus, et plusieurs équipes de recherche ont tenté de comprendre le mécanisme qui permet aux ribosomes en élongation de changer de cadre de lecture dans le but de trouver une arme contre les rétrovirus, et plus particulièrement contre le VIH. D'après la littérature, le mécanisme actuellement favorisé est celui dit du "glissement simultané" proposé par l'équipe de Varmus (Jacks *et al.*, 1988b). D'après ce mécanisme, le ribosome et les deux tRNA qui lui sont liés glissent simultanément du cadre de lecture 0 au cadre de lecture -1 avant la formation du lien peptidique, alors que l'aa-tRNA et le peptidyl-tRNA se trouvent respectivement aux sites A/A et P/P du ribosome. Le glissement simultané s'effectue au niveau d'une séquence dite de "frameshift" qui comprend une

séquence glissante de type XXX YYY Z, et une structure secondaire située quelques nucléotides en aval qui permet de stimuler l'efficacité du "frameshift". Cependant, il a été démontré que le lien peptidique se forme très rapidement une fois que l'aa-tRNA occupe le site A/A (Bilgin *et al.*, 1992; Yarus et Smith, 1995). Ceci laisserait donc peu de temps pour permettre la réalisation d'un glissement impliquant le peptidyl-tRNA et l'aa-tRNA. Par conséquent, nous avons donc proposé que le glissement simultané aurait lieu alors que le peptidyl-tRNA occupe le site P/P, et que l'aa-tRNA occupe le site d'entrée du ribosome (site A/T), c'est-à-dire avant qu'il ne se place au site A/A.

Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons voulu, dans un premier temps, reproduire *in vitro* le "frameshift" programmé - 1 du VIH dans un extrait acellulaire d'*E. coli* (extrait S30), ce qui n'avait jamais été fait auparavant. Nous avons ensuite testé l'effet de trois antibiotiques, la néamine, la spectinomycine et la streptomycine, sur le "frameshift" programmé - 1 du VIH. Chacun de ces trois antibiotiques inhibe spécifiquement une étape de l'élongation de la synthèse protéique procaryote. La Figure 4-1 présente la structure des trois antibiotiques utilisés. Pour évaluer l'efficacité du "frameshift" programmé - 1, nous avons modifié un gène rapporteur CAT contenu dans un plasmide dérivé de Bluescript, et placé sous contrôle du promoteur du phage T7. Nous avons ainsi construit le vecteur pCPCAT(-1) en insérant au début de la région codante de la protéine CAT une séquence du génome du VIH-1. Cette séquence contient le site de "frameshift" du VIH-1, c'est-à-dire, la séquence glissante suivie de la séquence codant pour la tige-boucle stimulatrice. Avec une telle construction, la protéine CAT ne peut être produite que par les ribosomes qui changent de cadre de lecture en effectuant un "frameshift" - 1. Nous avons également construit un vecteur témoin, pCPCAT(0). Dans ce vecteur, la séquence insérée au début de la séquence codante de la protéine CAT est identique à celle utilisée pour la construction de pCPCAT(-1), sauf qu'il y a une base supplémentaire au pied de la tige-boucle. Ceci permet de placer la séquence de "frameshift" et la séquence codante de la protéine CAT dans le même cadre de lecture que le codon initiateur. Avec une telle construction, la protéine CAT n'est produite que par les ribosomes qui ne changent pas de cadre de lecture. Les messagers issus de la transcription *in vitro* des vecteurs pCPCAT(0) et

Figure 4-1: Structure des antibiotique utilisés pour l'étude du mécanisme du "frameshift" programmé -1 du VIH

A: Structure de la néamine

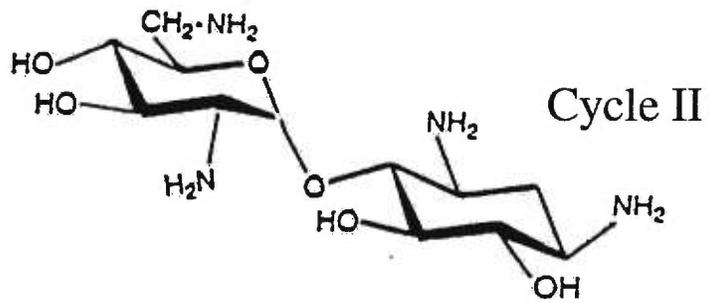
B: Structure de la streptomycine

C: Structure de la spectinomycine

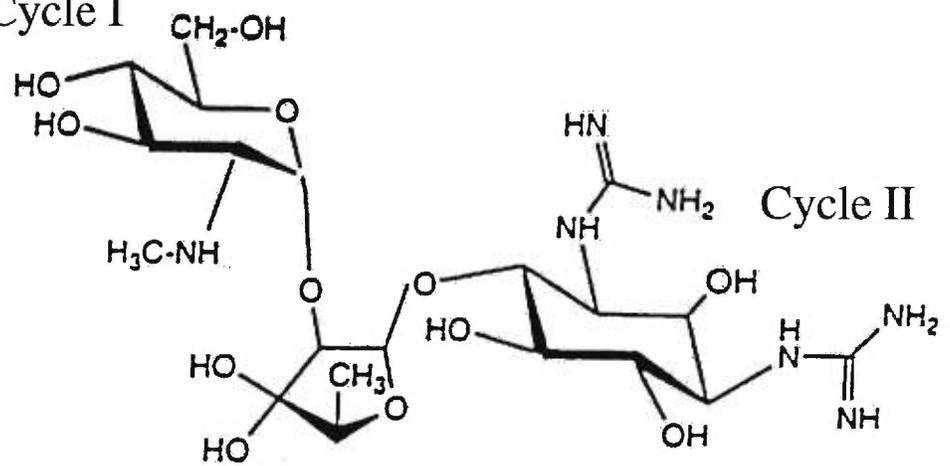
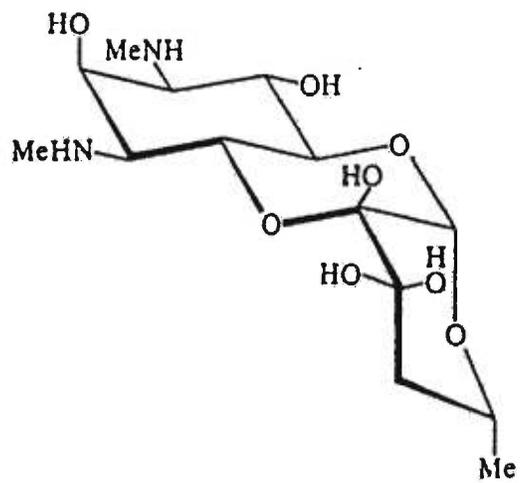
Tiré de Vàsquez (1979).

A

Cycle I

**B**

Cycle I

**C**

pCPCAT(-1) par la RNA polymérase du phage T7 ont été traduits dans l'extrait S30 en présence de [S^{35}]méthionine, et en absence ou en présence de faibles doses de néamine, de spectinomycine, ou de streptomycine. Les produits de la traduction ont été séparés par SDS-PAGE, puis les gels ont été autoradiographiés. L'efficacité du "frameshift" programmé - 1 a été évaluée après quantification par analyse densitométrique de la protéine CAT produite.

4.1 REPRODUCTION DU "FRAMESHIFT" PROGRAMMÉ - 1 DU VIH-1 DANS UN EXTRAIT ACELLULAIRE D'*E. COLI*

Afin de faciliter le travail de recherche, l'étude du "frameshift" programmé - 1 du VIH a nécessité le développement de modèles d'étude. Les modèles d'étude sont des systèmes dans lesquels l'expression de constructions plasmidiques contenant un gène rapporteur, tel que celui de la luciférase ou de la β -galactosidase par exemple, permet de reproduire le "frameshift" programmé - 1. Ce dernier a donc été reproduit dans des cultures de différentes lignées cellulaires de mammifères, dont des cultures de cellules de lymphocytes T-CD4⁺, l'hôte naturel du virus (Cassan *et al.*, 1994). Il a aussi été reproduit dans des cultures de levure (Stahl *et al.*, 1995), dans des cultures bactériennes (Weiss *et al.*, 1989; Yelverton *et al.*, 1994), et *in vitro* dans des lysats de réticulocytes de lapin (Reil *et al.*, 1993; Jacks *et al.*, 1988a), mais jamais dans un système de traduction procaryote *in vitro*.

L'extrait acellulaire S30 d'*E. coli* est un système d'expression facile d'utilisation. Dépourvu de messagers endogènes, il produit uniquement la protéine codée par les mRNA qui lui sont fournis. D'après les autoradiogrammes que nous avons obtenus suite à la séparation par SDS-PAGE des produits de la traduction du mRNA CPCAT(-1) dans l'extrait S30 en présence de [^{35}S]méthionine, le "frameshift" programmé - 1 du VIH est reproductible *in vitro* dans un système de traduction procaryote. L'évaluation de la quantité de protéine CAT produite lors de la traduction des messagers CPCAT(0) et CPCAT(-1) nous a permis d'évaluer l'efficacité de ce "frameshift" dans notre système de traduction. Cette efficacité est d'environ 10 %, ce qui est en accord avec l'efficacité du

"frameshift" programmé - 1 du VIH mesurée à partir d'un lysat de réticulocytes de lapin, un système de traduction eucaryote *in vitro* (Reil *et al.*, 1992). Ceci prouve la validité de notre système de traduction. D'autre part, l'efficacité de "frameshift" que nous avons mesurée est environ cinq fois supérieure à celle mesurée *in vivo* dans des cultures bactériennes en utilisant un vecteur contenant le gène *lacZ* modifié par l'insertion, au début de la région codante, du site de "frameshift" du VIH (Weiss *et al.*, 1989). De même, l'efficacité du "frameshift" programmé - 1 du VIH mesurée à partir d'un lysat de réticulocytes de lapin est cinq fois supérieure à celle mesurée dans des cultures de cellules dérivées de lymphocytes T-CD4⁺ (Cassan *et al.*, 1994). Il apparaît donc que l'efficacité du "frameshift" programmé - 1 est plus élevée dans des systèmes d'expression *in vitro* qu'*in vivo*, aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes. Le fait que la cinétique de la traduction soit plus lente *in vitro* qu'*in vivo* permet d'expliquer cette différence entre les efficacités de "frameshift" mesurées. En effet, si l'on considère qu'un ralentissement de l'élongation de la traduction augmente la probabilité que le ribosome change de cadre de lecture en rencontrant la séquence de "frameshift" insérée dans les différentes constructions utilisées, alors l'efficacité du "frameshift" devrait être augmentée *in vitro*, ce qui apparaît être le cas.

4.2 ANALYSE DE L'EFFET DES ANTIBIOTIQUES SUR L'EFFICACITÉ DU "FRAMESHIFT" PROGRAMMÉ - 1

Le "frameshift" programmé - 1 est un phénomène qui survient au cours de l'élongation de la traduction. Cette étape de la synthèse protéique comporte trois phases: la sélection d'un aa-tRNA adéquat et son positionnement au site A/A du ribosome, la formation du lien peptidique et la translocation. Un moyen de déterminer au cours de quelle(s) phase(s) a lieu le "frameshift" programmé - 1 est d'étudier l'effet sur l'efficacité du "frameshift" d'agents inhibant spécifiquement certaines phases de l'élongation. C'est cette stratégie que nous avons employée pour vérifier notre hypothèse selon laquelle le glissement simultané s'effectuerait avant l'occupation du site A/A par l'aa-tRNA, c'est-à-dire lorsque ce dernier est au site d'entrée du ribosome, dit site A/T, et que le peptidyl-tRNA est au site P/P.

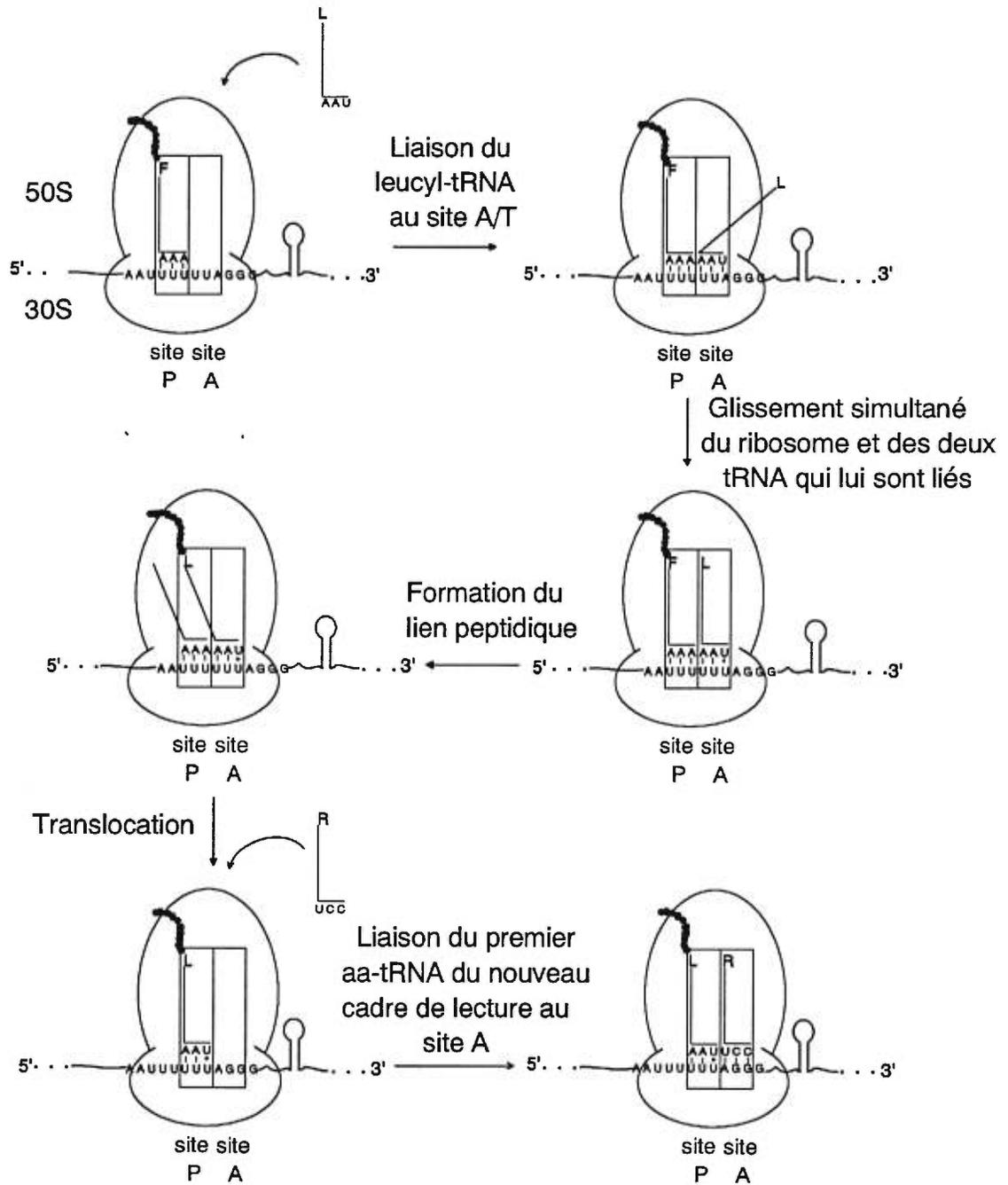
4.2.1 L'EFFET DE LA NÉAMINE SUR LE "FRAMESHIFT" PROGRAMMÉ - 1 PERMET DE RAFFINER LE MODÈLE DU GLISSEMENT SIMULTANÉ

La néamine est un antibiotique aminoglycosidé appartenant à la famille de la néomycine. Elle induit des erreurs de lecture au cours de la synthèse protéique procaryote en accélérant l'occupation du site A/A (Cundliffe, 1990). En accord avec notre hypothèse de travail, la néamine diminue l'efficacité du "frameshift" programmé - 1. En effet, nous pouvons postuler que tout agent qui accélère l'occupation du site A/A, laisse moins de temps aux ribosomes pour changer de cadre de lecture. L'absence d'effet de la spectinomycine sur le "frameshift" programmé - 1 est également en accord avec notre modèle. Cet autre inhibiteur de la synthèse protéique des bactéries est lui aussi un antibiotique aminoglycosidé, mais il est dépourvu de la partie streptamine (ou désoxystreptamine selon le cas) caractéristique des autres aminoglycosidés (Vázquez, 1979; Fig. 4-1). La spectinomycine bloque la translocation du peptidyl-tRNA du site A au site P en empêchant l'action du facteur EF-G sur le ribosome (Brink *et al.*, 1994). Dans notre modèle, le glissement simultané du ribosome et des deux tRNA qui lui sont liés se déroule avant la translocation, par conséquent un agent bloquant cette étape ne devrait pas avoir d'effet sur le "frameshift" programmé - 1.

La Figure 4-2 illustre notre modèle du glissement simultané. Considérons un ribosome en élongation parvenu au site du "frameshift" programmé - 1 du VIH-1: le phénylalanyl-tRNA porteur de la chaîne polypeptidique en croissance est au site P/P, et le leucyl-tRNA est au site A/T. Avant que le leucyl-tRNA n'occupe le site A/A, le ribosome et les deux tRNA qui lui sont liés glissent simultanément d'un nucléotide en direction 5', ce qui les amène dans le cadre de lecture - 1. Puis le leucyl-tRNA occupe le site A/A, la chaîne polypeptidique est transférée du phénylalanyl-tRNA au leucyl-tRNA, et le ribosome effectue la translocation. Le leucyl-tRNA occupe alors le site P/P, et la sélection du premier aa-tRNA du cadre de lecture - 1 a lieu.

Figure 4-2: Raffinement du modèle du glissement simultané

Le glissement simultané du ribosome et des deux tRNA qui lui sont liés s'effectue avant l'occupation du site A/A, alors que le phénylalanine-tRNA porteur du polypeptide en croissance est au site P/P, et que le leucyl-tRNA est au site d'entrée du ribosome, c'est-à-dire au site A/T. Le premier acide aminé du cadre de lecture - 1 a été incorporé dans la protéine est une arginine. "F": phénylalanine; "L": leucine; "R": arginine.



Pendant que nous effectuons notre recherche avec un système de traduction acellulaire bactérien, le "frameshift" programmé - 1 du virus à RNA double brin L-A de *Saccharomyces cerevisiae* a également été l'objet de recherches visant à définir lors de quelle(s) phase(s) du cycle de l'élongation le ribosome et les deux tRNA qui lui sont liés glissent simultanément dans le cadre de lecture - 1. Pour sonder l'étape de sélection des aa-tRNA, plusieurs mutants du facteur d'élongation de la levure EF-1 α furent produits (Dinman *et al.*, 1997). L'analyse de l'effet de ces mutations sur le "frameshift" programmé - 1 du virus L-A montre notamment qu'une mutation dans le domaine de liaison du GTP de la protéine EF-1 α stimule le "frameshift" programmé - 1. A partir des résultats de Dinman *et al.*, nous proposons qu'avec une telle mutation le complexe ternaire EF-1 α •GTP•aa-tRNA resterait plus longtemps au site A/T, ce qui laisserait plus de temps aux ribosomes pour changer de cadre de lecture au niveau de la séquence de "frameshift" du virus L-A. Ceci concorde tout à fait avec les résultats que nous avons obtenus avec la néamine, puisque, dans un cas comme dans l'autre, toute modification de la cinétique de l'occupation du site A/A affecte l'efficacité du "frameshift" programmé - 1. D'autre part, il apparaît que la protéine antivirale du "pokeweed" (PAP), un inhibiteur spécifique de la translocation, n'affecte pas le "frameshift" programmé - 1 du virus L-A (Tumer *et al.*, 1998). Ceci est aussi en accord avec les résultats que nous avons obtenus avec la spectinomycine, et élimine la translocation comme étape susceptible de permettre un "frameshift" programmé - 1. L'étape de la formation du lien peptidique fut également la cible d'une étude. Cette dernière montre que la sparsomycine, un antibiotique inhibiteur de l'activité peptidyl-transférase, stimule le "frameshift" programmé - 1 du virus L-A (Dinman *et al.*, 1997). Nous avons mentionné plus haut que dès que l'aa-tRNA occupait le site A/A, le lien peptidique se formait rapidement, ce qui laissait très peu de temps au ribosome pour changer de cadre de lecture. En empêchant la formation du lien peptidique, on favorise le changement de cadre de lecture quand l'aa-tRNA est au site A/A, car les ribosomes disposent alors de plus de temps pour glisser du cadre de lecture 0 au cadre de lecture - 1. Ceci concorde également avec notre modèle où le ribosome a besoin de temps pour pouvoir changer de cadre de lecture, avant la formation du lien peptidique.

4.2.2 LE DOUBLE EFFET DE LA STREPTOMYCINE SUR LE "FRAMESHIFT" PROGRAMMÉ - 1

La streptomycine est un antibiotique aminoglycosidé reconnu pour induire des erreurs de lecture au cours de la synthèse protéique des bactéries. Tout comme la néamine, elle accélère l'occupation du site A/A (Cundliffe, 1990). Toutefois, nos résultats montrent que la streptomycine ne semble pas avoir d'effet apparent sur le "frameshift" programmé - 1 du VIH-1. Ces résultats peuvent s'interpréter par le fait que la streptomycine, qui est une molécule plus grande que la néamine (Fig. 4-1), n'affecte pas uniquement la sélection des aa-tRNA au cours de l'élongation de la traduction. Elle ralentit aussi la translocation (Bilgin *et al.*, 1992), et déstabilise l'interaction codon-anticodon du peptidyl-tRNA localisé au site P/P (Karimi et Ehrenberg, 1996). Nous proposons que cet antibiotique a plusieurs effets sur le "frameshift" programmé - 1.

La streptomycine accélérant l'occupation du site A/A par l'aa-tRNA, nous pouvons supposer que, comme la néamine, elle inhibe le "frameshift" programmé - 1 au cours de l'étape de sélection des aa-tRNA. D'après l'absence d'effet de la spectinomycine et de la protéine PAP, qui sont des inhibiteurs spécifiques de la translocation (voir section 4.2.1), le "frameshift" programmé - 1 ne semble pas avoir lieu au cours de cette étape de l'élongation. L'action inhibitrice de la streptomycine sur la translocation ne devrait donc pas affecter l'efficacité du "frameshift". Néanmoins, elle pourrait affecter le "frameshift" en déstabilisant l'interaction codon-anticodon du peptidyl-tRNA localisé au site P/P. En effet, le mécanisme proposé par Yelverton *et al.* (1994) suggère que le "frameshift" programmé - 1 peut impliquer le glissement d'un seul tRNA (voir section 1.3.2), le peptidyl-tRNA localisé au site P/P. Le glissement se fait avant l'arrivée du prochain aa-tRNA sur le ribosome, et peut avoir lieu à deux moments distincts. Il peut s'effectuer avant l'arrivée du leucyl-tRNA, alors que le phénylalaninyl-tRNA porteur de la chaîne polypeptidique naissante est au site P/P. Mais il peut aussi se dérouler après l'incorporation du leucyl-tRNA, alors que c'est celui-ci qui porte le polypeptide en croissance, et qu'il occupe le site P/P. Dans un cas comme dans l'autre, la déstabilisation du peptidyl-tRNA au site P/P devrait favoriser

le glissement dans le cadre de lecture - 1, et donc stimuler l'efficacité du "frameshift" programmé - 1. Nous proposons donc que la streptomycine a deux effets antagonistes sur le "frameshift" programmé - 1 du VIH. Elle inhibe le "frameshift" programmé - 1 réalisé selon un mécanisme de glissement simultané du ribosome, et des tRNA qui lui sont liés, en accélérant l'occupation du site A/A. Mais elle stimule aussi le "frameshift" programmé - 1 réalisé selon un mécanisme qui implique le glissement d'un seul tRNA localisé au site P/P, par déstabilisation de l'interaction codon-anticodon du peptidyl-tRNA. Les deux effets antagonistes de la streptomycine sur le "frameshift" programmé - 1 s'annulent, ce qui explique que la streptomycine n'a globalement aucun effet sur le "frameshift" programmé - 1.

La streptomycine a donc une action double sur le "frameshift" programmé - 1 dépendamment de l'étape de l'élongation sur laquelle elle agit, avec comme résultat net l'absence d'effet apparent sur le "frameshift" programmé - 1. On sait depuis longtemps que la streptomycine stimule le "frameshift" non programmé (voir section 1.1.2.2.1). Mais, son mécanisme d'action diffère de ceux sur le "frameshift" programmé - 1. La liaison de la streptomycine sur le rRNA de la petite sous-unité à proximité du centre de décodage (Spickler *et al.*, 1997) induit des distorsions au niveau du site A, ce qui favorise la sélection et la liaison d'aa-tRNA erronés. Dépendamment du contexte séquentiel, ces tRNA erronés peuvent glisser en entraînant le ribosome, surtout si le contexte favorise une interaction avec le mRNA. Par contre, des mutants de ribosomes résistants à la streptomycine diminuent le "frameshift" accidentel. En effet, la cinétique des événements qui conduisent à l'occupation du site A/A par un aa-tRNA est plus lente chez ces ribosomes, ce qui permet une meilleure sélection des aa-tRNA. Par conséquent, ces mutants font moins d'erreurs de lecture, et donc moins de "frameshift" accidentel. Il serait intéressant de tester l'effet de tels mutants sur le "frameshift" programmé - 1. Ces mutants qui ralentissent l'occupation du site A/A devraient stimuler le "frameshift" programmé - 1.

4.3 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous avons réussi à reproduire le "frameshift" programmé - 1 du VIH-1 *in vitro* dans un extrait acellulaire d'*E. coli*, l'extrait S30. L'efficacité de "frameshift" observée est d'environ 10%, ce qui est en accord avec l'efficacité du "frameshift" programmé - 1 du VIH mesurée dans un système de traduction eucaryote *in vitro* (Reil *et al.*, 1992). Cependant, l'analyse des efficacités de "frameshift" lors de la délétion de la tige-boucle du site de "frameshift" soulève un problème. En effet, le groupe de Gallant est parvenu à reproduire le "frameshift" programmé - 1 du VIH-1 dans des bactéries en culture, mais en utilisant une construction dans laquelle seule la séquence glissante du site de "frameshift" avait été insérée (Yelverton *et al.*, 1994). Étonnamment, l'efficacité de "frameshift" mesurée est identique à celle mesurée dans des cultures bactériennes par Weiss *et al.* (1989), ceux-ci ayant inséré dans leur construction la totalité de la séquence du site de "frameshift", c'est-à-dire la séquence glissante suivie de la tige-boucle. Dans les systèmes d'expression eucaryotes, la délétion de la séquence codant pour la tige-boucle se traduit par une diminution d'un facteur 3 à 4 de l'efficacité du "frameshift" (Reil *et al.*, 1992; Stahl *et al.*, 1995). Si le système de traduction procaryote acellulaire que nous utilisons constitue un système d'étude valable du "frameshift" programmé du VIH, la délétion de la tige-boucle du site de "frameshift" du VIH-1 devrait refléter la situation observée chez les eucaryotes. Afin de vérifier si la délétion de cette tige-boucle affecte l'efficacité du "frameshift" programmé - 1, nous pourrions déléter la tige-boucle de nos constructions pCPCAT(0) et pCPCAT(-1), et évaluer l'efficacité du "frameshift" après traduction dans l'extrait S30 des messagers issus de la transcription de ces constructions. L'absence d'effet pourrait signifier que la tige-boucle interagit soit avec un facteur cellulaire eucaryote intimement lié au ribosome, mais inexistant chez les bactéries, soit avec une composante du ribosome possédant des caractéristiques différentes chez les eucaryotes et chez les procaryotes. Par contre, si la délétion de la tige-boucle entraînait une diminution de l'efficacité du "frameshift" programmé - 1, nous pourrions suggérer que la tige-boucle interagit avec un facteur, ou une composante ribosomique, possédant des caractéristiques conservées au cours de l'évolution. Il serait alors légitime de regarder si la tige-boucle

n'interagit pas avec le ribosome en réalisant des expériences de pontage. Il a été observé que la modification de la séquence de la boucle de la tige-boucle du VIH provoque une baisse de l'efficacité du "frameshift" (Kollmus *et al.*, 1994), ce qui peut laisser supposer une interaction séquence spécifique avec le ribosome. Un agent pontant introduit au niveau de la boucle pourrait permettre de vérifier cette interaction potentielle.

Notre hypothèse, selon laquelle le ribosome et les deux tRNA qui lui sont liés glissent simultanément alors que l'aa-tRNA est au site A/T, est supportée par l'action de la néamine sur le "frameshift" programmé - 1 du VIH-1. Nos résultats indiquent également que ce mécanisme de glissement simultané ne peut avoir lieu au cours de la translocation comme le prouve l'absence d'effet de la spectinomycine. Cependant, d'après les résultats obtenus avec la streptomycine, le changement de cadre de lecture peut aussi avoir lieu après la translocation. Il s'effectue cette fois-ci selon un second mécanisme qui implique le glissement d'un seul tRNA localisé au site P/P. Le site A est alors libre, et l'aa-tRNA n'occupe pas encore le site d'entrée du ribosome. Les résultats obtenus suite à l'étude du "frameshift" programmé - 1 du virus L-A confirment ceux que nous avons obtenus à partir de l'étude "frameshift" programmé - 1 du VIH-1. Il semble donc que le mécanisme de glissement simultané du "frameshift" programmé - 1 soit conservé entre les virus d'eucaryotes inférieurs et supérieurs, et qu'il peut être reproduit aussi bien chez la levure que chez les bactéries.

Le but ultime de toute recherche touchant de près ou de loin le VIH est de trouver une arme pour combattre la maladie du SIDA causée par ce virus. Nos résultats indiquent que la néamine diminue faiblement, mais significativement l'efficacité du "frameshift" programmé - 1 du VIH-1. Par conséquent, le rapport "Gag" / "Gag-Pol" devrait être augmenté. Toute modification de ce rapport affectant la propagation du virus, il serait intéressant d'analyser comment la néamine cause une diminution de l'efficacité pour développer une nouvelle arme contre ce terrible virus. Le site de liaison de la néamine sur le ribosome est le rRNA 16S. Des études de RMN ont permis de montrer qu'elle se lie dans le sillon majeur de l'hélice de RNA qui constitue le site A, au niveau d'une poche de liaison

unique formée par des appariements de bases non canoniques, et par un nucléotide non apparié et non empilé dans l'hélice (Fourmy *et al.*, 1998). En se liant au site A, la néamine induit des changements conformationnels dans le rRNA 16S, notamment dans une région dénommée boucle 530 qui est impliquée dans la sélection des aa-tRNA. La conformation adoptée par cette région lors de la liaison de l'antibiotique accélère l'occupation du site A en stabilisant l'interaction d'aa-tRNA "pseudo-corrects" à ce site (Powers et Noller, 1994). Comme nous l'avons vu, une telle conformation du rRNA 16S a pour effet de diminuer l'efficacité du "frameshift" programmé - 1. Il existe de petites molécules de RNA nucléolaires (snoRNA) de 70 à 200 nucléotides dont la séquence est complémentaire à certaines régions des rRNA, et qui participent au repliement des rRNA ribosomiques en s'y liant transitoirement (revue dans Bachellerie *et al.* (1995), et dans Steitz et Tycowski (1995)). En nous inspirant de ces snoRNA qui permettent de changer la conformation des rRNA et de faciliter leur repliement, nous pourrions synthétiser des oligonucléotides capables de s'apparier transitoirement à la région correspondant à la boucle 530 dans le rRNA 18S des eucaryotes, qui pourraient faciliter l'occupation du site A/A. L'effet de ces oligonucléotides sur l'efficacité du "frameshift" programmé - 1 du VIH serait testé dans des cellules de mammifères en culture transformées avec un plasmide contenant un gène rapporteur modifié exactement comme le gène CAT que nous avons employé. Le gène rapporteur comporterait la séquence de "frameshift" du VIH, c'est-à-dire la séquence glissante suivie de la tige-boucle, au début de la séquence codante, de sorte que son expression dépende de la réalisation d'un "frameshift" programmé - 1. Des travaux actuels dans notre laboratoire confirment la validité de cette stratégie (Brakier-Gingras *et al.*, 1998).

Références

Atkins JF., Elseviers D., Gorini L. (1972) Low activity of β -galactosidase in frameshift mutants of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**: 1192-1195.

Bachelier J.P., Michot B., Nicoloso M., Balakin A., Ni J., Fournier M.J. (1995) Antisense snoRNAs: a family of nucleolar RNAs with long complementarities to rRNA [Revue]. *Trends Biochem Sci* **20**: 261-264.

Beckler G.S. (1993) Production of milligram amounts of highly translatable RNA using the RiboMAX™ system. *Promega notes* **39**: 12-16.

Bidou L., Stahl G., Grima B., Liu H., Cassan M., Rousset J.P. (1997) In vivo HIV-1 frameshifting efficiency is directly related to the stability of the stem-loop stimulatory signal. *RNA* **3**: 1153-1158.

Bilgin N., Claesens F., Pahverk H., Ehrenberg M. (1991) Kinetic properties of *Escherichia coli* ribosomes with altered forms of S12. *J Mol Biol* **224**: 1011-1027.

Brakier-Gingras L., Melançon P., Côté M., Payant C. Use of antisense DNA oligomers for inhibition of HIV by decreasing ribosomal frameshifting. US patent (n° 5707866); émis le 13 janvier 1998.

Braut V., Miller W.A. (1992) Translational frameshifting mediated by a viral sequence in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2262-2266.

Brierley I., Bourns M.E., Binns M.M., Bilimoria B., Blok V.C., Brown T.D., Brown T.D., Inglis S.C. (1987) An efficient ribosomal frame-shifting signal in the polymerase-encoding region of the coronavirus IBV. *EMBO J* **6**: 3779-3785.

Brierley I., Digard P., Inglis S.C. (1989) Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell* **57**: 537-547.

Brierley I., Jenner A.J., Inglis S.C. (1991) Mutational analysis of the "slippery-sequence" component of a coronavirus ribosomal frameshifting signal. *J Mol Biol* **227**: 463-479.

Brierley I. (1995) Ribosomal frameshifting on viral RNAs [Revue]. *J Gen Virol* **76**: 1885-1892.

Brierley I., Meredith M.R., Bloys A.J., Hagervall, T.G. (1997) Expression of a coronavirus ribosomal frameshift signal in *Escherichia coli*: influence of tRNA anticodon modification on frameshifting. *J Mol Biol* **270**: 360-373.

Brink M.F., Brink G., Verbeet M.P., de Boer H.A. (1994) Spectinomycin interacts specifically with the residues G1064 and C1192 in 16S rRNA, thereby potentially freezing this molecule into an inactive conformation. *Nucleic Acids Res* **22**: 325-331.

- Buckingham R.H., Grentzmann G., Kisselev L. (1997) Polypeptide chain release factors. [Revue]. *Mol Microbiol* **24**: 449-456.
- Bullock W.O., Fernandez J.M., Short J.M. (1987) XL-1 Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *Bio-Techniques*. **5**: 376-379.
- Cassan M., Delaunay N., Vaquero C., Rousset J.P. (1994) Translational frameshifting at the gag-pol junction of human immunodeficiency virus type 1 is not increased in infected T-lymphoid cells. *J Virol* **68**: 1501-1508.
- Chamorro M., Parkin N., Varmus H.E. (1992) An RNA pseudoknot and an optimal heptameric shift site are required for highly efficient ribosomal frameshifting on a retroviral messenger RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 713-717.
- Chang A.C., Cohen S.N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* **134**: 1141-1156.
- Chen X., Chamorro M., Lee S.I., Shen L.X., Hines J.V., Tinoco I. Jr. Varmus H.E. (1995) Structural and functional studies of retroviral RNA pseudoknots involved in ribosomal frameshifting: nucleotides at the junction of the two stems are important for efficient ribosomal frameshifting. *EMBO J* **14**: 842-852.
- Chen X., Kang H., Shen L.X., Chamorro M., Varmus H.E., Tinoco I. Jr. (1996) A characteristic bent conformation of RNA pseudoknots promotes -1 frameshifting during translation of retroviral RNA. *J Mol Biol* **260**: 479-483.
- Choy H.E. (1997) The DNA-directed in vitro protein synthesizing system of *Salmonella typhimurium*: the effect of glutamate substitution. *Biochim Biophys Acta*. **1353**: 61-68.
- Condon B.G., Atkins J.F., Gesteland R.F. (1991) Frameshifting in gene 10 of bacteriophage T7. *J Bacteriol* **173**: 6998-7003.
- Craigie W.J., Caskey C.T. (1986) Expression of peptide chain release factor 2 requires high-efficiency frameshift. *Nature* **322**: 273-275.
- Cundliffe E. (1990) Recognition sites for antibiotics within rRNA (Hill, Dahlberg, Garrett, Moore, Schlessinger, et Warner éd.). Dans *The ribosome, structure, function, and evolution*, American society for microbiology, Washington, D.C., pp. 479-510.
- Dinman J.D., Icho T., Wickner R.B. (1991) A -1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 174-178.

- Dinman J.D., Wickner R.B. (1995) 5 S rRNA is involved in fidelity of translational reading frame. *Genetics*. **141**: 95-105.
- Dinman J.D., Ruiz-Echevarria M.J., Czaplinski K., Peltz S.W. (1997a) Peptidyl-transferase inhibitors have antiviral properties by altering programmed -1 ribosomal frameshifting efficiencies: development of model systems. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 6606-6611.
- Dinman J.D., Kinzy T.G. (1997b) Translational misreading: mutations in translation elongation factor 1 alpha differentially affect programmed ribosomal frameshifting and drug sensitivity. *RNA*. **3**: 870-881.
- Dottin R.P., Pearson M.L. (1973) Regulation by N gene protein of phage lambda of anthranilate synthetase synthesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **70**: 1078-1082.
- Du Z., Giedroc D.P., Hoffman D.W. (1996) Structure of the autoregulatory pseudoknot within the gene 32 messenger RNA of bacteriophages T2 and T6: a model for a possible family of structurally related RNA pseudoknots. *Biochemistry*. **35**: 4187-4198.
- Escoubas J.M., Prere M.F., Fayet O., Salvignol I., Galas D., Zerbib D., Chandler M. (1991) Translational control of transposition activity of the bacterial insertion sequence IS1. *EMBO J* **10**: 705-712.
- Farabaugh P.J. (1996a) Programmed translational frameshifting [Revue]. *Microbiol Rev* **60**: 103-134.
- Farabaugh P.J. (1996b) Programmed translational frameshifting [Revue]. *Annu Rev Genet* **30**: 507-528.
- Farabaugh P.J., Vimaladithan A. (1998) Effect of frameshift-inducing mutants of elongation factor 1alpha on programmed +1 frameshifting in yeast. *RNA*. **4**: 38-46.
- Felsenstein K.M., Goff S.P. (1988) Expression of the gag-pol fusion protein of Moloney murine leukemia virus without gag protein does not induce virion formation or proteolytic processing. *J Virol* **62**: 2179-2182.
- Fourmy D., Recht M.I., Puglisi J.D. (1998) Binding of neomycin-class aminoglycoside antibiotics to the A-site of the 16S rRNA. *J Mol Biol* **277**: 347-362.
- Gesteland R.F., Atkins J.F. (1996) Recoding: dynamic reprogramming of translation [Revue]. *Annu Rev Biochem* **65**: 741-768.
- Green R., Noller H.F. (1997) Ribosomes and translation [Revue]. *Annu Rev Biochem* **66**: 679-716.

- Hatfield D., Oroszlan S. (1990) The where, what and how of ribosomal frameshifting in retroviral protein synthesis [Revue]. *Trends Biochem Sci* **15**:186-190.
- Herold J., Siddell S.G. (1993) An "elaborated" pseudoknot is required for high frequency frameshifting during translation of HCV 229E polymerase mRNA. *Nucleic Acids Res* **21**: 5838-5842.
- Hershey J.W. (1991) Translational control in mammalian cells [Revue]. *Annu Rev Biochem* **60**: 717-755.
- Horsfield J.A., Wilson D.N., Mannering S.A., Adamski F.M., Tate W.P. (1995) Prokaryotic ribosomes recode the HIV-1 gag-pol-1 frameshift sequence by an E/P site post-translocation simultaneous slippage mechanism. *Nucleic Acids Res* **23**: 1487-1494.
- Hughes D., Atkins J.F., Thompson S. (1987) Mutants of elongation factor Tu promote ribosomal frameshifting and nonsense readthrough. *EMBO J* **6**: 4235-4239.
- Jacks T., Varmus H.E. (1985) Expression of the Rous sarcoma virus pol gene by ribosomal frameshifting. *Science* **230**: 1237-1242.
- Jacks T., Townsley K., Varmus H.E., Majors J. (1987) Two efficient ribosomal frameshifting events are required for synthesis of mouse mammary tumor virus gag-related polyproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 4298-4302.
- Jacks T., Power M.D., Masiarz F.R., Luciw P.A., Barr P.J., Varmus H.E. (1988a) Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* **331**: 280-283.
- Jacks T., Madhani H.D., Masiarz F.R., Varmus H.E. (1988b) Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus gag-pol region. *Cell* **55**: 447-458.
- Kang H., Tinoco I. Jr. (1997) A mutant RNA pseudoknot that promotes ribosomal frameshifting in mouse mammary tumor virus. *Nucleic Acids Res* **25**: 1943-1949.
- Kang H. (1998) Direct structural evidence for formation of a stem-loop structure involved in ribosomal frameshifting in human immunodeficiency virus type 1. *Biochim Biophys Acta* **1397**: 73-78.
- Karacostas V., Wolffe E.J., Nagashima K., Gonda M.A., 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.
- Karimi R., Ehrenberg M. (1996) Dissociation rates of peptidyl-tRNA from the P-site of *E. coli* ribosomes. *EMBO J* **15**: 1149-1154.

- Kawakami K., Nakamura Y. (1990) Autogenous suppression of an opal mutation in the gene encoding peptide chain release factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 8432-8436.
- Kim K.H., Lommel S.A. (1994) Identification and analysis of the site of -1 ribosomal frameshifting in red clover necrotic mosaic virus. *Virology*. **200**: 574-82.
- Kitaoka Y. Nishimura N. Niwano M. (1996) Cooperativity of stabilized mRNA and enhanced translation activity in the cell-free system. *J Biotechnol* **48**: 1-8.
- Kollmus H., Honigman A., Panet A., Hauser H. (1994) The sequences of and distance between two cis-acting signals determine the efficiency of ribosomal frameshifting in human immunodeficiency virus type 1 and human T-cell leukemia virus type II in vivo. *J Virol* **68**: 6087-6091.
- Kollmus H., Hentze M.W., Hauser H. (1996) Regulated ribosomal frameshifting by an RNA-protein interaction. *RNA*. **2**: 316-323.
- Kolor K., Lindsley D., Gallant J.A. (1993) On the role of the P-site in leftward ribosome frameshifting at a hungry codon. *J Mol Biol* **230**: 1-5.
- Kozak M. (1989) The scanning model for translation: an update [Revue]. *J Cell Biol* **108**: 229-241.
- Kunkel T.A. (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 488-492.
- Kunkel T.A., Roberts J.D., Zakour R.A. (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol* **154**: 367-382.
- Kurland C.G, Hughes D., Ehrenberg M. (1996) Limitations of translational accuracy. Dans *Salmonella typhimurium et Escherichia coli: cellular and molecular biology*. 2nd edition, volume 1 (Neidhardt éd.) ASM Press, Washington, D.C. pp. 979-1004.
- Larsen B., Wills N.M., Gesteland R.F., Atkins J.F. (1994) rRNA-mRNA base pairing stimulates a programmed -1 ribosomal frameshift. *J Bacteriol* **176**: 6842-6851.
- Larsen B., Peden J., Matsufuji S., Matsufuji T., Brady K., Maldonado R., Wills N.M., Fayet O., Atkins J.F., Gesteland R.F. (1995) Upstream stimulators for recoding [Revue]. *Biochem Cell Biol* **73**: 11-12.
- Larsen B., Gesteland R.F., Atkins J.F. (1997) Structural probing and mutagenic analysis of the stem-loop required for Escherichia coli dnaX ribosomal frameshifting: programmed efficiency of 50%. *J Mol Biol* **271**: 47-60.

- Lesley S.A. (1995) Preparation and use of E. coli S-30 extracts. *Methods Mol Biol* **37**: 265-78.
- Levin M.E., Hendrix R.W., Casjens S.R. (1993) A programmed translational frameshift is required for the synthesis of a bacteriophage lambda tail assembly protein. *J Mol Biol* **234**: 124-139.
- Londei P. (1998) A hypothesis on the mechanism of translational initiation [Revue]. *Biochim Biophys Acta - Gene Structure & Expression* **1396**: 169-178.
- Lowary P, Sampson J., Milligan J., Groebe D., Uhlenbeck O.C (1986) A better way to make RNA for physical studies. *NATO ASI Ser., Ser. A*, **110**: 69-76.
- Mackie G.A., Donly B.C., Wong P.C. (1990) Coupled transcription-translation of ribosomal proteins. Dans *Ribosomes and protein synthesis, a practical approach*. (Spedding éd.). The practical approach series, IRL Press, Oxford, New-York, Tokyo, pp.191- 211.
- Mador N., Panet A., Honigman A. (1989) Translation of gag, pro, and pol gene products of human T-cell leukemia virus type 2. *J Virol* **63**: 2400-2404.
- Maniatis T., Sambrook J., Fritsch E.F. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Marczinke B., Bloys A.J., Brown T.D., Willcocks M.M., Carter M.J., Brierley I. (1994) The human astrovirus RNA-dependent RNA polymerase coding region is expressed by ribosomal frameshifting. *J Virol* **68**: 5588-5595.
- Marlor R.L., Parkhurst S.M., Corces V.G. (1986) The *Drosophila melanogaster* gypsy transposable element encodes putative gene products homologous to retroviral proteins. *Mol Cell Biol* **6**:1129-1134.
- Matsufuji S., Matsufuji T., Miyazaki Y., Murakami Y., Atkins J.F., Gesteland R.F., Hayashi S. (1995) Autoregulatory frameshifting in decoding mammalian ornithine decarboxylase antizyme. *Cell* **80**: 51-60.
- Moazed D., Noller H.F. (1986) Transfer RNA shields specific nucleotides in 16S ribosomal RNA from attack by chemical probes. *Cell* **47**: 985-994.
- Moazed D., Noller H.F. (1989 a) Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P, and E sites. *Cell* **57**: 585-597.
- Moazed D., Noller H.F. (1989 b) Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature* **342**: 142-148.

- Moore R., Dixon M., Smith R., Peters G., Dickson C. (1987) Complete nucleotide sequence of a milk-transmitted mouse mammary tumor virus: two frameshift suppression events are required for translation of gag and pol. *J Virol* **61**: 480-490.
- Nierhaus K.H., Dohme F. (1981) Total reconstitution of 50 S subunits from *Escherichia coli* ribosomes. Dans *RNA and protein synthesis* (Moldave éd.). Selected methods in enzymology series, Academic Press, New-York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, pp.538-544.
- O'Connor M., Thomas C.L., Zimmermann R.A., Dahlberg A.E. (1997) Decoding fidelity at the ribosomal A and P sites: influence of mutations in three different regions of the decoding domain in 16S rRNA. *Nucleic Acids Res* **25**: 1185-93.
- Park J., Morrow C.D. (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.
- Parker J. (1989) Errors and alternatives in reading the universal genetic code [Revue]. *Microbiol Rev* **53**: 273-298.
- Parkin N.T., Chamorro M., Varmus H.E. (1992) Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo. *J Virol* **66**: 5147-5151.
- Phoenix P., Gravel M., Herrington M.B., Brakier-Gingras L. (1985) Neomycin is more efficient than streptomycin in suppressing frameshift mutations. *Canadian Journal of Genetics & Cytology* **27**: 776-779.
- Powers T., Noller H.F. (1994) Selective perturbation of G530 of 16 S rRNA by translational miscoding agents and a streptomycin-dependence mutation in protein S12. *J Mol Biol* **235**: 156-72.
- Proud C.G. (1994) Peptide-chain elongation in eukaryotes [Revue]. *Molecular Biology Reports*. **19**: 161-170.
- Reil H., Kollmus H., Weidle U.H., Hauser H. (1993) A heptanucleotide sequence mediates ribosomal frameshifting in mammalian cells. *J Virol* **67**: 5579-5584.
- Rémy I. (1994) La région à l'extrémité 5' du RNA ribosomique 16S joue-t-elle un rôle dans l'initiation de la synthèse protéique? Mémoire de maîtrise. Département de biochimie, Faculté de Médecine, Université de Montréal.
- Rheinberger H.J., Sternbach H., Nierhaus K.H. (1981) Three tRNA binding sites on *Escherichia coli* ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 5310-5314.

Rodnina M.V., Pape T., Fricke R., Wintermeyer W. (1995) Elongation factor Tu, a GTPase triggered by codon recognition on the ribosome: mechanism and GTP consumption [Revue]. *Biochem Cell Biol* **73**: 1221-1227.

Rose R. (1988) The nucleotide sequence of pACYC177. *Nucleic Acids Res* **16**: 355-356.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.

See Y.P., Jackowski G. (1990) Estimating molecular weights of polypeptides by SDS gel electrophoresis. Dans *Protein structure, a practical approach* (Creighton éd.). The practical approach series, IRL PRESS, Oxford, New-York, Tokyo, pp.1-21.

Seed B., Sheen J. (1988) A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acyltransferase activity. *Gene* **67**: 271-277.

Sekine Y., Ohtsubo E. (1992) DNA sequences required for translational frameshifting in production of the transposase encoded by IS1. *Mol Gen Genet* **235**: 325-332.

Sekine Y., Eisaki N., Ohtsubo E. (1994) Translational control in production of transposase and in transposition of insertion sequence IS3. *J Mol Biol* **235**: 1406-1420.

Shen L.X., Tinoco I. Jr. (1995) The structure of an RNA pseudoknot that causes efficient frameshifting in mouse mammary tumor virus. *J Mol Biol* **247**: 963-978.

Somogyi P., Jenner A.J., Brierley I., Inglis S.C. (1993) Ribosomal pausing during translation of an RNA pseudoknot. *Mol Cell Biol* **13**: 6931-6940.

Spickler C., Brunelle M.N., Brakier-Gingras L. (1997) Streptomycin binds to the decoding center of 16 S ribosomal RNA. *J Mol Biol* **273**: 586-599.

Stahl G., Bidou L., Rousset J.P., Cassan M. (1995) Versatile vectors to study recoding: conservation of rules between yeast and mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **23**: 1557-1560.

Steitz J.A., Tycowski K.T. (1995) Small RNA chaperones for ribosome biogenesis [Revue]. *Science* **270**: 1626-1627.

Studier F.W., Moffatt B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130.

Sung D., Kang H. (1998) Mutational analysis of the RNA pseudoknot involved in efficient ribosomal frameshifting in simian retrovirus-1. *Nucleic Acids Res* **26**: 1369-1372.

- Swanstrom R., Wills J.W. (1997) Synthesis, assembly, and processing of viral proteins. Dans *Retroviruses* (Coffin J.M., Hughes S.H., Varmus H.E. éds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York, pp. 263-334.
- ten Dam E., Pleij C.W.A., Bosch L. (1990) RNA pseudoknots: translational frameshifting and readthrough on viral RNAs. *Virus Genes*. **4**: 121-136.
- ten Dam E., Brierley I., Inglis S., Pleij C. (1994) Identification and analysis of the pseudoknot-containing gag-pro ribosomal frameshift signal of simian retrovirus-1. *Nucleic Acids Res* **22**: 2304-2310.
- Thompson R.C. (1988) EFTu provides an internal kinetic standard for translational accuracy [Revue]. *Trends Biochem Sci* **13**: 91-93.
- Trifonov E.N. (1987) Translation framing code and frame-monitoring mechanism as suggested by the analysis of mRNA and 16 S rRNA nucleotide sequences. *J Mol Biol* **194**: 643-652.
- Tu C., Tzeng T.H., Bruenn J.A. (1992) Ribosomal movement impeded at a pseudoknot required for frameshifting. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 8636-8640.
- Tumer N.E., Parikh B.A., Li P. et Dinman J.D. (1998) The pokeweed antiviral protein specifically inhibits Ty1-directed + 1 ribosomal frameshifting and retrotransposition in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol* **72**: 1036-42.
- Tzeng T.H., Tu C.L., Bruenn J.A. (1992) Ribosomal frameshifting requires a pseudoknot in the *Saccharomyces cerevisiae* double-stranded RNA virus. *J Virol* **66**: 999-1006.
- Vàszquez D. (1979) *Inhibitors of protein synthesis* (Kleinzeller, Springer, Wittman, éd.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York.
- Voet D., Voet J.G. (1995) Chapitre 30: Traduction. Dans *Biochemistry* (Rose éd.). John Wiley & Sons, inc., New-York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, pp. 959-1019.
- Weiss R.B., Gallant J.A. (1986) Frameshift suppression in aminoacyl-tRNA limited cells. *Genetics*. **112**: 727-739.
- Weiss R.B., Dunn D.M., Atkins J.F., Gesteland R.F. (1987) Slippery runs, shifty stops, backward steps, and forward hops: -2, -1, +1, +2, +5 and +6 ribosomal frameshifting. Cold Spring Harbor Symp. *Quant. Biol.*, **52**: 687-693.
- Weiss R.B., Dunn D.M., Shuh M., Atkins J.F., Gesteland R.F. (1989) E. coli ribosomes rephase on retroviral frameshift signals at rates ranging from 2 to 50 percent. *New Biol* **1**: 159-169.

Wenthzel A.M., Stancek M., Isaksson L.A. (1998) Growth phase dependent stop codon readthrough and shift of translation reading frame in *Escherichia coli*. *FEBS lett* **421**: 237-242.

Wilson K.S., Noller H.F. (1998) Molecular movement inside the translational engine [Revue]. *Cell* **92**: 337-349.

Wilson W., Braddock M., Adams S.E., Rathjen P.D., Kingsman S.M., Kingsman A.J. (1988) HIV expression strategies: ribosomal frameshifting is directed by a short sequence in both mammalian and yeast systems. *Cell* **55**: 1159-1169.

Yarus M., Smith D. (1995) tRNA on the ribosome: a waggle theory (Söll, RajBhandary éd.). Dans tRNA: structure, biosynthesis, and function. ASM Press, Washington, D.C., pp. 443-469.

Yelverton E., Lindsley D., Yamauchi P., Gallant J.A. (1994) The function of a ribosomal frameshifting signal from human immunodeficiency virus-1 in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **11**: 303-313.

Zawadzki V., Gross H.J. (1991) Rapid and simple purification of T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **19**: 1948.