

Université de Montréal

**Influence de l'initiation de la traduction sur le
changement programmé du cadre de lecture en -1
responsable de la synthèse des enzymes du virus de
l'immunodéficience humaine de type 1**

par

Johanie Charbonneau

Département de biochimie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Ph. D.
en Biochimie

Mai 2012

© Johanie Charbonneau, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Influence de l'initiation de la traduction sur le changement programmé du
cadre de lecture en -1 responsable de la synthèse des enzymes du
virus de l'immunodéficience humaine de type 1.

Présentée par :
Johanie Charbonneau

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Luc DesGroseillers, président-rapporteur
Dr Léa Brakier-Gingras, directrice de recherche
Dr Gerardo Ferbeyre, codirecteur
Dr Stephen Michnick, membre du jury
Dr Thomas Duchaine, examinateur externe
Dr Christian Beauséjour, représentant du doyen de la FES

Résumé

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). Il faut identifier de nouvelles cibles pour le développement d'agents anti-VIH-1, car ce virus développe une résistance aux agents présentement utilisés. Notre but est d'approfondir la caractérisation de l'étape du changement de cadre de lecture ribosomique en -1 (déphasage -1) nécessaire à la production du précurseur des enzymes du VIH-1. Ce déphasage est programmé et effectué par une minorité de ribosomes lorsqu'ils traduisent la séquence dite glissante à un endroit spécifique de l'ARN messager (ARNm) pleine-longueur du VIH-1. L'efficacité de déphasage est contrôlée par le signal stimulateur de déphasage (SSF), une tige-boucle irrégulière située en aval de la séquence glissante. La structure du SSF est déroulée lors du passage d'un ribosome, mais elle peut se reformer ensuite.

Nous avons montré que des variations de l'initiation de la traduction affectent l'efficacité de déphasage. Nous avons utilisé, dans des cellules Jurkat-T et HEK 293T, un rapporteur bicistronique où les gènes codant pour les luciférases de la *Renilla* (Rluc) et de la luciole (Fluc) sont séparés par la région de déphasage du VIH-1. La Rluc est produite par tous les ribosomes traduisant l'ARNm rapporteur alors que la Fluc est produite uniquement par les ribosomes effectuant un déphasage. L'initiation de ce rapporteur est coiffe-dépendante, comme pour la majorité des ARNm cellulaires. Nous avons examiné l'effet de trois inhibiteurs de l'initiation et montré que leur présence augmente l'efficacité de déphasage. Nous avons ensuite étudié l'effet de la tige-boucle TAR, qui est présente à l'extrémité 5' de tous les ARNm du VIH-1. TAR empêche la liaison de la petite sous-unité du ribosome (40S) à l'ARNm et module aussi l'activité de la protéine kinase dépendante de l'ARN double-brin (PKR). L'activation de PKR inhibe l'initiation en phosphorylant le facteur d'initiation eucaryote 2 (eIF2) alors que l'inhibition de PKR a l'effet inverse. Nous avons étudié l'effet de TAR sur la traduction et le déphasage via son effet sur PKR en utilisant TAR en *trans* ou en *cis*, mais à une certaine distance de l'extrémité 5' afin d'éviter l'interférence avec la liaison de la 40S. Nous avons observé qu'une faible concentration de TAR, qui active PKR, augmente l'efficacité de déphasage alors qu'une concentration

élevée de TAR, qui inhibe PKR, diminue cette efficacité. Nous avons proposé un modèle où des variations de l'initiation affectent l'efficacité de déphasage en modifiant la distance entre les ribosomes parcourant l'ARNm et, donc, la probabilité qu'ils rencontrent un SSF structuré.

Par la suite, nous avons déterminé l'effet de la région 5' non traduite (UTR) de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 sur l'efficacité de déphasage. Cette 5'UTR contient plusieurs régions structurées, dont TAR à l'extrémité 5', qui peut interférer avec l'initiation. Cet ARNm a une coiffe permettant une initiation coiffe-dépendante ainsi qu'un site d'entrée interne des ribosomes (IRES), permettant une initiation IRES-dépendante. Nous avons introduit cette 5'UTR, complète ou en partie, comme 5'UTR de notre ARNm rapporteur bicistronique. Nos résultats démontrent que cette 5'UTR complète inhibe l'initiation coiffe-dépendante et augmente l'efficacité de déphasage et que ces effets sont dus à la présence de TAR suivie de la tige-boucle Poly(A). Nous avons aussi construit un rapporteur tricistronique où les ribosomes exprimant les luciférases utilisent obligatoirement l'IRES. Nous avons observé que cette initiation par l'IRES est faible et que l'efficacité de déphasage correspondante est également faible. Nous avons formulé une hypothèse pour expliquer cette situation. Nous avons également observé que lorsque les deux modes d'initiation sont disponibles, l'initiation coiffe-dépendante est prédominante. Finalement, nous avons étudié l'effet de la protéine virale Tat sur l'initiation de la traduction et sur l'efficacité de déphasage. Nous avons montré qu'elle augmente l'initiation de la traduction et que son effet est plus prononcé lorsque TAR est située à l'extrémité 5' des ARNm. Nous proposons un modèle expliquant les effets de Tat sur l'initiation de la traduction par l'inhibition de PKR ainsi que par des changements de l'expression de protéines cellulaires déroulant TAR.

Ces résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes régissant le déphasage du VIH-1, ce qui est essentiel pour le développement d'agents anti-déphasage.

Mots-clés : changement de cadre de lecture programmé -1, déphasage, site d'entrée interne du ribosome (IRES), traduction, virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1).

Abstract

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is responsible for the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). HIV-1 develops a resistance towards the inhibitors used to treat infected patients. It is thus important to identify new targets for the development of novel antiretroviral agents. The aim of our work was to better characterize the programmed -1 ribosomal frameshift which generates the precursor of HIV-1 enzymes. The frameshift occurs at a specific sequence of HIV-1 full-length messenger RNA (mRNA), the slippery sequence, and is performed by a minority of the ribosomes translating this mRNA. The frameshift efficiency is controlled by the frameshift stimulatory signal (FSS), an irregular stem-loop located downstream of the slippery sequence. FSS structure is unfolded by every ribosome translating this region and can refold afterwards.

We showed that HIV-1 frameshift efficiency is affected by changes in the rate of translation initiation. We transfected Jurkat-T and HEK 293T cells with a bicistronic reporter that contains the frameshift region of HIV-1 between the *Renilla* luciferase (Rluc) and the firefly luciferase (Fluc) genes. Rluc is produced by all ribosomes translating this reporter whereas only ribosomes that make a -1 frameshift produce Fluc. The translation of the reporter is initiated via a cap-dependant mode, like the majority of cellular mRNAs. We first determined the effect of three inhibitors of translation initiation. We showed that their presence increases the frameshift efficiency. We next determined the impact of the TAR stem-loop, which is located at the 5' end of every HIV-1 mRNA. TAR is known to impair the binding of the small subunit of the ribosome (40S) to the mRNA. TAR also modulates the activity of the double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR). When PKR is activated, it phosphorylates the eukaryotic initiation factor 2 (eIF2), inhibiting translation initiation. The inhibition of PKR has the opposite effect. We studied the effect of TAR on PKR by positioning TAR at a distance of the 5' end where it cannot interfere with the binding of the 40S. Our results showed that a small amount of TAR, which activates PKR, increases the frameshift efficiency whereas a large amount of TAR, which inhibits PKR, decreases it. A model is presented where the variations of translation initiation modulate

HIV-1 frameshift efficiency by altering the distance between the elongating ribosomes. This influences the probability that these ribosomes encounter or not a folded FSS.

We next observed the effect of the 5' untranslated region (UTR) of HIV-1 full-length mRNA on its frameshift efficiency. This 5'UTR contains several structured parts, including TAR at the 5' end, which can inhibit translation initiation. This mRNA has a cap and an internal ribosome entry site (IRES) and could then use a cap-dependent and an IRES-dependent mode of translation initiation. We replaced the 5'UTR of our bicistronic reporter mRNA by the complete 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA or a part of it. Our results showed that the presence of the complete 5'UTR inhibits cap-dependent initiation of translation and increases the frameshift efficiency. Those effects are mostly due to the presence of TAR followed by a Poly(A) stem-loop. We also constructed a tricistronic reporter where the ribosomes translating the luciferases have to use an IRES-dependent initiation mode. The rate of this initiation was low and the frameshift efficiency obtained was also low. We proposed a hypothesis accounting for this situation. We also observed that when both initiation modes are available, the cap-dependent mode seems to be highly favored. Finally, we studied the impact of the Tat viral protein on translation initiation and frameshift efficiency. We showed that the presence of Tat increases translation initiation and decreases the frameshift efficiency. Those effects are more important when TAR is present at the 5' end of mRNA. We propose a model explaining the effects of Tat on translation initiation by the inhibition of PKR and by changes in the expression of cellular proteins that are able to unfold TAR.

Our results allow us to better understand the mechanisms controlling HIV-1 frameshift, which will help in the development of drugs targeting the HIV-1 frameshift.

Keywords: human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), internal ribosome entry site (IRES), programmed -1 ribosomal frameshift, translation.

Table des matières

Chapitre 1	Introduction	1
1.1	Problématique	1
1.1	Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)	3
1.1.1	Cycle de réplication virale	5
1.1.1.1	La phase précoce	5
1.1.1.2	La phase tardive	7
1.2	Les ARN messagers viraux	9
1.2.1	L'ARN viral pleine-longueur du VIH-1 et sa région 5'UTR	11
1.2.1.1	TAR	11
1.2.1.2	Poly(A)	14
1.2.1.3	PBS et PAS	14
1.2.1.4	Le signal d'initiation de la dimérisation (DIS)	15
1.2.1.5	Le site donneur majeur d'épissage (SD)	15
1.2.1.6	Le signal d'encapsidation (ψ)	16
1.3	Protéines virales	16
1.3.1	Précurseur Gag	17
1.3.2	Précurseur Gag-Pol	18
1.3.3	Précurseur Env	19
1.3.4	Protéines régulatrices	20
1.3.4.1	Tat	20
1.3.4.2	Rev	23
1.3.5	Protéines accessoires	23
1.4	Synthèse protéique	25
1.4.1	Élongation de la traduction	26
1.4.2	Terminaison de la traduction	31
1.4.3	Recyclage des ribosomes et réinitiation	31
1.4.4	Les ribosomes	33
1.4.5	Initiation de la traduction coiffe-dépendante eucaryote	37

1.4.5.1	Régulation de la traduction coiffe-dépendante	41
1.4.5.2	Inhibiteurs de la traduction coiffe-dépendante.....	45
1.4.6	Initiation IRES-dépendante.....	47
1.5	Traduction des ARN messagers viraux.....	51
1.5.1	Initiation coiffe-dépendante des ARNm du VIH-1	51
1.5.2	L'initiation IRES-dépendante	53
1.5.3	La traduction coiffe-dépendante est inhibée lors de l'infection virale.....	54
1.5.4	Les protéines cellulaires qui influencent la traduction du VIH-1	55
1.6	Reprogrammation de la traduction.....	57
1.6.1	Translecture d'un codon de terminaison (<i>readthrough</i>)	57
1.6.2	Saut du ribosome (<i>hopping</i> ou <i>bypassing</i>).....	59
1.6.3	Le changement de cadre de lecture ribosomique programmé (déphasage)	61
1.6.3.1	Le changement de cadre de lecture +1 (déphasage +1)	62
1.6.3.2	Le changement de cadre de lecture -1 (déphasage -1).....	63
1.6.3.3	Quelques exemples de déphasage -1	67
1.6.4	Le changement de cadre de lecture -1 (déphasage -1) chez le VIH-1	68
1.6.4.1	Structures nécessaires au déphasage -1 du VIH-1	68
1.6.4.2	Description de l'événement du déphasage -1 du VIH-1	71
1.6.4.3	L'importance du rapport Gag-Pol/Gag	73
1.7	Description du projet de recherche	74
Chapitre 2	The presence of the TAR RNA structure alters the programmed -1 ribosomal frameshift efficiency of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by modifying the rate of translation initiation.	77
Chapitre 3	The 5' UTR of HIV-1 full-length mRNA and the Tat viral protein modulate the programmed -1 ribosomal frameshift that generates HIV-1 enzymes	108
	The 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA and the Tat viral protein modulate the programmed -1 ribosomal frameshift that generates HIV-1 enzymes.....	109
Chapitre 4	Discussion	141
4.1	Effet de l'initiation de la traduction sur l'efficacité de déphasage du VIH-1	144

4.1.1	Effet de la région 5'UTR sur le taux d'initiation de la traduction et sur l'efficacité de déphasage.....	145
4.1.2	La présence de la protéine Tat du VIH-1 augmente le taux d'initiation de la traduction.....	149
4.1.3	La distance entre les ribosomes traduisant l'ARNm influence l'efficacité de déphasage.....	155
4.2	L'efficacité de déphasage du VIH-1	156
4.2.1	Initiation coiffe-dépendante versus IRES-dépendante.....	157
4.3	Développement d'agents anti-VIH-1 ciblant le déphasage.....	161
4.4	Conclusions et perspectives	163
	Bibliographie.....	166
	Annexe I Targeting frameshifting in the human immunodeficiency virusi.....	i

Liste des figures

Figure 1-1 : Représentation schématique de la structure d'un virion mature du VIH-1	6
Figure 1-2 : Cycle de réplication du VIH-1	8
Figure 1-3 : Représentation schématique du génome et des transcrits d'ARNm du VIH-1.	10
Figure 1-4 : Représentation schématique de la 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1	12
Figure 1-5 : Représentation des trois isoformes de la protéine Tat.	22
Figure 1-6 : Exemple de sites classiques et hybrides occupés par les ARNt dans la région de décodage des ribosomes lors de la traduction.....	28
Figure 1-7 : Représentation schématique des étapes de l'élongation de la traduction chez les eucaryotes.....	30
Figure 1-8 : Représentation schématique de l'étape de terminaison de la traduction et de recyclage du ribosome chez les eucaryotes.....	32
Figure 1-9 : Structure du ribosome 80S de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et structure cristallographique du ribosome (70S) de la bactérie <i>Thermus thermophilus</i>	34
Figure 1-10: Représentation de l'initiation de la traduction coiffe-dépendante chez les eucaryotes.....	38
Figure 1-11 : Représentation de deux facteurs d'initiation de la traduction dont la régulation influence le taux d'initiation (adapté de Hentze et al. 2007)..	42
Figure 1-12 : Activation ou inhibition de la protéine kinase PKR par l'ARN db.....	44
Figure 1-13 : Mode d'action de l'hippuristanol, de la rapamycine et de la thapsigargine, trois inhibiteurs de l'initiation coiffe-dépendante.....	46
Figure 1-14 : Schéma représentant l'initiation de la traduction IRES-dépendante par la 40S aidée de facteurs d'initiation.....	48
Figure 1-15 : Exemple d'IRES contenus dans la 5'UTR d'ARNm.....	50
Figure 1-16 : Représentation schématique de la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 et délimitation de l'IRES contenu dans ce 5'UTR.	52
Figure 1-17 : Modèle de translecture lors de la traduction de l'ARNm du virus de la leucémie murine (MLV).	58

Figure 1-18 : Modèle du saut de ribosome lors de la traduction de l'ARNm du gène 60 du phage T4.....	60
Figure 1-19 : Modèle de déphasage +1 lors de la traduction de l'ARNm codant pour l'antizyme de l'ornithine décarboxylase (ODC.	64
Figure 1-20 : Exemple de région de déphasage -1 du virus de l'immunodéficience simienne (SIV), du coronavirus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) et du gène <i>dnaX</i> d' <i>Escherichia coli</i>	66
Figure 1-21 : La région de déphasage du VIH-1.....	70
Figure 1-22 : L'événement de déphasage du VIH-1.....	72
Figure 2-1 : HIV-1 frameshift efficiency increases in the presence of inhibitors of cap-dependent translation initiation.	101
Figure 2-2 : HIV-1 frameshift efficiency decreases when a high amount of TAR is present.	103
Figure 2-3 : PKR is involved in the decrease in HIV-1 frameshift efficiency observed when a high amount of TAR is present.	104
Figure 2-4 : Wild-type TAR, but not the TAR mutants, increases or decreases HIV-1 frameshift efficiency in a dose-dependent manner.	105
Figure 2-5 : The effect of TAR on HIV-1 frameshift efficiency disappears when PKR expression is silenced.....	106
Figure 2-6 : Changes in the rate of translation initiation influence the frameshift efficiency by modifying the spacing between elongating ribosomes.	107
Figure 3-1 : Schematic representation of the 5'UTR and frameshifting region of HIV-1 full-length mRNA.	135
Figure 3-2 : Scheme of the vectors used to assess HIV-1 frameshift efficiency.	136
Figure 3-3 : Influence of the 5'UTR of the reporter mRNA on frameshift efficiency with a dual-luciferase system in Jurkat T cells.	138
Figure 3-4 : HIV-1 frameshifting relative to the type of 5'UTR of the dual-luciferase reporter mRNA in HEK 293T cells	139
Figure 3-5 : Tat decreases HIV-1 frameshift efficiency in a dose-dependent manner.	140

Figure 4-1 : La présence d'un mutant de Tat, TatK41T, n'affecte pas l'efficacité de déphasage dans des cellules Jurkat-T.....	152
Figure 4-2 : Modèle de la régulation de la traduction des ARNm du VIH-1 par la protéine Tat.	154
Figure 4-3 : Le taux d'initiation de la traduction affecte l'efficacité de déphasage en modulant l'espace entre les ribosomes parcourant l'ARNm.	158

Liste des abréviations

4E-BP	<i>4E-binding protein</i> ; protéine liant le facteur d'initiation eIF4E
ABCE1	<i>ATP-binding cassette E1</i> ; cassette E1 liant l'ATP
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNg	ARN génomique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
ATP	adénosine triphosphate
AZT	azidothymidine ou zidovudine, un inhibiteur de la transcriptase inverse
BMH	<i>branched multiple hairpin</i> ; tige-boucle à plusieurs embranchements
Brd4	<i>bromodomain protein</i> ; protéine à bromodomaine
BYDV	<i>Barley yellow dwarf virus</i> ; virus du nanisme jaune de l'orge
CA	capside
CAT	chloramphenicol acetyltransférase
CDK9	<i>Cyclin-dependent kinase 9</i> ; kinase dépendante de la cycline 9
CPSF	<i>Cleavage Polyadenylation Specificity Factor</i> ; facteur spécifique de clivage au site de polyadénylation
db	double-brin
Dbp5	<i>DEAD-box protein 5</i> ; protéine 5 à boîte DEAD (Acide aspartique-Glutamate-Alanine-Acide aspartique)
DDX3	hélicase d'ARN contenant un motif DEAD (Acide aspartique-Glutamate-Alanine-Acide aspartique)
DIS	signal d'initiation de la dimérisation
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eEF	facteur d'élongation eucaryote
eIF	facteur d'initiation eucaryote
EMCV	<i>encephalomyocarditis virus</i> ; virus de l'encéphalomyélite murine

Env	précurseur des protéines de l'enveloppe
FACS	<i>cell sorting in flow cytometry</i> ; cytométrie en flux
Fluc	<i>Firefly luciferase</i> ; luciférase de la luciole
fMet	N-formylméthionine
GCN2	<i>general control non-derepressible-2</i> , désigne une des quatre kinases phosphorylant le facteur d'initiation eIF2
GDP	guanosine diphosphate
GFP	<i>green fluorescent protein</i> ; protéine fluorescente verte
GTP	guanosine triphosphate
HLA-II	antigènes de leucocytes humains
hnRNP	ribonucléoprotéine hétérologue nucléaire
HRI	<i>heme-regulated inhibitor</i> ; une des quatre kinases phosphorylant eIF2, qui est contrôlée par la présence d'hème
hRIP	protéine humaine interagissant avec Rev
HuR	<i>human embryonic-lethal abnormal vision (ELAV)-like protein</i> , protéine stabilisant l'ARNm
IBV	coronavirus de la bronchite infectieuse aviaire
IF	facteur d'initiation
IN	intégrase
IRES	<i>internal ribosome entry site</i> ; site d'entrée interne des ribosomes
ITAF	<i>IRES trans-acting factors</i> ; facteur ayant une activité trans-activatrice sur les IRES
kb	kilobase
LEDGF/p75	<i>lens epithelium-derived growth factor</i> ; facteur de croissance dérivé de l'épithélium de la lentille
LDI	<i>long-distance interaction</i> ; interaction longue distance
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i> ; région répétitive longue
Lys	lysine
MA	matrice
Met	méthionine

MLV	<i>murine leukemia virus</i> ; virus de la leucémie murine
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i> ; protéine kinase (cible de la rapamycine)
NC	nucléocapside
Nef	<i>Negative Factor</i> ; facteur négatif
nt	nucléotide
ODC	ornithine décarboxylase
PABP	<i>polyA binding protein</i> ; protéine liant la queue de poly(A)
PAS	<i>primer activation signal</i> ; signal d'activation de l'amorce
PBS	<i>primer binding site</i> ; site de liaison de l'amorce
PEG10	<i>paternally expressed gene 10</i>
PERK	une des quatre kinase phosphorylant eIF2, localisé dans le réticulum endoplasmique
PIC	complexe de préintégration
PKR	une des quatre kinase phosphorylant eIF2, dépendante de l'ARN db
PolII	ARN polymérase II
PP1c	sous-unité catalytique de la phosphatase I
PR	protéase
pTEFb	<i>positive transcription elongation factor</i> ; facteur d'élongation de la transcription
RACK1	récepteur pour la kinase C activée
RF	<i>release factor</i> ; facteur de terminaison
RFP	<i>red fluorescent protein</i> ; protéine fluorescente rouge
RHA	<i>RNA helicase A</i> ; hélicase d'ARN A, aussi appelée DHX9
Rluc	<i>Renilla luciferase</i> ; luciférase de la <i>Renilla</i>
RMN	résonance magnétique nucléaire
RRE	élément de réponse à Rev
RRF	facteur de recyclage du ribosome
RRL	lysate de réticulocytes de lapin
RSV	rétrovirus du sarcome de Rous
RT	transcriptase inverse

sb	simple-brin
SD	<i>Major Splice Donor</i> ; site donneur majeur d'épissage
SHAPE	<i>selective 2'hydroxyl acylation analyzed by primer extension</i>
shARN	courts ARN interférants
SIDA	syndrome de l'immunodéficience acquise
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i> ; virus de l'immunodéficience du singe
smFRET	<i>single molecule fluorescence resonance energy transfer</i>
SRAS	virus du syndrome respiratoire aigu sévère
SSF	signal stimulateur de <i>frameshift</i>
SU	protéine de la surface
TAR	<i>trans-activator response element</i> ; élément de réponse à la transactivation
Tat	trans-activateur de la transcription
TFM	<i>transframe</i>
TM	protéine transmembranaire
TRBP	<i>TAR RNA-binding protein</i> ; protéine liant l'ARN TAR
USE	<i>Upstream Sequence Element</i>
UTR	<i>Untranslated region</i> ; région non traduite
Vif	<i>viral infectivity factor</i> ; facteur d'infectivité viral
VIH-1	virus de l'immunodéficience humaine de type 1
VIH-2	virus de l'immunodéficience humaine de type 2
Vpr	<i>viral protein R</i> ; protéine virale R
Vpu	<i>viral protein U</i> ; protéine virale U
ZMWs	<i>zero-mode waveguides</i>

À l'homme de ma vie.

Remerciements

Je tiens premièrement à remercier ma directrice de recherche, Dre Léa Brakier-Gingras pour son support incomparable, ses encouragements et la confiance qu'elle a eue en moi tout au long de mes années d'études. Son encadrement et sa disponibilité m'ont permise de me rendre où je suis rendue aujourd'hui. Elle m'a aussi aider à vaincre certaines de mes craintes grâce à toutes les présentations qu'elle m'a poussée à faire! Je veux aussi remercier mon codirecteur, Dr Gerardo Ferbeyre, pour sa collaboration et pour les discussions intéressantes et pertinentes que nous avons eu. Je remercie également le Dr Nikolaus Heveker et le Dr Luc DesGroseillers avec qui j'ai eu le plaisir de discuter de mes projets.

Je veux aussi remercier mes collègues de laboratoire, Dominic Dulude, Karine Gendron, Mélissa Léger, Gabriel Théberge-Julien, Alexandra Cadar ainsi que nos nombreux stagiaires. Il a toujours été agréable d'aller travailler au laboratoire grâce à vous! Je tiens à remercier plus particulièrement Karine qui m'a initiée à la recherche lors de mon arrivée au laboratoire. De plus, nos conversations sur nos différents projets de recherche, sur les romans et sur la vie en général ont toujours été très plaisantes! Un merci particulier aussi à Dominic pour toute la patience qu'il a su démontrer face à mes nombreuses questions ainsi que pour ses précieux conseils.

Un merci tout particulier à mon mari Philippe qui m'a toujours supportée, autant financièrement que moralement. Ton support face à chacune de mes décisions a été inestimable. Je ne crois pas que j'aurais pu réussir sans toi!

Finalement, je tiens à remercier ma famille, Serge, Johanne et Olivier, qui m'a aidée et encouragée à poursuivre dans mes études. Je veux aussi dire merci à ma belle-famille, André, Lise, Michel, Aline et Annabel. Vous m'avez tous encouragée et supportée ces dernières années. Merci, cela m'a énormément aidée!

Chapitre 1

Introduction

1.1 Problématique

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est l'agent infectieux responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). Approximativement 34 millions de personnes étaient infectées par le VIH-1 à la fin de 2010 (UNAIDS 2010). Cette épidémie a atteint une dimension pandémique, bien que l'Afrique demeure la région la plus touchée. La proportion d'adultes infectés à l'échelle mondiale est d'environ 1 %, mais passe à 5,9 % lorsque seule la population africaine subsaharienne est considérée (Lutz et al. 2010). Plus de 70 % des nouvelles infections en 2009 ont eu lieu dans cette région du monde (UNAIDS 2010).

Le VIH-1 a été identifié en 1983 par le groupe de Montaigner (Barre-Sinoussi et al. 1983) et provient d'une transmission virale inter-espèce à partir d'un virus ayant infecté des chimpanzés d'Afrique. Plus spécifiquement, l'espèce *Pan troglodytes troglodytes* est la source de la transmission inter-espèce ayant abouti à l'infection de l'humain par le VIH-1. Quatre transmissions indépendantes sont à l'origine des quatre groupes du virus (voir section 1.1). Le virus se lie aux récepteurs CD4⁺ et infecte les lymphocytes T-CD4⁺ de l'hôte, ainsi que les cellules dendritiques et les macrophages, ce qui cause le SIDA. En absence de thérapie antirétrovirale, l'infection par le VIH-1 mène à une destruction des lymphocytes T-CD4⁺, ce qui conduit progressivement à une réponse immunitaire défectueuse et au développement d'infections opportunistes chez l'hôte (Lutz et al. 2010). Les thérapies actuelles permettent d'inhiber la progression virale et assurent ainsi une meilleure qualité de vie aux personnes infectées par le virus. Cependant, ces thérapies ne permettent pas de guérir une personne infectée par le VIH-1, à cause de la présence de réservoirs, principalement dans des lymphocytes mémoires T-CD4⁺, où le virus est latent

(revue par Palmer et al. 2011). De plus, le VIH-1 a une capacité élevée de mutations durant sa réplication, ce qui conduit à l'émergence de souches résistantes aux thérapies utilisées. Il devient donc essentiel de trouver de nouvelles cibles afin de produire de nouveaux agents anti-VIH-1.

Le VIH-1 est un membre de la famille des rétrovirus. Les rétrovirus possèdent un génome d'acide ribonucléique (ARN) simple-brin (sb) et ils sont caractérisés par une étape dans leur cycle de réplication qui implique la copie de leur ARN génomique (ARNg) en acide désoxyribonucléique (ADN) double-brin (db) par leur transcriptase inverse (RT) (Berkhout 1996). Les génomes des rétrovirus codent pour trois gènes principaux : *gag*, *pol* et *env* qui codent respectivement pour les précurseurs des protéines de structure, des enzymes virales et des protéines de l'enveloppe (voir sections 1.3.1, 1.3.2 et 1.3.3). Le VIH-1 fait partie de la sous-classe des lentivirus, les plus complexes des rétrovirus, qui codent pour six gènes produisant des protéines régulatrices et des protéines accessoires en plus des trois gènes principaux. Le VIH de type 2 (VIH-2) est également un rétrovirus faisant partie de la sous-classe des lentivirus, qui cause le SIDA. Il a une origine différente de celle du VIH-1 et provient d'une transmission inter-espèce avec les mangabeys enfumés. Le VIH-2 est beaucoup moins virulent que le VIH-1 et il attaque beaucoup plus lentement le système immunitaire des personnes infectées (Gao et al. 1999).

Le VIH-1 subit plusieurs recombinaisons génétiques au cours de sa réplication et est sujet à un haut taux de mutations lors de la copie de son ARNg en ADN db, car sa RT est dépourvue d'une fonction d'édition des erreurs. Ces deux effets combinés entraînent une hétérogénéité de la population virale et permettent au VIH-1 de contourner rapidement les réponses immunitaires de l'hôte ainsi que de développer une résistance aux médicaments anti-VIH-1 (Freed 2001). Les médicaments antirétroviraux les plus utilisés sont des inhibiteurs de la RT (comme l'AZT (azidothymidine ou zidovudine) et la nevirapine) et des inhibiteurs de la protéase virale (PR) (comme la ritonavir et la saquinavir). Des inhibiteurs de l'entrée du virus (comme T20) ont aussi fait leur apparition et il existe également des inhibiteurs de l'intégrase (IN) (comme le raltegravir) (Reitz and Gallo 2010; Waheed and Freed 2011). Parmi tous les médicaments utilisés, un seul cible une protéine cellulaire. Il

s'agit du maraviroc qui bloque le corécepteur CCR5, un des corécepteurs nécessaires à l'entrée du VIH-1 dans les cellules hôtes. Le VIH-1 peut en effet utiliser deux corécepteurs des chémokines différents pour infecter les cellules, le corécepteur CCR5 (cellules tropiques M) ou le corécepteur CXCR4 (cellules tropiques T) (Hunt and Romanelli 2009) (voir section 1.1.1.1).

Lors de mes études de doctorat, je me suis intéressée à la régulation d'une étape essentielle de la réplication virale, le changement de cadre de lecture programmé -1 (déphasage -1) qui a lieu lors de la traduction d'un des ARN messagers (ARNm) viraux. Ce déphasage permet la synthèse des enzymes virales. J'ai étudié la relation entre l'initiation de la traduction de cet ARNm et l'efficacité de déphasage. Cette introduction va explorer les mécanismes de traduction, plus précisément l'étape d'initiation de la traduction et le déphasage -1. Nous examinerons brièvement les caractéristiques du mode de réplication du VIH-1 ainsi que les étapes régissant la traduction des ARNm du VIH-1.

1.1 Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)

Le VIH-1 provient d'une transmission inter-espèce par un virus ayant infecté le chimpanzé *Pan troglodytes troglodytes*. Les quatre groupes du VIH-1 (M pour « main », N pour « new », O pour « outlier » et P (nommé ainsi pour suivre l'ordre alphabétique) (Plantier et al. 2009)) découlent de quatre transmissions distinctes. Le groupe M semble venir d'une transmission dans le sud-est du Cameroun et il est le groupe responsable de la pandémie. Il est subdivisé en neuf sous-types principaux (A, B, C, D, F, G, H, J, K), basés sur la séquence des trois protéines communes aux rétrovirus (Gag, Pol et Env). Les sous-types les plus répandus mondialement sont les sous-types C et A. Par contre, le sous-type le plus couramment étudié est le sous-type B, qui est retrouvé en Amérique du Nord et en Europe (Lutz et al. 2010; Reitz and Gallo 2010). Dans nos études, nous avons utilisé le virus du groupe M, sous-type B comme outil.

Le principal espoir d'éradication du VIH-1 réside dans la prévention. Effectivement, un problème majeur avec les rétrovirus est que, quand une cellule hôte est infectée, le génome viral est intégré dans le génome de la cellule hôte. L'infection est par conséquent

assurée d'être aussi longue que la vie de la cellule. Il est donc impensable de retirer ou de détruire toutes les cellules infectées chez un patient. La présence de réservoirs où le virus est retrouvé latent complique ainsi la situation. Par conséquent, le patient sera traité afin d'empêcher la réplication du virus, et ce, jusqu'à son décès. La toxicité des inhibiteurs utilisés et le développement d'une résistance du virus à ces inhibiteurs sont alors à prendre en considération lors du traitement (Reitz and Gallo 2010).

Afin de miser sur la prévention, plusieurs groupes de recherche travaillent sur le développement de vaccins contre le VIH-1. Bien qu'aucun vaccin ne soit présentement disponible pour prévenir l'infection, certains vaccins sont actuellement en phase d'études cliniques. C'est le cas pour le SAV001, un vaccin basé sur un virus génétiquement modifié, qui a été rendu inactif par une méthode mise au point par l'équipe du Dr Kang à l'université Western Ontario (Ha 2011). Par ailleurs, certaines personnes sont naturellement résistantes à l'infection par le VIH-1 grâce à une délétion de 32 bases dans leurs deux copies du gène codant pour le corécepteur CCR5. Hütter et al. (2009) ont étudié les effets d'une transplantation de moelle osseuse provenant d'un donneur homozygote pour le gène CCR5 avec la délétion de 32 bases chez un patient séropositif pour le VIH-1 infecté par une souche de tropisme M (CCR5). Les résultats indiquent que le patient est entré en rémission à long terme, et ce, sans prendre de médicaments antirétroviraux. Ces résultats sont une belle illustration de l'avancement de la lutte contre le VIH-1.

Les virions matures sont composés de deux copies d'ARNg liées à plusieurs copies de nucléocapside (NC ou p7), le tout étant entouré de multiples copies de capsid (CA ou p24). La particule contient des enzymes virales (PR ou p11, IN ou p31 et RT ou p66/p51), certaines protéines accessoires, dont la protéine virale R (Vpr), une amorce pour la transcription inverse, l'ARN de transfert 3 pour la lysine (ARNt^{Lys3}), et plusieurs protéines cellulaires, dont Staufen, RHA (hélicase d'ARN A aussi appelée DHX9) et HLA-II (antigènes de leucocytes humains) (revue par Ott 2008; Bannert et al. 2010). Les virions sont entourés de deux couches de membranes lipidiques obtenues lors du bourgeonnement de la particule virale à partir de la membrane de la cellule hôte. La couche interne de cette membrane est recouverte de protéines matrices (MA ou p17) et la membrane contient les

protéines virales de l'enveloppe (Env), soit les protéines transmembranaires (TM ou gp41) et les protéines de surface (SU ou gp120). Un virion mature est de forme sphérique et possède un diamètre d'environ 100 nm (Figure 1-1).

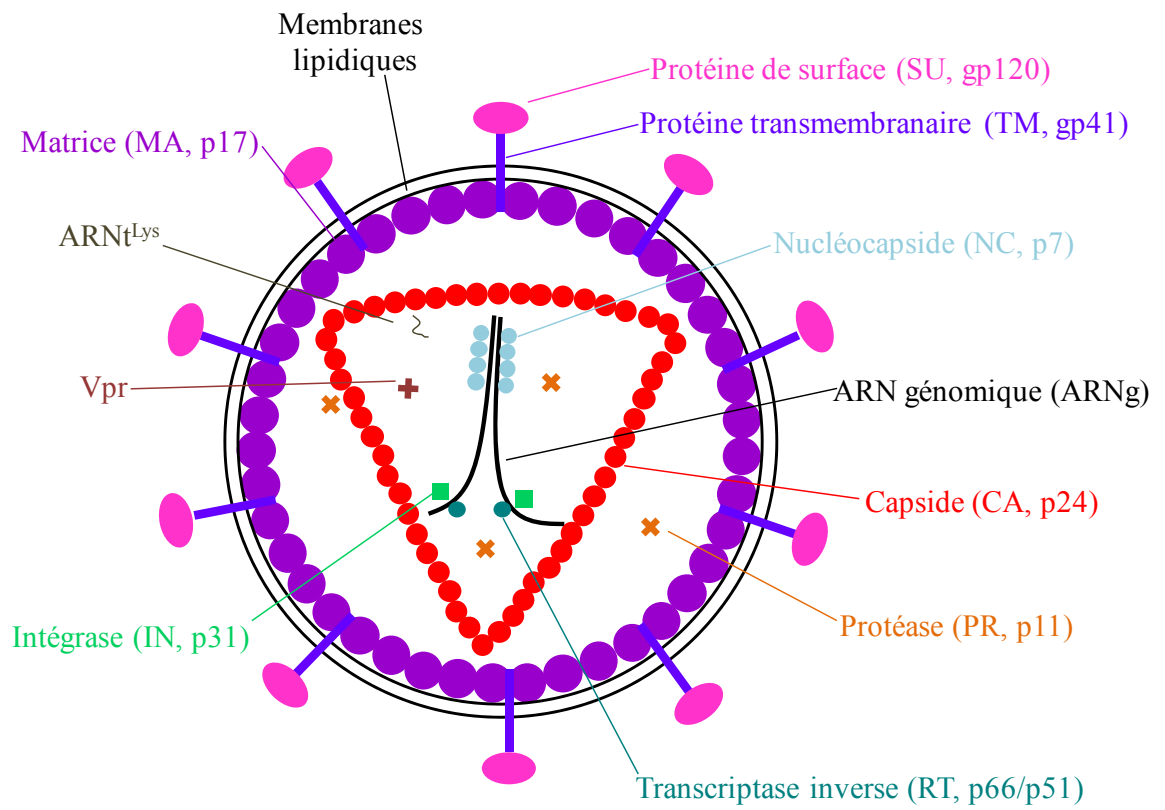
1.1.1 Cycle de réplication virale

Le cycle de réplication du VIH-1 est composé d'une série d'événements pouvant être divisés en deux phases (Figure 1-2). La phase précoce regroupe les étapes allant de l'entrée du virus dans la cellule hôte jusqu'à l'intégration de son génome dans le génome de cette cellule. La phase tardive correspond aux étapes allant de la transcription du génome viral jusqu'à la relâche des virions dans le milieu extracellulaire (revue par Freed 2001; Checkley et al. 2011; Waheed and Freed 2011).

1.1.1.1 La phase précoce

Le cycle de réplication du VIH-1 débute avec l'entrée du virus dans la cellule hôte. Le virion se lie à la cellule hôte (un lymphocyte T-CD4+, un macrophage ou une cellule dendritique) en liant un récepteur CD4 ainsi qu'un corécepteur. Ce dernier est un récepteur des chémokines, soit CXCR4 (cellules tropiques T) et CCR5 (cellules tropiques M). Il y a alors fusion des membranes induite par un changement de conformation des protéines de l'enveloppe du virion. Le virus est ensuite relâché dans le cytoplasme de la cellule. Par la suite, il y a décapsulation du virus et formation d'un complexe permettant la transcription inverse, c'est-à-dire la copie de l'ARNg en ADN db (Mothes and Uchil 2010). La transcription inverse a lieu lorsqu'une molécule d'ARNt^{Lys3}, l'amorce, se lie au site de liaison à l'amorce (PBS, *Primer Binding Site*) de l'ARNg. La synthèse de l'ADN s'effectue par la RT. Lors de la transcription inverse, la RT passe d'un ARNg à l'autre, ce qui augmente la recombinaison génétique (voir section 1.3.2) (revue par Jones et al. 2008). Une fois la synthèse de l'ADN viral terminée, l'ADN est prêt à être transporté au noyau en formant un complexe de préintégration (PIC). Ce complexe contient, outre l'ADN viral, deux enzymes virales, IN et RT, la protéine de structure MA et la protéine accessoire Vpr. Suite à l'entrée du PIC dans le noyau, IN catalyse l'insertion de l'ADN viral db dans un

Figure 1-1 : Représentation schématique de la structure d'un virion mature du VIH-1. À côté du nom de chaque protéine, nous avons indiqué l'abréviation utilisée pour la désigner ainsi que son poids moléculaire (adaptée de Freed 2001).



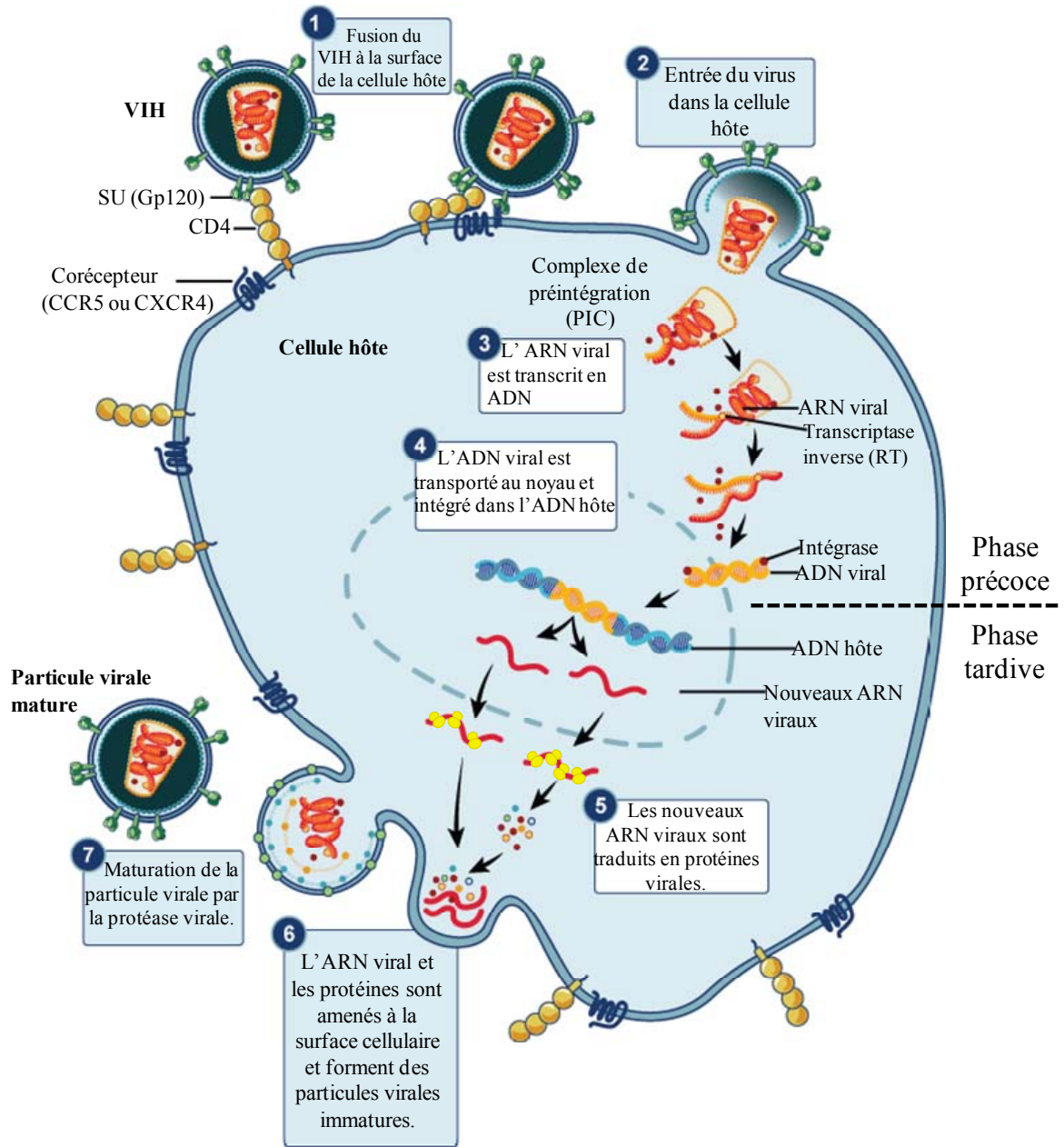
chromosome de la cellule hôte. Pour ce faire, elle retire plusieurs nucléotides aux extrémités 3' des deux brins d'ADN viral puis produit des coupures dans l'ADN cellulaire. L'ADN viral est alors inséré dans les sites de coupures et lié à l'ADN cellulaire. L'intégration est complétée par la réparation de l'ADN par les enzymes cellulaires qui remplissent les trous entre l'ADN viral intégré et l'ADN cellulaire. Une fois inséré dans le chromosome, l'ADN viral est traité comme un gène cellulaire.

1.1.1.2 La phase tardive

Suite à l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte, la transcription a lieu. L'ARN polymérase II (PolII) utilise le promoteur viral contenu dans la longue région répétée (LTR; *Long Terminal Repeat*) à l'extrémité du génome viral afin de produire les ARN viraux. Les premières protéines à être produites sont Tat (trans-activateur de la transcription) et Rev. La présence de la protéine Tat est essentielle à la transcription des ARNm viraux, car l'activité basale de transcription de l'ADN viral est très faible. Elle augmente graduellement avec l'accumulation de Tat (voir section 1.3.4.1). Cette activité de Tat nécessite des protéines cellulaires (la cycline T1 et la kinase dépendante de la cycline 9 (CDK9; *Cyclin-dependent kinase 9*)), qui permettent à Tat de se lier à la tige-boucle TAR (*trans-activator response element*) présente à l'extrémité 5' de tous les ARNm viraux. La cycline T1 et CDK9 forment le facteur pTEFb (*positive transcription elongation factor*). Tat permet la liaison du pTEFb à TAR, entraînant ainsi la phosphorylation de PolII. Cette phosphorylation augmente la processivité de PolII, stimulant alors grandement la transcription des ARNm viraux (revue par Karn and Stoltzfus 2012).

Suite à l'étape de transcription, certaines molécules d'ARNm viraux subissent un épissage afin d'obtenir les différents ARNm du VIH-1 (voir section 1.2). Les ARNm partiellement épissés et non épissés ne sont pas transportés directement au cytoplasme par le système d'export des ARNm cellulaires. Leur transport nécessite l'aide de la protéine Rev qui lie une structure nommée l'élément de réponse à Rev (RRE; *Rev Responsive Element*), un motif d'ARN en *cis* des ARNm partiellement épissés et non épissés. En effet, la liaison de plusieurs molécules de Rev au RRE d'un ARNm viral facilite l'exportation de

Figure 1-2 : Cycle de réplication du VIH-1. Le cycle de réplication du VIH-1 se sépare en deux phases. La phase précoce commence par la reconnaissance des récepteurs cellulaires et va jusqu'à l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte. La phase tardive s'étend de la transcription de l'ADN viral jusqu'à la maturation du virion relâché (adaptée de NIAID 2011).



cet ARNm du noyau vers le cytoplasme. Les ARNm sont alors traduits dans le cytoplasme afin de produire toutes les protéines nécessaires à la réplication virale.

Les différentes composantes des virions sont amenées à proximité de la membrane cellulaire, au site d'assemblage et de relâche des particules virales (Jouvenet et al. 2006; Ganser-Pornillos et al. 2008). Deux copies de l'ARNg sb sont alors encapsidées avec plusieurs protéines virales et cellulaires (pour les détails concernant la composition du virion, voir la Figure 1-1 et la section 1.1). Plusieurs molécules de Gag se lient à la membrane cellulaire dans des régions appelées radeaux lipidiques. Ces radeaux sont riches en cholestérol et en sphingolipides. Gag aide au bourgeonnement des particules virales et, par sa liaison aux radeaux lipidiques, permet la production de virions possédant une membrane riche en cholestérol et en sphingolipides. Les virions qui sont relâchés sont dits immatures, car ils ne sont pas encore infectieux. La maturation s'effectue grâce à PR, contenue dans Gag-Pol, qui clive les précurseurs Gag et Gag-Pol afin d'obtenir les protéines de structure et les enzymes virales. Les particules virales sont alors prêtes à infecter de nouvelles cellules et à recommencer un cycle de réplication.

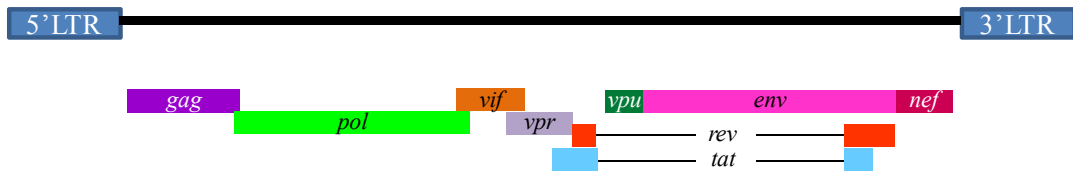
1.2 Les ARN messagers viraux

L'ADN viral est inséré dans le génome de la cellule infectée. L'appareil à transcription de la cellule transcrit alors l'ADN viral en ARNm. L'ADN viral est transcrit comme un ADN cellulaire. L'ARN obtenu possède, tout comme les ARNm cellulaires, une coiffe à son extrémité 5' et une queue de poly(A) à son extrémité 3'. La présence d'une coiffe et d'une queue de poly(A) permet la traduction coiffe-dépendante et protège l'ARNm de la dégradation par les exonucléases (voir section 1.4.5).

L'ARN viral pleine-longueur, d'une taille de 9 kilobases (kb), peut servir à la fois d'ARNm et d'ARNg. L'ARN viral pleine-longueur contient cinq sites donneurs d'épissage et neuf sites accepteurs d'épissage. L'épissage de cet ARNm viral pleine-longueur permet la production des autres ARNm du VIH-1 (voir Figure 1-3). Une fraction des ARNm viraux est complètement épissée (ARN multi-épissés de 1,7 à 2,0 kb) et code pour Rev, Tat et

Figure 1-3 : Représentation schématique A) du génome et B) des transcrits d'ARNm du VIH-1. Plus de 40 espèces d'ARNm viraux, produites suite à différents épissages, permettent la production des 15 protéines virales. Les précurseurs Gag et Pol proviennent du même ARNm. Pol est en effet produit en fusion avec Gag grâce à un événement de changement de cadre de lecture -1 (déphasage -1) (voir section 1.6.4). Env et Vpu proviennent aussi d'un ARNm commun. Env est produit grâce à un mécanisme de balayage avec fuites (*leaky scanning*) (voir section 1.4.5).

A)



B)

ARN pleine-longueur



ARN mono-épissés



ARN multi-épissés



Nef (*Negative Factor*). Une autre partie des ARNm est mono-épissée (ARN mono-épissés de 4,0 à 5,0 kb) permettant la production de Env, Vif (*viral infectivity factor*), Vpu (*viral protein U*) et Vpr. Finalement, certains ARNm sont non épissés (ARN pleine-longueur de 9,0 kb), permettant la production de Gag et Gag-Pol. En tout, il y a production de plus de 40 espèces d'ARNm différents (revue par Lenasi et al. 2010; Karn and Stoltzfus 2012).

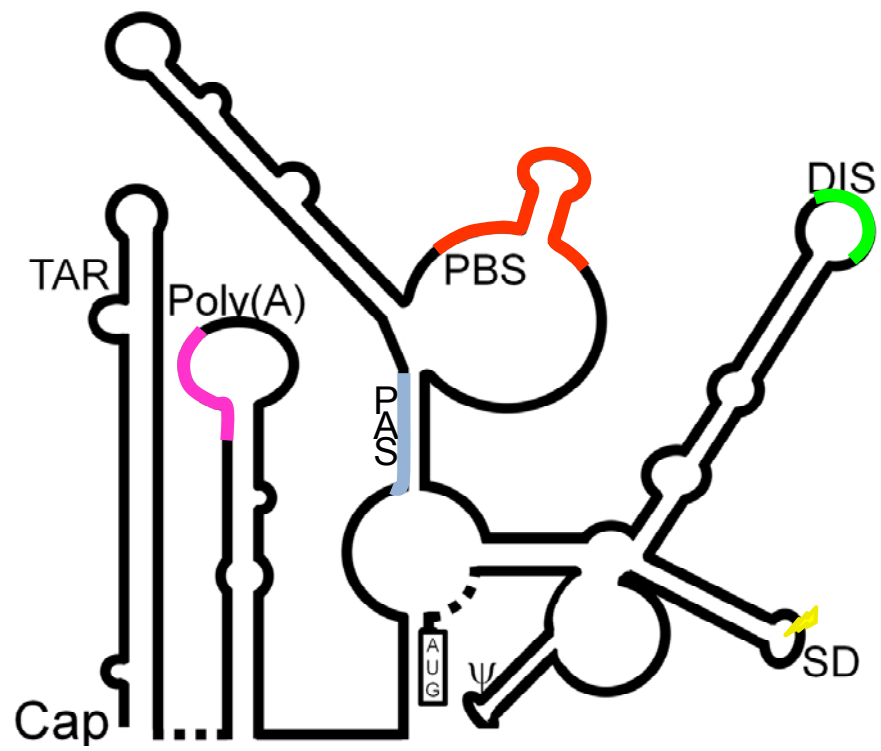
1.2.1 L'ARN viral pleine-longueur du VIH-1 et sa région 5'UTR

L'ARN viral pleine-longueur du VIH-1 est à la fois l'ARNg et l'ARNm non épissé qui code pour les précurseurs Gag et Gag-Pol. Cet ARN possède une coiffe, une queue de poly(A) et une région 5' non traduite (UTR; *Untranslated Region*) longue et structurée. Parmi les modèles proposés pour la conformation de la 5'UTR de l'ARN pleine-longueur du VIH-1, le groupe de Berkhout (Huthoff and Berkhout 2001) a proposé deux conformations indépendantes qui seraient en équilibre : BMH (*branched multiple hairpin*) et LDI (*long-distance interaction*). Ils ont déterminé ces conformations en utilisant uniquement la région 5'UTR *in vitro*. Cependant, plus récemment, le groupe de Weeks (Wilkinson et al. 2008; Watts et al. 2009) a déterminé, en utilisant une technologie de pointe (SHAPE; *selective 2'hydroxyl acylation analyzed by primer extension*), la conformation du génome complet du VIH-1. Ils ont ainsi déterminé que la 5'UTR de l'ARN pleine-longueur du VIH-1 existe sous une seule conformation (conformation de Weeks, voir Figure 1-4). La conformation BMH est similaire à la conformation de Weeks, avec seulement de légères différences, alors que la conformation LDI n'est pas détectée dans les cellules infectées ou dans les particules virales. La région 5'UTR contient des éléments régulateurs qui contrôlent plusieurs étapes du cycle de réplication virale comme la transcription, l'épissage, la traduction, la dimérisation des ARN pleine-longueur et l'encapsidation (revue par Berkhout 1996).

1.2.1.1 TAR

La tige-boucle TAR (*Trans-activation response element*; élément de réponse à la transactivation) est présente aux extrémités 5' et 3' de tous les ARNm produits par le

Figure 1-4 : Représentation schématique de la 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 en suivant la conformation de Weeks déterminée par SHAPE (*selective 2'hydroxyl acylation analyzed by primer extension*) (adaptée de Wilkinson et al. 2008). Les éléments régulateurs dans cette région sont indiqués : la tige-boucle TAR, la tige-boucle Poly(A) contenant le signal de polyadénylation (en rose), le signal d'activation de l'amorce (PAS; en bleu), le site de liaison de l'amorce (PBS; en rouge), le site d'initiation de la dimérisation (DIS; en vert), le site donneur majeur d'épissage (SD; en jaune) et le signal d'encapsidation (ψ). Le codon d'initiation (AUG) est encadré.



VIH-1. TAR est également présente dans le cytoplasme des cellules infectées sous forme de courts fragments d'ARN (58 à 66 nucléotides (nt)) provenant de transcriptions avortées (Gunnery et al. 1992; Kessler and Mathews 1992). De plus, la présence de TAR en 3' pourrait protéger l'ARN contre les exonucléases. Elle y joue également un rôle dans la polyadénylation. En effet, Vrolijk et al. (2009) ont démontré que la déstabilisation de la structure de TAR en 3' des ARNm réduit la polyadénylation. La présence de TAR à l'extrémité 5' des ARNm a principalement été étudiée pour son importance dans la transactivation de la transcription des ARNm du VIH-1. Cette transactivation se produit dans le noyau des cellules infectées et nécessite la liaison de TAR par Tat, la cycline T1 et CDK9 (voir section 1.3.4.1).

TAR est une tige-boucle stable ($\Delta G \approx -25$ kcal/mol) (Verhoef et al. 1997) et le fait de déstabiliser cette tige-boucle entraîne des défauts de réplication du virus. Ceci résulte du fait que des résidus non pairés de TAR interagissent alors avec d'autres régions de la 5'UTR interférant ainsi avec leur fonction (Vrolijk et al. 2008). De plus, la présence d'une structure stable ($\Delta G \approx -25$ à -30 kcal/mol) à l'extrémité 5' d'un ARNm interfère avec l'initiation de la traduction coiffe-dépendante en empêchant une liaison efficace de la petite sous-unité du ribosome (Kozak 1989; Babendure et al. 2006). Il s'en suit que la présence de TAR à l'extrémité 5' des ARNm entraîne une inhibition de la traduction des ARNm (voir par exemple Parkin et al. 1988).

Des protéines cellulaires, dont la protéine autoantigène La (Chang et al. 1994; Svitkin et al. 1994), TRBP (protéine liant l'ARN TAR; *TAR RNA binding protein*) (Gatignol et al. 1991; Dorin et al. 2003) et Staufen (Dugre-Brisson et al. 2005), lient TAR. Elles permettent une traduction plus efficace des ARNm contenant TAR, probablement en déstabilisant, directement ou indirectement, la structure de cette tige-boucle. Certaines hélicases cellulaires contribuent aussi à déstabiliser TAR. Par exemple, RHA lie TAR (Fujii et al. 2001) et permet une augmentation de la traduction des ARNm du VIH-1 (Bolinger et al. 2010). DDX3, une hélicase d'ARN contenant un motif DEAD (Acide aspartique-Glutamate-Alanine-Acide aspartique), augmente la traduction des ARNm du VIH-1 (Liu et al. 2011), mais sa liaison à TAR n'a pas été montrée. Un autre effet de TAR sur la

traduction est sa capacité à moduler l'activité de la protéine kinase dépendante de l'ARN db (PKR). L'activation de cette kinase entraîne une inhibition de l'initiation de la traduction coiffe-dépendante alors qu'une inhibition de cette kinase active ce mode d'initiation (voir section 1.4.5.1). Lorsque TAR est présente en petite quantité, elle active PKR et, inversement, lorsqu'elle est présente en grande quantité, elle inhibe PKR (revue par Clerzius et al. 2011). L'effet de PKR sur l'initiation de la traduction des ARNm viraux est moins important que celui causé par le blocage de l'entrée de la petite sous-unité du ribosome à l'extrémité 5' de l'ARNm par TAR, mais, contrairement au blocage de la liaison de la 40S qui affecte spécifiquement les ARNm viraux, il affecte la synthèse protéique globale.

1.2.1.2 Poly(A)

La présence de TAR et de Poly(A) à l'extrémité 5' de l'ARNm entraîne une inhibition de la traduction encore plus importante qu'en présence de TAR seulement. Cet effet est dû à la stabilisation de TAR par la présence de Poly(A) (Parkin et al. 1988). La région Poly(A) contient le signal de polyadénylation (AAUAAA). Cette région forme une tige-boucle stable à l'extrémité 5' ce qui inhibe la polyadénylation à cet endroit. À l'extrémité 3', le signal de polyadénylation contenu dans la région Poly(A) est clivé permettant la polyadénylation des ARNm viraux. Une région en amont de ce signal, USE (*Upstream Sequence Element*), facilite la polyadénylation des ARNm en recrutant plus efficacement le facteur CPSF (*Cleavage Polyadenylation Specificity Factor*) (Gilmartin et al. 1995).

1.2.1.3 PBS et PAS

La région liant l'amorce de la RT, PBS, est située dans la région 5'UTR de l'ARNm viral pleine-longueur. En amont du PBS est situé le signal d'activation de l'amorce (PAS). La liaison de l'amorce, un ARN^{Lys3} cellulaire, au PBS dans la 5'UTR déclenche la transcription inverse. Cette amorce a une parfaite complémentarité de 18 nt à son extrémité 3' avec le PBS (voir Figure 1-4 et revue par Rein et al. 2011). Une seconde

interaction de 8 nt de l'amorce avec le PAS augmente l'efficacité de l'étape de transcription inverse du cycle de réplication du VIH-1 (Beerens and Berkhout 2002; Ooms et al. 2007).

1.2.1.4 Le signal d'initiation de la dimérisation (DIS)

Le DIS est composé d'une séquence de 35 nt située dans la 5'UTR des ARNg. Il forme une tige-boucle qui expose une séquence en palindrome au niveau de la boucle. Ce palindrome est conservé parmi les différentes formes du VIH-1. L'interaction entre deux DIS a lieu lorsque les deux séquences en palindrome forment un complexe boucle-boucle appelé *the kissing-loop complex*. Le DIS joue un rôle central dans la dimérisation des ARNg (revue par Moore and Hu 2009). L'étape de dimérisation des ARNg se produit avant l'encapsidation dans les particules virales. Les dimères d'ARNg sont reconnus par les protéines Gag, ce qui aiderait à les cibler pour l'encapsidation (Moore et al. 2007).

La dimérisation des ARNg est aussi importante pour l'étape de transcription inverse. L'insertion de mutations dans la séquence du DIS entraîne un blocage du cycle de réplication virale de ces mutants à cette étape précoce. Lors de la transcription inverse, la RT passe d'un ARNg à l'autre, ce qui augmente la recombinaison génétique (voir section 1.3.2) (revue par Jones et al. 2008).

1.2.1.5 Le site donneur majeur d'épissage (SD)

Le processus d'épissage du transcrit viral pleine-longueur est régulé afin de produire les différents ARNm requis pour la réplication virale et s'effectue par le retrait des introns du 5' en direction 3' (Bohne and Krausslich 2004). L'épissage du transcrit pleine-longueur du VIH-1 est complexe dû à la présence de plusieurs sites d'épissage, dont plusieurs sites accepteurs d'épissage peu efficaces situés environ au milieu de sa séquence. Il possède aussi plusieurs sites donneurs d'épissage. Le site donneur majeur est le site SD situé dans la 5'UTR. Bien que le transcrit pleine-longueur du VIH-1 contienne plusieurs sites donneurs d'épissage, l'inhibition de l'activité du site SD ralentit considérablement l'épissage de ce transcrit, ce qui nuit à la production des protéines provenant des ARNm viraux multi-épissés ou mono-épissés (revue par Abbink and Berkhout 2008).

1.2.1.6 Le signal d'encapsidation (ψ)

Le signal d'encapsidation ψ , avec l'aide de NC et de la région DIS, est nécessaire à l'encapsidation ainsi qu'à la dimérisation de l'ARNg. Cet ARNg est en compétition avec plusieurs ARN viraux et cellulaires lors de l'incorporation dans les particules virales. Le signal d'encapsidation marque l'ARNg comme étant l'ARN à encapsider (revue par Clever et al. 2002; Lu et al. 2011; Rein et al. 2011).

1.3 Protéines virales

Le VIH-1 est un lentivirus de la famille des rétrovirus avec un génome d'ARN de 9 kb qui code pour 15 protéines (voir Figure 1-3). Comme chez tous les rétrovirus, les gènes *gag*, *pol* et *env* codent respectivement pour le précurseur des protéines de structure, le précurseur des enzymes et le précurseur des protéines de l'enveloppe. Le précurseur Gag, aussi appelé Pr55^{Gag}, lorsque clivé par PR, permet la production de la matrice (MA ou p17), de la capsid (CA ou p24), de la nucléocapsid (NC ou p7), de p6 et deux peptides espaceurs (SP1 et SP2). MA, CA et NC sont les protéines de structure, car elles forment la structure des particules virales, entourant les deux brins d'ARNg, alors que p6 est nécessaire à la relâche des particules virales de la membrane cellulaire. Par ailleurs, les peptides espaceurs jouent un rôle dans la maturation des virions. Le précurseur de l'enveloppe (Env), aussi nommé gp160, est clivé par une protéase cellulaire pour produire des protéines de surface (SU ou gp120) et transmembranaires (TM ou gp41). Les protéines de l'enveloppe se retrouvent à la membrane des virions et elles permettent l'interaction (via SU) avec les récepteurs cellulaires ainsi que l'ancrage et la fusion avec la cellule hôte (via TM). Le précurseur Pol, en fusion avec Gag, est appelé Pr160^{GagPol}. Pol est clivé par PR afin de produire la protéase (PR ou p11), la transcriptase inverse (RT ou p66/p51) et l'intégrase (IN ou p31). Le VIH-1 produit aussi deux protéines régulatrices : Tat, qui est principalement connue pour son rôle dans l'activation de la transcription des ARNm viraux, et Rev, qui est impliquée dans le transport des ARN viraux du noyau vers le cytoplasme. Le VIH-1 produit aussi des protéines accessoires, Vpu, Vif, Vpr et Nef, qui ne sont pas essentielles à la réplication virale *in vitro*. Elles sont cependant nécessaires pour une

réplication virale efficace *in vivo* (revue par Freed 2001; Bannert et al. 2010; Checkley et al. 2011; Waheed and Freed 2011).

1.3.1 Précurseur Gag

Le précurseur Gag est produit par la traduction de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 en suivant les règles conventionnelles de traduction. Le clivage de ce précurseur permet la production des protéines MA, CA, NC, p6, SP1 et SP2.

Le domaine MA sur le précurseur Gag permet de diriger Gag et Gag-Pol vers la membrane plasmique alors que la liaison de MA avec le domaine C-terminal de TM lui permet d'aider l'incorporation de Env dans les particules virales. Suite au bourgeonnement et à la maturation des particules virales, les protéines MA forment une couche directement sous la membrane des particules. Enfin, suite à l'infection d'une nouvelle cellule, MA participe à l'étape de décapsidation ainsi qu'à la formation du PIC.

Lors de l'assemblage des virions, le domaine CA de Gag contribue à l'interaction Gag-Gag, ce qui promeut l'assemblage des particules virales. Suite à la relâche des particules virales et à leur maturation, les protéines CA forment le cœur de la particule virale et entourent le génome d'ARN.

Une fonction importante du domaine NC du précurseur Gag, est de lier spécifiquement le signal d'encapsidation ψ , afin de guider l'ARNg vers un virion en cours d'assemblage. La relâche des particules virales est également dépendante de la présence de NC, car elle permet de recruter des facteurs cellulaires, des membres de la voie d'exportation cellulaire (ESCRT; *endosomal sorting complex required for transport*) nécessaires à cette étape (Dussupt et al. 2011). Suite au clivage de Gag lors de la maturation des particules virales, NC recouvre l'ARNg en s'y liant. Suite à l'infection d'une nouvelle cellule hôte, NC promeut la liaison de l'amorce (ARNt^{Lys3}) au PBS et défait les structures secondaires de l'ARNg viral permettant un mouvement efficace de la RT sur cet ARN.

Le clivage du précurseur Gag entraîne également la production de p6 qui joue un rôle important à la fin du cycle de réplication du VIH-1. p6 stimule l'incorporation de la protéine virale Vpr dans les particules virales en favorisant l'interaction de Vpr avec p55

(voir section 1.3.5). Elle influence aussi la liaison de NC à l'ARN et elle aide à la relâche des particules virales en recrutant des facteurs cellulaires (les mêmes que NC) nécessaires à cette étape du cycle de réplication virale.

1.3.2 Précurseur Gag-Pol

La traduction du précurseur Gag est effectuée en suivant les règles conventionnelles de traduction et son cadre de lecture est dit 0. La production du précurseur Pol a lieu à la suite d'un événement particulier, un changement de cadre de lecture programmé -1 (déphasage -1), lors de la traduction de Gag, ce qui permet la synthèse de la protéine de fusion Gag-Pol (voir section 1.6). Cet événement permet aux rétrovirus de produire les précurseurs Gag et Gag-Pol dans des proportions optimales à leur réplication. Le précurseur Gag-Pol contient les mêmes protéines que le précurseur Gag exceptée p6 et SP2, car elles sont situées dans le cadre de lecture 0 à la suite du site où s'effectue le déphasage -1. Le précurseur Gag-Pol produit en plus les enzymes PR, RT et IN, ainsi que la protéine *transframe* (TFP) et p6^{pol}. (Hill et al. 2002; Scarlata and Carter 2003).

PR est un produit du clivage de Gag-Pol et elle fonctionne comme un homodimère. C'est une protéase dont le site actif contient un acide aspartique. Lors de la relâche des particules virales, comme indiqué plus haut, ces particules sont immatures et non infectieuses. PR clive les précurseurs Gag et Gag-Pol présents dans ces virions. À la suite d'un réarrangement conformationnel des composantes des virions, les particules virales sont matures et peuvent infecter d'autres cellules. La vitesse de clivage des précurseurs Gag-Pol est influencée par p6 et SP2 ainsi que par TFP et p6^{pol}.

L'étape préalable à l'intégration du génome viral dans les chromosomes de la cellule hôte est la transcription inverse de l'ARNg viral en ADN db. La RT (p66/p51) est aussi un produit du clivage de Gag-Pol. La protéine p66 contient un domaine d'ADN polymérase ainsi qu'un domaine enzymatique ARNase H alors que la protéine p51, qui provient d'un clivage de p66, contient seulement le domaine d'ADN polymérase. La RT est active sous forme de dimère, généralement un hétérodimère p66/p51. Elle est l'élément-clé de la transcription inverse qui est initiée grâce à l'amorce ARNt^{Lys3} s'appariant au PBS dans

la 5'UTR de l'ARNg (voir section 1.2.1.3). Cette amorce est incorporée dans les particules virales lors de l'assemblage. La RT est caractérisée par une faible processivité et un taux d'erreur élevé d'environ 10^{-3} à 10^{-4} erreurs par base. Lors de la transcription inverse, la RT génère l'ADN viral en décodant l'ARNg présent en dimère. Elle passe d'un ARNg à l'autre, ce qui entraîne une recombinaison (revue par Moore and Hu 2009).

IN est une autre protéine produite à la suite du clivage de Gag-Pol par PR. Suite à l'étape de transcription inverse, l'ADN viral incorporé dans le PIC est amené au noyau. IN catalyse une série de réactions pour intégrer le génome viral à l'intérieur d'un chromosome de la cellule hôte. Une protéine cellulaire, LEDGF/p75 (*lens epithelium-derived growth factor*), qui joue un rôle dans la régulation transcriptionnelle de l'hôte, est un cofacteur important d'IN qui agit probablement en amenant le PIC à l'ADN de la cellule hôte (revue par Engelman and Cherepanov 2008). Une fois liée à l'ADN cellulaire, IN induit des coupures dans cet ADN et elle y stimule l'intégration de l'ADN viral dans le chromosome de la cellule hôte. L'intégration peut avoir lieu à plus d'un site à l'intérieur du génome. Les enzymes cellulaires de réparation de l'ADN vont ensuite réparer les coupures de l'ADN, finalisant ainsi l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte.

1.3.3 Précurseur Env

Le précurseur Env est exprimé à partir du même ARNm que Vpu grâce à un balayage avec fuites (*leaky scanning*), car le contexte dans lequel se trouve le codon d'initiation de Vpu n'est pas optimal (voir section 1.4.5) (Bolinger and Boris-Lawrie 2009). Env est le précurseur des protéines responsables de l'attachement des virions aux cellules hôtes et des protéines qui facilitent l'entrée du virus à l'intérieur de ces cellules. Le clivage d'Env par une protéase cellulaire génère deux protéines, soit la protéine de surface et la protéine transmembranaire.

Les protéines de surface (dites SU ou gp120) sont localisées à la surface de la membrane virale. L'entrée du matériel viral dans la cellule a lieu suite à la liaison de SU aux récepteurs de la cellule hôte. SU lie les récepteurs CD4 avec une grande affinité. Cette interaction demande la présence de corécepteurs, comme les récepteurs de chémokines

CXCR4 (cellules tropiques T) et CCR5 (cellules tropiques M). Ces interactions ne sont pas suffisantes pour permettre l'entrée du matériel viral dans la cellule hôte. Les protéines transmembranaires (dites TM ou gp41) sont aussi nécessaires afin de provoquer la fusion entre les membranes virales et cellulaires suite à la liaison des virions aux récepteurs.

1.3.4 Protéines régulatrices

Les lentivirus sont, nous l'avons dit, des rétrovirus complexes dont le génome code également pour deux protéines régulatrices, Tat et Rev.

1.3.4.1 Tat

La protéine régulatrice Tat est retrouvée sous deux formes dans les cellules infectées : la forme composée de deux exons (101 acides aminés) et la forme composée d'un exon (72 acides aminés). Il existe également une forme de 86 acides aminés souvent utilisée dans les études en laboratoire. Il s'agit d'une forme tronquée à l'extrémité C-terminale de la forme de 101 acides aminés qui est retrouvée dans certaines souches de laboratoire tel que Lai, HBX2 et NL4-3 (Jeang et al. 1999). Ces trois isoformes de Tat permettent la transactivation de la transcription dans le noyau des cellules (voir ci-dessous). Tat est séparée en 5 régions : le domaine acide N-terminal (acides aminés 1-21), le domaine d'activation (acides aminés 22-48), la région basique (acides aminés 49-59), la région riche en arginine/glutamine (acides aminés 60-72) et la région C-terminale (acides aminés 73-101) qui contribue aux effets non transcriptionnels de Tat (voir Figure 1-5) (Lenasi et al. 2010; Lopez-Huertas et al. 2010).

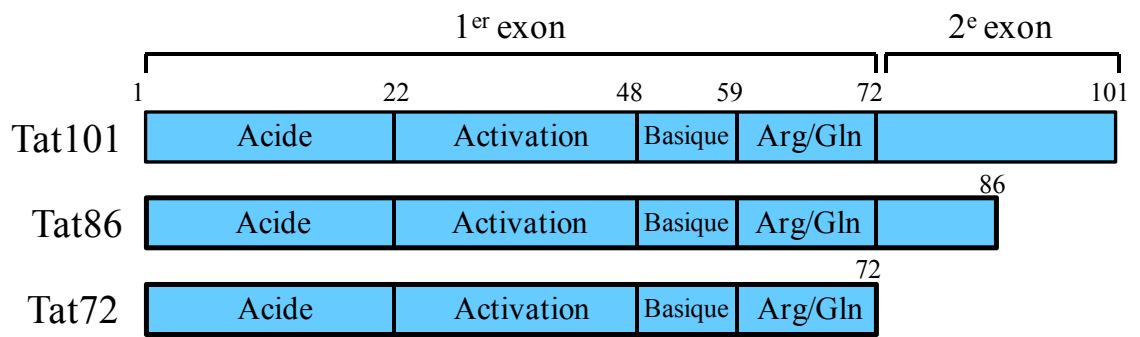
La fonction la plus étudiée de Tat est la transactivation de la transcription. Elle entraîne une augmentation de la transcription des ARNm viraux d'environ 100 fois. Tat interagit avec les ARNm viraux lorsqu'ils commencent à être transcrits en se liant à la tige-boucle TAR (voir section 1.2.1.1). Pour ce faire, Tat est acétylée sur certains résidus lysine par p300/CBP et une protéine associée à ce dernier, PCAF. Ces acétylations facilitent le recrutement de la cycline T1 et de CDK9, les deux protéines nécessaires à la liaison de Tat à TAR. Tat entraîne alors l'hyperphosphorylation du domaine C-terminal de PolIII, ce qui améliore grandement la processivité de PolIII. Tat interagit aussi avec plusieurs

facteurs généraux de la transcription formant le complexe de pré-initiation (revue par Brady and Kashanchi 2005; Gatignol 2007).

Tat est une protéine polyvalente qui peut agir à différents niveaux du cycle de réplication virale et qui peut influencer de nombreux processus cellulaires (Van Duyne et al. 2009). Pour ce faire, Tat interagit avec plusieurs protéines différentes. Ces interactions dépendent de la conformation de Tat qui s'adapte à ses différents partenaires (Debaisieux et al. 2011). Par exemple, elle peut agir au niveau de l'expression de nombreux gènes cellulaires, en interagissant avec les facteurs qui favorisent leur transcription, elle participe à l'étape de transcription inverse en aidant le positionnement de l'amorce sur l'ARNg, elle module l'expression de gènes produisant des cytokines inflammatoires et elle régule l'apoptose (revue par Pugliese et al. 2005; Meredith et al. 2009; Romani et al. 2009; Johri et al. 2011).

Comme mentionnée à la section 1.2.1.1, la tige-boucle TAR située à l'extrémité 5' d'un ARNm inhibe l'initiation de la traduction de cet ARNm. Certaines études ont montré que Tat peut contrer cet effet de TAR sur la traduction dans les cellules en culture, dans les lysats de réticulocyte de lapin (RRL) ainsi que dans les oocytes de *Xenopus* (Cullen 1986; SenGupta et al. 1990; Braddock et al. 1993). Cependant, cet effet n'a pas été reproduit dans ces différents systèmes par d'autres chercheurs (Parkin et al. 1988; Chin et al. 1991; Svitkin et al. 1994), laissant ainsi une controverse quant à l'influence de Tat sur la traduction des ARNm viraux. Tat augmente l'expression de plusieurs hélicases de l'ARN comme DDX3, dont la présence entraînerait une augmentation de l'expression des ARNm viraux (Krishnan and Zeichner 2004; Yedavalli et al. 2004), et probablement RHA avec lequel Tat interagit directement (Van Duyne et al. 2009). Ces hélicases permettraient de contrer l'effet de TAR sur la traduction. Par ailleurs, Tat stimule la production globale de protéines, indépendamment de la présence de TAR, en inhibant l'activité de la kinase PKR, ce qui entraîne une augmentation du taux d'initiation de la traduction (voir section 1.4.5.1). Tat contrecarre l'effet de PKR soit en se liant directement à cette kinase, soit en lui servant de substrat, compétitionnant alors avec eIF2 (revue par Clerzius et al. 2011).

Figure 1-5 : Représentation des trois isoformes de la protéine Tat. Les différentes régions de Tat sont indiquées.



1.3.4.2 Rev

Dans la phase précoce du cycle de réplication virale, la deuxième protéine régulatrice, Rev, inhibe l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte (revue par Grewe and Uberla 2010). Cette fonction de Rev permet d'éviter une surinfection, ce qui assure la viabilité de la cellule infectée. Dans la phase tardive du cycle de réplication virale, Rev joue un rôle important dans le transport des ARN viraux du noyau vers le cytoplasme, en liant le motif RRE présent sur les ARN viraux mono-épissés et non épissés. Rev doit également lier la protéine d'export nucléaire CRM-1, aussi appelé exportine 1, et l'hélicase DDX3 pour voyager vers le cytoplasme (Yedavalli et al. 2004). Par la suite, afin de retourner au noyau, Rev lie l'importine- β (revue par Karn and Stoltzfus 2012). En absence de Rev, les ARNm viraux sont toujours complètement épissés avant d'être amenés au cytoplasme pour être traduits. Rev et DDX3 semblent également favoriser l'initiation de la traduction des ARNm viraux, autant pour le mode coiffe-dépendant que pour le mode IRES-dépendant (Liu et al. 2011). Par ailleurs, Rev joue un rôle au niveau de l'encapsidation des ARNm viraux en liant rapidement les ARN suite à leur transcription (revue par Grewe and Uberla 2010).

1.3.5 Protéines accessoires

Le génome du VIH-1 code aussi pour quatre protéines accessoires qui jouent un rôle important dans le cycle de réplication du virus, bien qu'*in vitro*, le virus puisse se répliquer en leur absence.

La protéine Nef (*Negative Factor*) facilite l'internalisation et, par conséquent, la dégradation des récepteurs CD4, prévenant ainsi les interactions inappropriées avec les protéines de l'enveloppe et une interférence avec le processus de bourgeonnement (Frankel and Young 1998). Elle entraîne aussi une diminution de la présence des corécepteurs CCR5 et CXCR4 à la membrane de la cellule infectée (revue par Laguette et al. 2010). Par ailleurs, la liaison directe de Nef à p53 inhibe l'effet de cette protéine dans l'activation de l'apoptose cellulaire (Greenway et al. 2002).

La protéine Vif (*viral infectivity factor*) est encapsidée dans les virions et affecte l'infectivité des virions matures. Elle est produite tard dans le cycle de réplication virale. Vif empêche l'encapsidation d'un facteur cellulaire, APOBEC-3G, dans les particules virales à la fois en bloquant la traduction et en facilitant la dégradation de l'ARNm codant pour APOBEC-3G. En absence de Vif, le facteur APOBEC-3G est encapsidé dans les virions et il cause une hypermutation du génome viral, en entraînant une conversion des C en U, lors de la transcription inverse (Coiras et al. 2010; Reitz and Gallo 2010; Wang et al. 2011). Par ailleurs, Vif aide à la réplication du VIH-1 en arrêtant le cycle de la cellule hôte en G2. Pour ce faire, Vif lie l'ubiquitine ligase cellulaire MDM2, stabilisant ainsi p53, ce qui induit alors l'arrêt du cycle cellulaire en G2 (Izumi et al. 2010). Cela est profitable pour la réplication virale, car c'est la phase du cycle cellulaire où le promoteur (LTR), exprimant les ARN du VIH-1, est le plus actif (Goh et al. 1998). De plus, Vif force la cellule hôte à quitter la phase G1 de son cycle cellulaire et à entrer dans la phase S en interagissant avec deux autres protéines cellulaires (Brd4 (*bromodomain protein*; protéine avec un bromodomaine capable de lier la chromatine) et CDK9). Ces deux protéines cellulaires sont en effet requises pour la progression normale du cycle cellulaire (Wang et al. 2011).

La protéine Vpr (*viral protein R*) est incorporée dans les virions à l'aide de p6. La présence de Vpr est importante pour l'étape de transcription inverse du cycle de réplication du VIH-1, puisqu'en son absence, la RT fait environ quatre fois plus d'erreurs. Cet effet est dû à son interaction avec une enzyme cellulaire de réparation de l'ADN, UNG2. Vpr entraîne l'incorporation de UNG2 dans les particules virales, ce qui assure sa présence lors de l'étape de la transcription inverse. Suite à cette étape, Vpr aide au transport du PIC vers le noyau de la cellule grâce à son signal de localisation nucléaire. Cet effet est particulièrement important pour les cellules non divisibles, car Vpr dirige le transport du PIC au noyau même lorsque l'enveloppe nucléaire est intacte (revue par Le Rouzic and Benichou 2005). Par ailleurs, Vpr induit un arrêt du cycle cellulaire en G2/M indépendamment de p53 (contrairement à Vif) en affectant différentes protéines impliquées dans la transition du cycle cellulaire vers G2/M. Ici encore, cet arrêt du cycle cellulaire est profitable à la réplication virale par l'activation du promoteur LTR exprimant les ARN du VIH-1 (Goh et al. 1998).

La protéine Vpu (*viral protein U*) est produite à partir du même ARNm qu'Env (voir section 1.3.3). Vpu est utilisée par le virus pour contrer l'effet de la tétherine, une protéine cellulaire ayant des propriétés antivirales. En absence de Vpu, la tétherine cause la rétention des particules virales à la surface des cellules (Neil et al. 2008). De plus, Vpu aide, avec Nef, à l'internalisation des récepteurs CD4 et elle entraîne également les récepteurs CD4 nouvellement produits vers la dégradation (revue par Laguette et al. 2010; Reitz and Gallo 2010).

1.4 Synthèse protéique

La synthèse protéique ou traduction est un processus complexe et régulé qui permet de décoder l'information génétique apportée par les ARNm afin de produire les protéines. La traduction est effectuée par les ribosomes qui décodent l'ARNm, à l'aide des ARNt chargés d'acides aminés, en progressant le long de cet ARNm par pas de trois bases, c'est-à-dire un codon. La traduction s'effectue en quatre étapes : l'initiation, l'élongation, la terminaison et le recyclage des ribosomes.

Les ribosomes sont essentiels à la traduction des ARNm, car ils contrôlent deux réactions principales : la sélection de l'aa-ARNt et la formation du lien peptidique. Le ribosome est composé de deux sous-unités : la petite sous-unité (40S chez les eucaryotes et 30S chez les procaryotes) et la grande sous-unité (60S chez les eucaryotes et 50S chez les procaryotes). Chaque sous-unité est composée d'ARN ribosomique (ARNr) et de plusieurs protéines ribosomiques différentes. De plus, il est important que les ribosomes traduisent avec précision les ARNm afin d'obtenir des protéines fonctionnelles. Les ribosomes sont généralement capables de corriger une situation où un ARNt erroné est lié au codon à traduire. Un système de correction permet au ribosome de déterminer s'il y a eu une erreur dans la sélection de l'ARNt qui entraînerait la formation d'un lien peptidique avec un acide aminé incorrect. Ce système de correction entraîne le rejet de l'ARNt incorrect. L'insertion d'un acide aminé incorrect par les ribosomes se produit environ à tous les 10^4 codons chez les procaryotes, alors que le système de correction des eucaryotes est plus efficace puisque l'insertion d'un acide aminé incorrect se produit seulement à environ tous les 10^5 codons

chez les levures. La précision de la traduction peut aussi être affectée par des ARNt qui ne sont pas chargés avec le bon acide aminé, ce qui se produit environ à tous les 10^4 codons chez les procaryotes (Ibba and Soll 2000; revue par Wohlgemuth et al. 2011). Il faut prendre en considération le fait que des substitutions d'acides aminés ne sont pas nécessairement nocives. Un autre aspect important de la traduction des ARNm, qui est aussi contrôlé par le ribosome, est la conservation du cadre de lecture. En effet, une erreur entraînant un changement de cadre de lecture (déphasage) entraîne la production d'une protéine entièrement différente de la protéine normalement codée. La production d'une protéine contenant une mutation nocive ou ayant subi un déphasage spontané lors de sa traduction est une dépense énergétique inutile pour la cellule. Cela peut également mener à une diminution de la production de protéines actives ou augmenter la quantité de protéines mal repliées. De plus, ces protéines erronées pourraient être toxiques pour la cellule. Les événements de déphasage spontané se produisent environ à tous les 3×10^5 codons lus, d'après des mesures chez les bactéries (Jorgensen and Kurland 1990; revue par Nierhaus 2006; Wohlgemuth et al. 2011). À notre connaissance, il n'y a pas de données correspondantes chez les eucaryotes.

Dans cette section, nous aborderons d'abord les différentes étapes de la traduction (l'initiation, l'élongation, la terminaison puis le recyclage des ribosomes). L'étape d'initiation étant l'étape limitante de la traduction, nous lui consacrerons une section plus importante après avoir décrit les autres étapes. Nous survolerons aussi la structure et le fonctionnement des ribosomes.

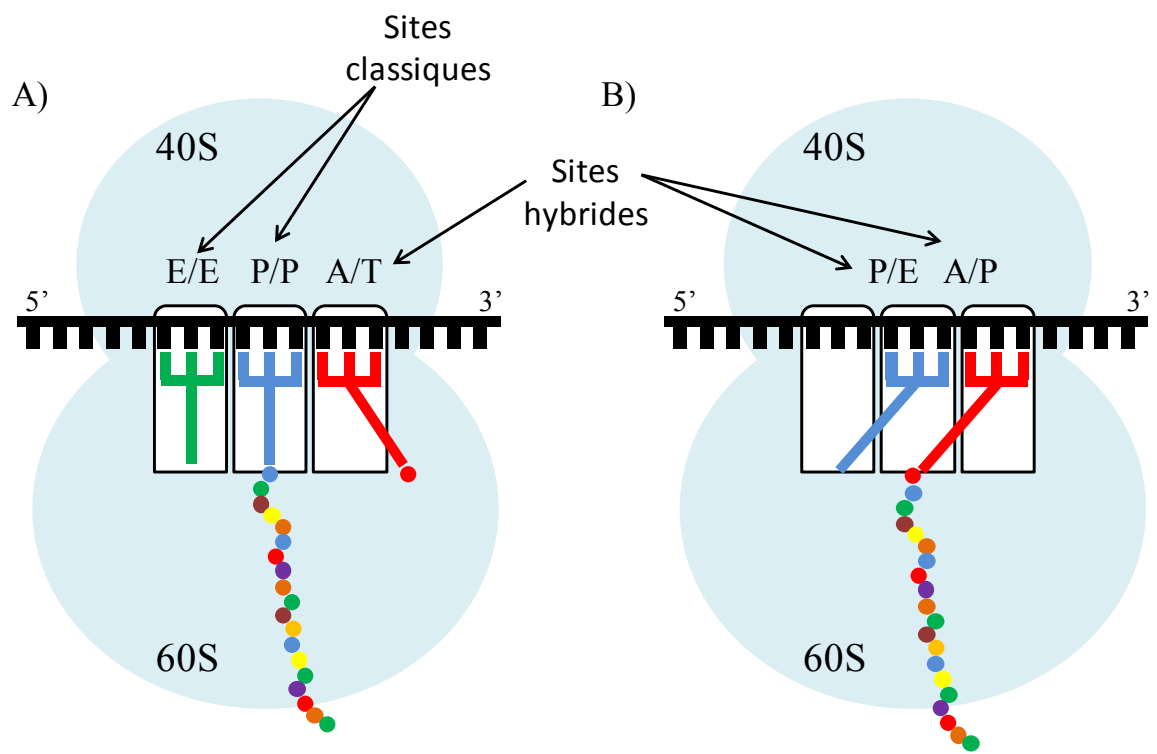
1.4.1 Élongation de la traduction

Chez les procaryotes et les eucaryotes, le processus d'élongation de la traduction se produit en trois étapes, soit la sélection d'un ARNt possédant un anticodon complémentaire au codon à décoder sur l'ARNm, la formation du lien peptidique et, finalement, la translocation des ARNt. Le processus d'élongation de la traduction est aidé par des facteurs d'élongation (EF) (pour une revue générale, voir Steitz 2008).

Les ARNt portent, sur leur tige acceptrice, les acides aminés qui sont successivement attachés par un lien peptidique à la chaîne protéique en croissance afin d'obtenir une protéine. Les ARNt se lient successivement dans trois principaux sites classiques du ribosome, qui se localisent dans les deux sous-unités (Figure 1-6). Le premier site est le site A (aminoacyl), nommé ainsi parce qu'un ARNt chargé d'un acide aminé (aa-ARNt) s'y lie. Cet acide aminé sera incorporé dans la protéine en construction. Le second site est le site P (peptidyle) qui correspond au site où se place l'ARNt chargé de la chaîne protéique en croissance (peptidyl-ARNt). Le troisième site est le site E (sortie ou *exit*) qui contient l'ARNt déchargé (deac-ARNt), ne liant plus de chaîne protéique et qui sera alors relâchée du ribosome. La grande sous-unité du ribosome contient également un site supplémentaire, le site T qui est utilisé lors de la sélection de l'aa-ARNt.

L'élongation d'une protéine se fait par l'ajout d'un acide aminé à la fois en commençant par l'extrémité N-terminale (voir Figure 1-7). Ce processus d'élongation débute par le positionnement d'un aa-ARNt au site hybride d'entrée A/T, recouvrant ainsi une partie du site A. (La nomenclature suivante est utilisée : le site occupé par l'ARNt sur la petite sous-unité est inscrit suivi de celui occupé sur la grande sous-unité. Par exemple, le site A/P indique que l'ARNt occupe le site A sur la petite sous-unité du ribosome et le site P sur la grande sous-unité du ribosome (Figure 1-6) (revue par Shoji et al. 2009).) Lorsque la complémentarité de l'anticodon de l'aa-ARNt au codon de l'ARNm est vérifiée par le ribosome (voir section 1.4.4), la guanosine triphosphate (GTP) lié au facteur d'élongation (eEF1A chez les eucaryotes et EF-Tu chez les procaryotes) est alors hydrolysée suite à la stimulation du centre d'activation des GTPase du ribosome. Cette hydrolyse permet le positionnement de l'aa-ARNt au site A et entraîne un changement de conformation du ribosome, provoquant la dissociation du facteur eEF1A ou EF-Tu du ribosome. L'aa-ARNt est alors positionné de façon à ce que la partie contenant l'acide aminé se trouve près du centre d'activité peptidyl-transférase, entraînant la formation rapide du lien peptidique entre l'acide aminé porté par l'ARNt au site A et la chaîne peptidique en croissance portée par un ARNt au site P. La formation du lien peptidique est catalysée par le ribosome (Leung et al. 2011), ce qui permet de dire que le ribosome est un ribozyme. Le site P contient alors un

Figure 1-6 : Exemple de sites classiques et hybrides occupés par les ARNt dans la région de décodage des ribosomes lors de la traduction. Un site est appelé classique lorsque l'ARNt occupe le même site sur la petite et la grande sous-unité du ribosome. Un site est appelé hybride lorsque le site occupé par l'ARNt sur la petite sous-unité est différent de celui occupé par cet ARNt sur la grande sous-unité. Pour les sites hybrides, le site occupé sur la petite sous-unité est inscrit en premier suivi de celui occupé sur la grande sous-unité. A) Le deac-ARNt occupe le site classique E/E (site E). Le peptidyl-ARNt occupe le site classique P/P (site P) alors que l'aa-ARNt occupe le site hybride A/T. Il y a par la suite accommodation de l'aa-ARNt dans le site classique A/A (site A). B) Suite à la formation du lien peptidique, il y a un déplacement des ARNt dans des sites hybrides avant l'occupation des sites classiques E et P. En effet, le peptidyl-ARNt se retrouve dans un site hybride A/P alors que le deac-ARNt occupe un site hybride P/E.

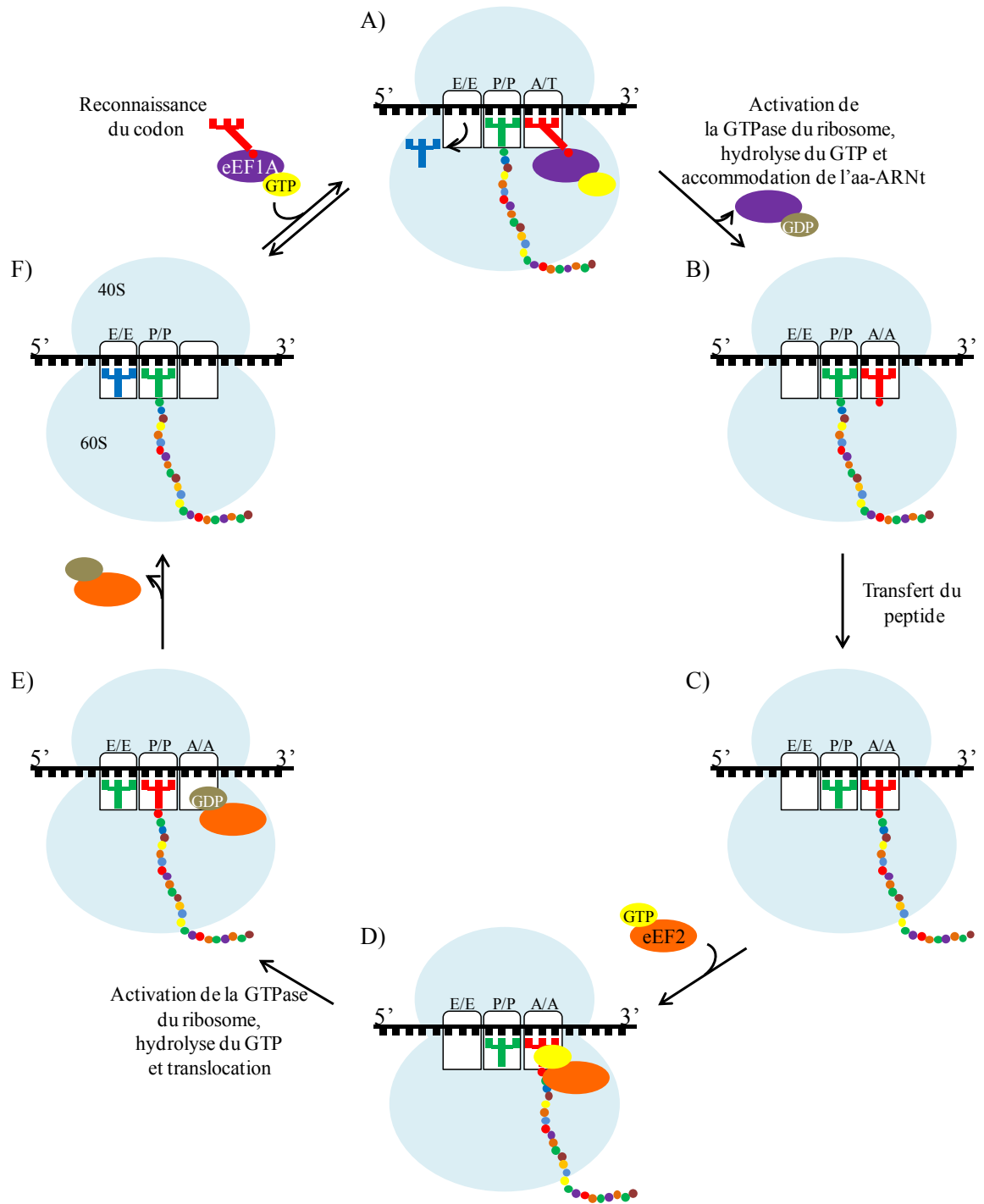


deac-ARNt et le site A contient un peptidyl-ARNt. L'hydrolyse d'un second GTP par eEF-2 (chez les eucaryotes) ou EF-G (chez les procaryotes) stimule ensuite la translocation (revue par Noble and Song 2008; Shoji et al. 2009). La translocation des ARNt se produit en deux sous-étapes. Premièrement, après la formation du lien peptidique, les tiges acceptrices du deac-ARNt et du peptidyl-ARNt se déplacent spontanément au niveau de la grande sous-unité du ribosome. Les ARNt occupent alors un site hybride, P/E et A/P, respectivement. Ensuite, le reste des ARNt, entraînant l'ARNm, se déplace relativement à la petite sous-unité du ribosome, et ce, avec l'aide du facteur d'élongation eEF-2 (ou EF-G). La translocation des ARNm se fait tout en conservant les interactions codons-anticodons et les ARNt occupent alors les sites E et P (voir section 1.4.4). Le mécanisme d'hydrolyse du GTP entraînant cette chaîne de réactions est encore obscur. L'élongation de la chaîne peptidique se poursuit jusqu'à ce qu'un codon d'arrêt entre dans le site A déclenchant alors l'étape de terminaison de la traduction.

Une controverse existe quant à savoir à quel moment l'ARNt au site E est relâché. Uemura et al. (2010) ont utilisé une méthode ZMWs (*zero-mode waveguides*), qui analyse la fluorescence de molécules individuelles. Ils ont ainsi déterminé que la relâche de l'ARNt au site E n'est pas liée à l'accommodation de l'aa-ARNt au site A. Selon eux, l'ARNt au site E est rapidement relâché suite à son déplacement du site P au site E. Récemment, Chen et al. (2011) ont observé utilisant une méthode smFRET (*single molecule fluorescence resonance energy transfer*) que l'ARNt au site E est relâché suite à un changement allostérique du ribosome occasionné par la liaison d'un aa-ARNt au site A pour les cycles d'élongation du début de la traduction, mais non pour les cycles se produisant plus tard dans la traduction, où l'ARNt au site E est relâché avant la venue de l'aa-ARNt au site A. Il n'est actuellement pas possible de trancher sur cette question.

Une seconde controverse en lien avec le site E du ribosome concerne le maintien des interactions codons-anticodons entre l'ARNm et l'ARNt au site E. Une première étude par Yusupov et al. (2001) suggérait que la conformation de l'ARNm au site E ne permet pas l'appariement avec l'ARNt. Par contre, des études subséquentes proposent maintenant

Figure 1-7 : Représentation schématique des étapes de l'élongation de la traduction, chez les eucaryotes. A) Lors de l'élongation de la traduction, un aa-ARNt complexé au facteur eEF1 et au GTP occupe d'abord le site d'entrée A/T du ribosome. B) Suite à l'activation de la GTPase du ribosome, il y a hydrolyse du GTP et accommodation de l'ARNt au site A. C) Par la suite, il y a transfert du peptide de l'ARNt au site P vers l'aa-ARNt au site A, avec formation d'un nouveau lien peptidique D) Liaison du facteur eEF2 lié à du GTP. E) L'hydrolyse de ce deuxième GTP entraîne la translocation du deac-ARNt, du peptidyl-ARNt et du ribosome. F) Le ribosome est alors prêt pour un nouveau cycle d'élongation (adapté de Steitz 2008).



la possibilité d'interactions codons-anticodons au site E du ribosome (Jenner et al. 2010). Nierhaus (2006) avait suggéré que la formation d'interactions codons-anticodons au site E favorise le maintien du cadre de lecture par le ribosome.

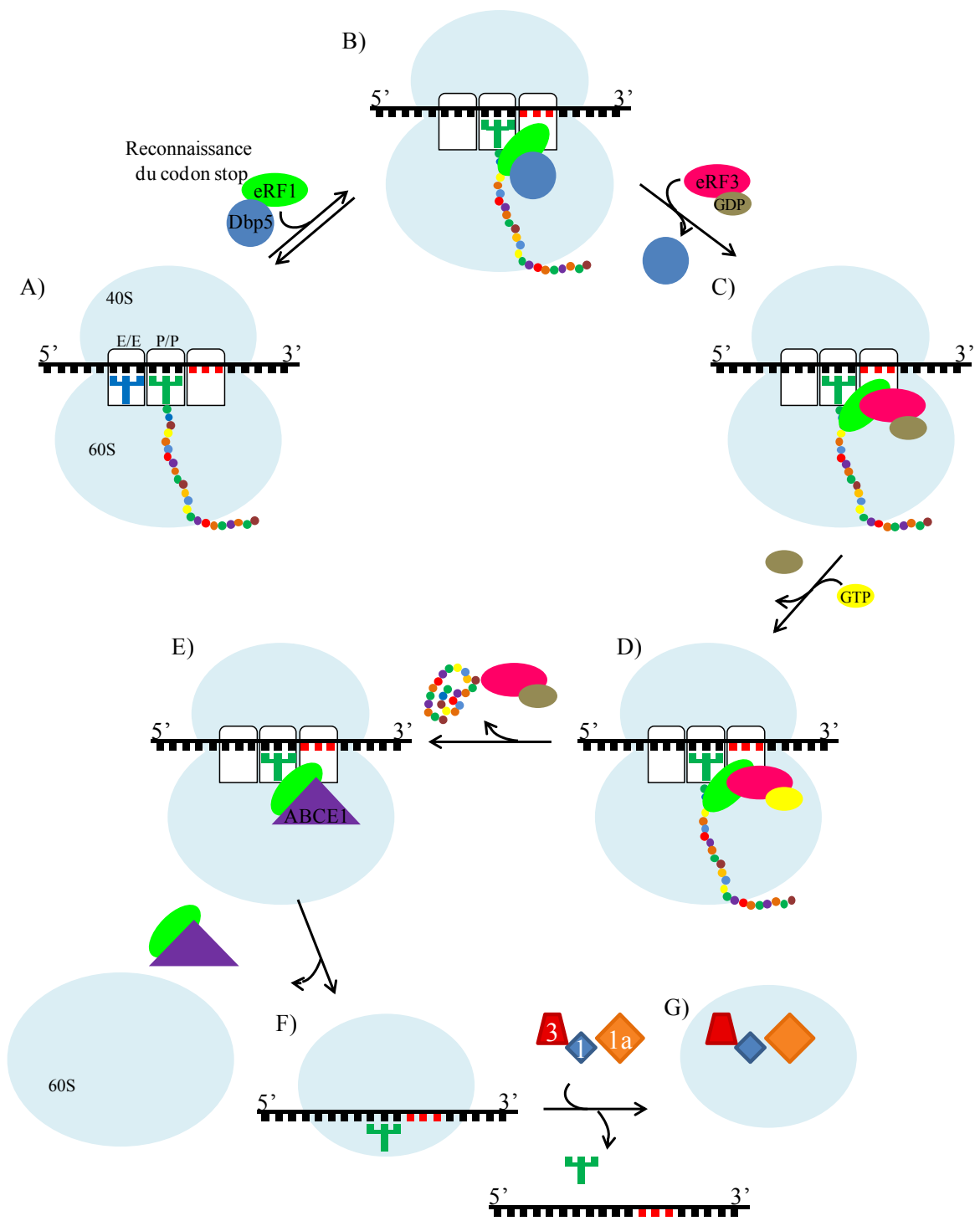
1.4.2 Terminaison de la traduction

Le ribosome entre dans un complexe de préterminaison lorsqu'un codon d'arrêt se retrouve dans son site A (Figure 1-8). Les codons d'arrêt ne sont pas lus par des ARNt, mais par des facteurs de terminaison (RF; *release factor*). Chez les procaryotes, RF1 reconnaît les codons UAG et UAA alors que RF2 reconnaît les codons UAA et UGA. Chez les eucaryotes, les trois codons d'arrêt sont reconnus par le facteur de terminaison eRF1. Ces facteurs adoptent une conformation qui ressemble à celle d'un ARNt. La liaison de ces facteurs de terminaison à un codon d'arrêt au site A du ribosome stimule l'hydrolyse, par le centre peptidyl-transférase de la grande sous-unité du ribosome, du lien reliant la protéine complétée à l'ARNt situé au site P. Cela permet la dissociation de la protéine complétée du ribosome. Chez les procaryotes, la présence d'un troisième facteur de terminaison, RF3, ayant une activité GTPase, aide à la relâche de RF1 et RF2 du ribosome (Alkalaeva et al. 2006; Ehrenberg et al. 2007; revue par Noble and Song 2008; et Steitz 2008). Chez les eucaryotes, eRF1 lie Dbp5 (*DEAD-box protein 5*) dont l'activité hélicase aiderait au positionnement efficace d'eRF1. Le deuxième facteur de terminaison, eRF3, a aussi une activité GTPase et il forme un complexe stable avec eRF1 et du GTP. Suite à l'hydrolyse du GTP par eRF3, eRF1 catalyse la relâche de la protéine complète. Le GDP, eRF3 et Dbp5 quittent alors le ribosome (revue par Noble and Song 2008; Baierlein and Krebber 2010; Korostelev 2011; Jackson et al. 2012)

1.4.3 Recyclage des ribosomes et réinitiation

À la suite de la terminaison de la traduction, le ribosome est bloqué sur l'ARNm avec un deac-ARNt à son site P. Chez les procaryotes, le facteur de recyclage du ribosome (RRF) se lie au ribosome suivi du facteur EF-G•GTP. L'hydrolyse de ce GTP permet la dissociation de l'ARNt et des sous-unités du ribosome de l'ARNm (Hirokawa et al. 2005; Yokoyama et al. 2012). Chez les eucaryotes, eRF1 est encore lié au ribosome (Figure 1-8).

Figure 1-8 : Représentation schématique de l'étape de terminaison de la traduction et de recyclage du ribosome chez les eucaryotes. A) Un codon de terminaison entre au site A du ribosome. B) Il est reconnu par le facteur eRF1 aidé de l'hélicase Dbp5. L'activité ATPase de ce facteur aide au positionnement d'eRF1. C) Il y a alors dissociation de Dbp5 et entrée du facteur eRF3 lié à du GDP. D) Ce GDP est ensuite échangé pour du GTP. E) L'hydrolyse de ce GTP par eRF3 induit la relâche du peptide par le facteur eRF1. eRF3•GDP est également relâché. F) On ignore quand le facteur ABCE1 se lie au ribosome, mais on sait qu'il aide à la relâche d'eRF1 suite à la relâche de la chaîne peptidique et à la dissociation de la sous-unité 60S du ribosome. G) La liaison subséquente d'eIF3, eIF1 et eIF1A à la 40S permet la relâche de l'ARNm et du deac-ARNt (adaptée de Jackson et al. 2012).



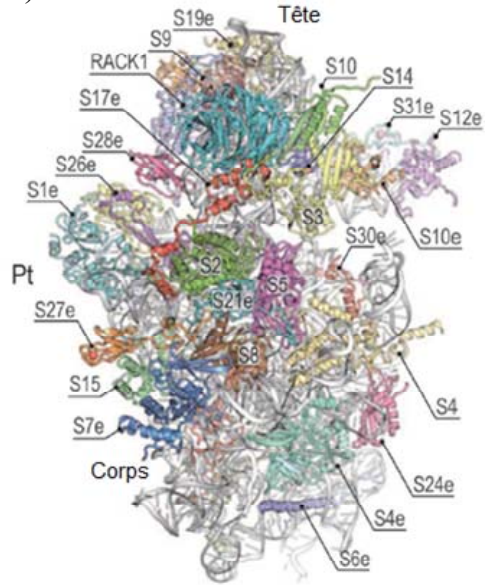
Le recyclage est aidé par le facteur ABCE1 (*ATP-binding cassette E1*) qui se lie à eRF1 pour dissocier ce dernier et la 60S. La liaison subséquente d'eIF3, eIF1 et eIF1A à la 40S permet la relâche de l'ARNm et du deac-ARNt. La terminaison est reliée à un nouveau cycle d'initiation grâce à la circularisation de l'ARNm via la queue de poly(A) et la coiffe. Cette circularisation permet le recyclage des ribosomes à l'extrémité 5' de l'ARNm qu'ils viennent de terminer de traduire (revue par Pestova et al. 2007; Baierlein and Krebber 2010; Jackson et al. 2012).

1.4.4 Les ribosomes

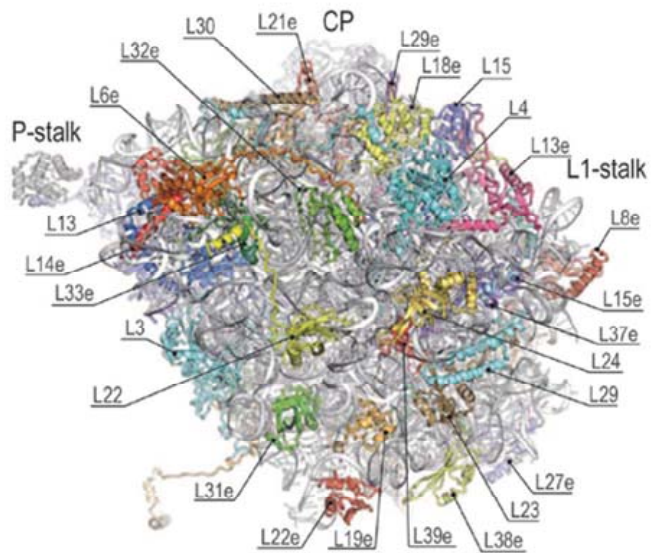
Grâce au développement des techniques de cristallisation, des images à une résolution atomique du ribosome bactérien et, plus récemment, du ribosome eucaryote sont disponibles (Figure 1-9). La structure des sous-unités du ribosome, en présence et en absence de différents facteurs de traduction, ainsi que le positionnement des différentes protéines ribosomiques, a été analysée par différentes techniques (revue par Petrov et al. 2011). Le groupe de Beckman (Armache et al. 2010) a déterminé la position de la majorité des protéines ribosomiques eucaryotes par cryo-EM avec une résolution de 5,5 Å. Les images obtenues par cryo-EM ont également permis de déterminer l'effet de l'hydrolyse de GTP sur la conformation du ribosome (Taylor et al. 2007). Les techniques de cryo-EM et de smFRET ont permis de démontrer le mouvement de cliquet (*ratchet*) entre les sous-unités du ribosome ainsi que le lien qu'il y a entre ce mouvement et la formation d'états hybrides occupés par les ARNt durant l'étape de translocation (Fischer et al. 2010; Budkevich et al. 2011). D'autre part, des études cinétiques sophistiquées ont permis de déterminer la vitesse des différentes sous-étapes de l'élongation de la traduction (Gromadski and Rodnina 2004; Wohlgemuth et al. 2011). Bien que le ribosome eucaryote soit plus grand et plus complexe que le ribosome procaryote, la conservation et la forte similarité entre les deux types de ribosomes permettent d'extrapoler au ribosome eucaryote la plupart des connaissances disponibles pour le ribosome bactérien.

Figure 1-9 : A et B) Structure du ribosome 80S de *Saccharomyces cerevisiae* vue du côté du solvant. Elle a été obtenue par cristallisation, à une résolution de 3,0 Å, par le groupe de Yusupov (Figure adaptée de Ben-Shem et al. 2011). A) La petite sous-unité (40S) du ribosome est composée de l'ARNr 18S et de 32 protéines ribosomiques. La protéine d'échafaudage RACK1 (récepteur pour la kinase C activée), qui est associée au ribosome et peut être considérée comme une protéine ribosomique, est indiquée. Les éléments identifiés pour la 40S sont la tête, la plateforme (Pt) et le corps. B) La grande sous-unité (60S) est composée des ARNr 25S, 5.8S et 5S ainsi que de 46 protéines ribosomiques. Les éléments identifiés pour la 60S sont la protubérance L1 (L1), la protubérance centrale (CP) et la protubérance nommée tige (*P Stalk*). C et D) Structure cristallographique du ribosome (70S) de la bactérie *Thermus thermophilus* résolue à 5,5 Å vue du côté du solvant (adapté de Yusupov et al. 2001). C) La petite sous-unité (30S) du ribosome est composée de l'ARNr 16S et 20 protéines ribosomiques. D) La grande sous-unité (50S) du ribosome est composée de l'ARNr 23S et 5S ainsi que de 30 protéines ribosomiques.

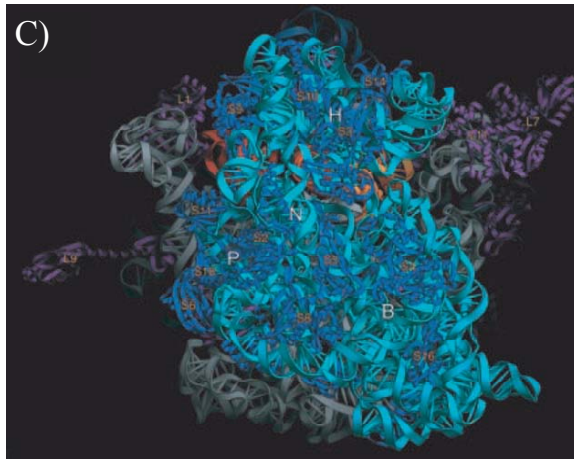
A)



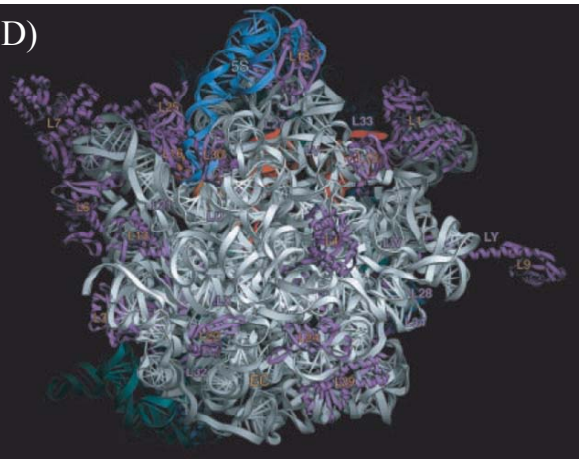
B)



C)



D)



Puisque les fonctions principales sont assurées par l'ARNr, le ribosome, nous l'avons dit plus haut, est un ribozyme (Steitz and Moore 2003). L'ARNr se retrouve principalement à l'interface entre les deux sous-unités alors que les protéines ribosomiques se retrouvent surtout en périphérie du ribosome. Le premier ribosome aurait été formé uniquement d'ARN par duplication d'un court segment auxquels se seraient ajoutés progressivement d'autres fragments au cours de l'évolution (Bokov and Steinberg 2009). Les protéines seraient apparues par la suite. Chaque sous-unité accomplit une fonction spécifique. La petite sous-unité sélectionne les aa-ARNt en déterminant si l'interaction codon-anticodon est correcte. La grande sous-unité contient le centre peptidyl-transférase qui catalyse la formation des liens peptidiques entre l'acide aminé attaché à l'ARNt au site A et le peptide contenu sur l'ARNt au site P. Elle contient également le centre d'activation des GTPases, à la région P-stalk, qui stimule l'activité des GTPases permettant ainsi la sélection des ARNt au site A ou la translocation des ARNt et ARNm par rapport au ribosome (Steitz and Moore 2003; Steitz 2008; Leung et al. 2011).

Comme mentionné à la section 1.4.1, le ribosome possède trois sites où les ARNt se lient lors de l'élongation de la traduction. Les sites sont localisés à la fois sur la petite et sur la grande sous-unité du ribosome. Le site A est occupé par un codon de l'ARNm en cours de traduction et c'est ce site qui choisit l'aa-ARNt complémentaire. Les aa-ARNt en complexe avec le premier facteur d'élongation (eEF1A chez les eucaryotes et EF-Tu chez les procaryotes) et du GTP se lient d'abord au site d'entrée A/T. Si l'anticodon de l'aa-ARNt n'est pas complémentaire au codon au site A, il est rejeté. Si, par contre, l'anticodon de l'aa-ARNt est complémentaire, il est accommodé au site A, ce qui s'accompagne de l'hydrolyse du GTP du complexe. Il y a alors relâche du facteur d'élongation lié au GDP. Ce GDP est alors remplacé par du GTP grâce au facteur d'échange eEF1Ba chez les eucaryotes (EF-Ts chez les procaryotes). Le ribosome est responsable de la précision de la traduction, car il vérifie la complémentarité des anticodons des aa-ARNt et des codons de l'ARNm. Les deux premières paires de bases entre un codon de l'ARNm et un anticodon de l'aa-ARNt doivent obéir rigoureusement aux règles d'appariement de type Watson-Crick. Le contrôle se fait grâce à l'ARNr de la petite sous-unité du ribosome qui sonde les deux premières paires de bases formées entre les

codons et les anticodons. Un réseau de ponts hydrogènes avec cet ARNr stabilise les deux premières paires de bases à condition qu'il s'agisse d'interactions de type Watson-Crick. La troisième paire est peu stabilisée par des ponts hydrogènes, ce qui lui donne plus de flexibilité et de permissivité (Ogle and Ramakrishnan 2005). L'accommodation de l'aa-ARNt au site A entraîne un changement de conformation du centre peptidyl-transférase localisé dans la grande sous-unité du ribosome, ce qui stimule la formation du lien peptidique, c'est-à-dire le transfert de la chaîne peptidique du peptidyl-ARNt à l'aa-ARNt situé au site A.

La translocation est guidée par un mouvement de cliquet (*ratchet*) dû à un déplacement relatif des sous-unités du ribosome (Ermolenko and Noller 2011). La liaison d'un facteur d'élongation (eEF-2 chez les eucaryotes et EF-G chez les procaryotes) lié à du GTP et l'hydrolyse de ce GTP induit un mouvement de rotation antihoraire de la petite sous-unité du ribosome par rapport à la grande sous-unité. Ce mouvement déplace les ARNt situés dans les sites A et P, respectivement, dans les sites hybrides A/P et P/E. Ce mouvement est effectué rapidement et il ne déplace pas l'ARNm. La petite sous-unité du ribosome reprend alors plus lentement sa position initiale provoquant alors la translocation de l'ARNm et des ARNt qui passent alors des sites A/P et P/E aux sites P et E, respectivement. Le site A, maintenant libre d'ARNt, contient le prochain codon à être décodé. Le ribosome est prêt pour un nouveau cycle d'élongation (revue par Ramakrishnan 2009).

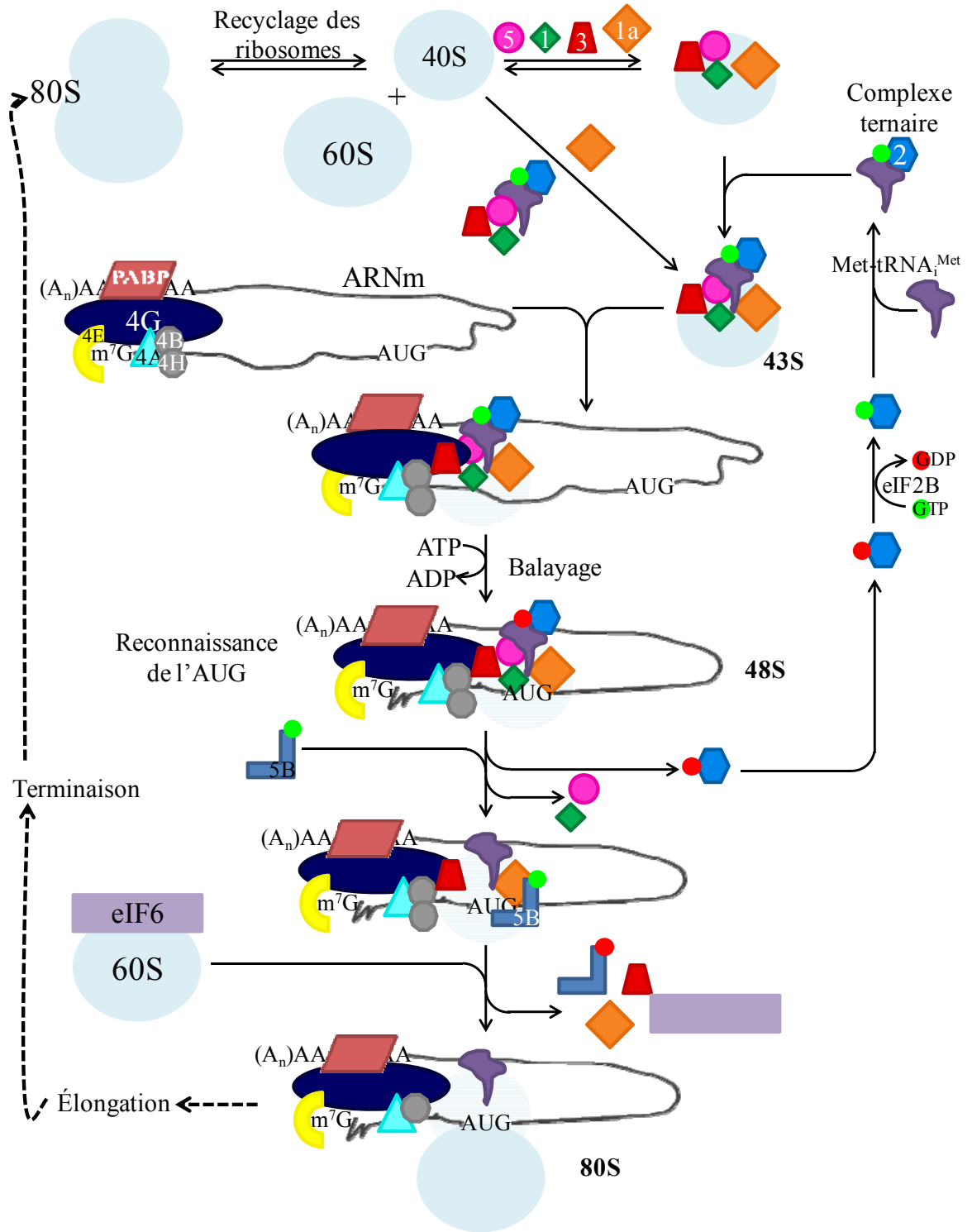
L'ARNm pénètre dans le ribosome par un tunnel d'entrée ayant une longueur équivalente à 12 nt menant aux trois sites du ribosome. Après avoir passé par les trois sites, l'ARNm sort du ribosome en passant par le tunnel de sortie qui a aussi une longueur équivalente à 12 nt. Lors du mouvement de cliquet de la petite sous-unité du ribosome, le cadre de lecture est conservé. Ceci est dû à la fois aux interactions codons-anticodons et à un réseau d'interaction avec le ribosome qui resserre le tunnel lors de ce mouvement (Jenner et al. 2010). De plus, les ARNm sont généralement très structurés. Cependant, le diamètre des tunnels par lesquels l'ARNm circule à l'intérieur du ribosome n'est pas suffisamment grand pour accommoder de l'ARN db. Les structures d'ARNm doivent donc

être défaits afin que l'ARNm soit traduit. Le ribosome utilise deux mécanismes afin de dérouler les structures d'ARNm (Qu et al. 2011). Le premier mécanisme permet aux ribosomes de favoriser l'ouverture des hélices d'ARNm en diminuant l'énergie nécessaire pour les dérouler. Le second mécanisme consiste à défaire les structures d'ARNm de façon mécanique. Sur le ribosome, au début du tunnel d'entrée, se trouvent un certain nombre de protéines, dont S3, S4 et S5 chez les procaryotes (correspondant, respectivement, à eS3, eS9 et eS2 chez les eucaryotes). Ces protéines sont impliquées dans cette activité hélicase du ribosome. S'il y a une hélice d'ARNm à l'entrée du tunnel, les brins opposés de cette hélice sont respectivement liés à la protéine S3 dans la tête et à la protéine S4 dans le corps de la petite sous-unité. Le mouvement de rotation (mouvement de cliquet) de la tête de la petite sous-unité par rapport au corps, lors de la translocation, en éloignant S3 de S4 entraînerait le déroulement de l'hélice (voir aussi Takyar et al. 2005) et l'ARNm pourrait alors pénétrer dans le tunnel.

1.4.5 Initiation de la traduction coiffe-dépendante eucaryote

Alors que les étapes d'élongation et de terminaison de la traduction sont très semblables chez les procaryotes et les eucaryotes, l'étape d'initiation est très différente. L'initiation de la traduction chez les procaryotes est dépendante de la séquence Shine-Dalgarno, une séquence riche en purines sur l'ARNm qui précède les codons d'initiation (AUG). L'ARN 16S de la petite sous-unité du ribosome contient une séquence complémentaire dite anti-Shine-Dalgarno, permettant la reconnaissance de cette séquence par cette sous-unité. Aussi, alors que les eucaryotes utilisent un grand nombre de facteurs d'initiation de la traduction, les procaryotes utilisent seulement trois facteurs d'initiation (IF) afin d'initier la traduction de leurs ARNm (revue par Malys and McCarthy 2011). La sous-unité 30S s'associe au facteur IF3, puis dans un ordre aléatoire au facteur IF1, à l'ARNm et à un complexe ternaire, qui est composé du facteur IF2, de l'ARNt initiateur chargé de N-formylméthionine (fMet) et de GTP. Ensuite, il y a association de la 50S avec la 30S. Il y a alors éjection des facteurs et hydrolyse du GTP. Le ribosome 70S est prêt à commencer l'élongation. Puisque cette thèse porte sur les eucaryotes, l'initiation de la traduction chez les eucaryotes est décrite plus en détail ci-dessous.

Figure 1-10: Représentation de l'initiation de la traduction coiffe-dépendante chez les eucaryotes. Ce mode d'initiation requiert le recrutement de la 40S au niveau de la coiffe de l'ARNm via l'interaction de plusieurs facteurs d'initiation de la traduction (eIF). La 40S et les facteurs qui y sont liés effectuent un balayage de la 5'UTR de l'ARNm jusqu'à ce qu'ils rencontrent un codon initiateur situé dans un contexte approprié. Il y a ensuite recrutement de la 60S et formation d'un ribosome prêt à entrer dans l'étape d'élongation de la traduction (adapté de Hinnebusch 2011).



L'initiation de la traduction permet de positionner la petite sous-unité du ribosome ainsi que l'ARNt initiateur chargé de méthionine (Met-ARNt_i^{Met}) au codon d'initiation d'un ARNm (Figure 1-10). La majorité des ARNm cellulaires et certains ARNm viraux ont une étape d'initiation de la traduction qualifiée de coiffe-dépendante. Ce type d'initiation implique la liaison de la petite sous-unité du ribosome à l'extrémité 5' de l'ARNm suivi du balayage (*scanning*) de la région 5'UTR dans le but de rencontrer l'AUG initiateur. L'initiation de la traduction coiffe-dépendante dépend de la présence d'une structure dite coiffe, aussi appelée cap, à l'extrémité 5' des ARNm. La coiffe correspond à m⁷G[5']ppp[5']N, où m⁷G est une guanosine méthylée et N représente n'importe quel nucléotide. La liaison entre G et N se fait par un lien triphosphate 5'-5'. La coiffe est liée par un complexe de facteurs d'initiation, le trimère eIF4F. Les trois facteurs composant ce complexe sont eIF4E, qui lie la coiffe, eIF4A, une hélicase à ARN à boîte DEAD (Acide aspartique-Glutamate-Alanine-Acide aspartique) permettant de défaire les structures secondaires de l'ARNm, et eIF4G, qui sert de pont entre eIF4E et eIF4A. De son côté, la 40S va former le complexe 43S en liant eIF3 ainsi que le complexe ternaire à l'aide des facteurs d'initiation eIF1 et eIF1A. Le complexe ternaire est composé d'eIF2, de GTP et de l'ARNt initiateur chargé de méthionine. Par ailleurs, eIF5 est probablement recruté par la 40S à l'aide des facteurs eIF2 et eIF3. L'ordre de liaison de tous ces facteurs à la 40S n'est pas bien connu.

La 43S va se lier à l'extrémité 5' de l'ARNm via eIF3 qui interagit avec eIF4G. Elle va ensuite balayer la 5'UTR des ARNm. La présence d'eIF4A et d'adénosine triphosphate (ATP) est nécessaire afin de défaire les structures secondaires dans l'ARNm. Cette hélicase est aidée par eIF4B et eIF4H. D'autres hélicases cellulaires, comme DDX3, DHX29 et RHA, sont nécessaires à l'initiation de la traduction, plus particulièrement pour les ARNm ayant une 5'UTR structurée (Pisareva et al. 2008; Parsyan et al. 2011). Le balayage a lieu jusqu'à ce que la 43S rencontre un codon AUG initiateur dans un contexte approprié, qui correspond à la séquence GCC(A/G)CCAAUGG chez les eucaryotes supérieurs. Cette séquence, principalement le G en position 4 et le A/G en position -3 (le A du codon initiateur occupant la position 1), est optimale pour l'initiation de la traduction (revue par Pestova et al. 2007; Sonenberg and Hinnebusch 2009; Hinnebusch 2011). Chez les

eucaryotes, la traduction débute généralement au premier AUG présent sur un ARNm. La complémentarité du codon initiateur avec l'anticodon de l'ARNt initiateur est un élément essentiel de reconnaissance de ce codon initiateur. Les facteurs eIF1, eIF1a, eIF2 et eIF3 couvrent la surface de la 40S où se lie la 60S. Ils sont relâchés lorsque eIF5 induit l'hydrolyse du GTP lié à eIF2, suite à l'appariement entre le codon AUG et l'anticodon de l'ARNt chargé de méthionine qui occupe le site P de la 40S. Le facteur eIF2, lié au GDP, perd son affinité pour l'ARNt initiateur chargé de méthionine et est aussi relâché. De son côté, le facteur eIF5B se lie à la petite sous-unité. La 60S se lie ensuite à la 40S avec l'aide d'eIF5B, ce qui entraîne l'hydrolyse du GTP lié à eIF5B. Il y a relâche d'eIF5B et le ribosome 80S résultant de l'association des deux sous-unités est prêt à entrer dans la phase d'élongation de la traduction (revue par Pestova et al. 2007; Sonenberg and Hinnebusch 2009; Hinnebusch 2011). Lorsqu'elle ne fait pas partie du ribosome 80S, la sous-unité 60S est liée par le facteur eIF6. Ce facteur empêche la formation prématurée de la 80S en absence d'ARNm, car il empêche la liaison de la 40S à la 60S, en causant un encombrement stérique (Klinge et al. 2011).

Il arrive parfois que les ribosomes reconnaissent peu ou pas le premier codon d'initiation. Ils poursuivent alors le balayage jusqu'au codon d'initiation suivant. Ce phénomène est appelé le balayage avec fuites (*leaky scanning*). Il se produit habituellement parce que le contexte entourant le premier AUG n'est pas optimal pour l'initiation de la traduction (codon d'initiation faible). Il semble que ce soit le facteur eIF1 qui scrute le contexte des codons AUG, mais on ignore par quel mécanisme. Le balayage avec fuites permet de produire deux protéines à partir d'un seul ARNm (Kozak 2002).

Les ARNm contiennent généralement une queue de poly(A) de 50 à 300 nt à leur extrémité 3'. Cette queue de poly(A) et la coiffe travaillent en synergie afin d'obtenir une initiation efficace de la traduction. En effet, la protéine liant la queue de poly(A) (PABP; *polyA binding protein*) se lie à eIF4G, qui fait partie du trimère eIF4F liant la coiffe. Cela entraîne une circularisation de l'ARNm qui favorise la réinitiation de la traduction d'un ARNm par les mêmes ribosomes qui viennent d'effectuer sa traduction (voir section 1.4.3).

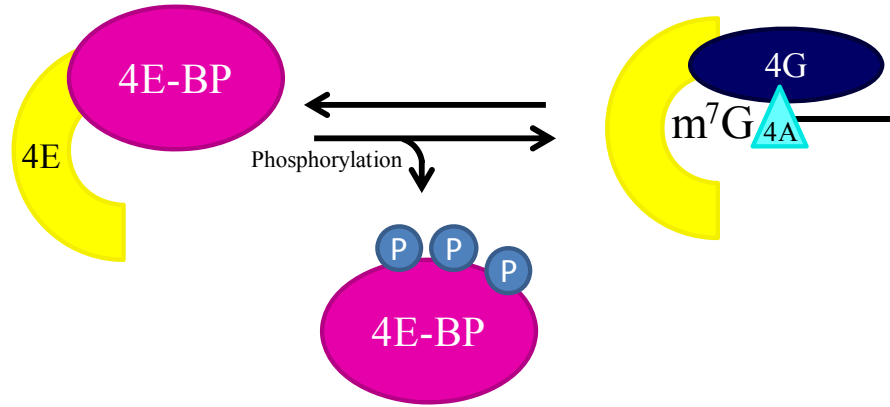
1.4.5.1 Régulation de la traduction coiffe-dépendante

Une façon de contrôler la traduction coiffe-dépendante est d'affecter le rôle de différents facteurs d'initiation, ce qui peut se faire en augmentant ou en diminuant leur phosphorylation (Figure 1-11). Par exemple, la régulation de l'initiation de la traduction coiffe-dépendante peut se faire via le contrôle de la formation d'eIF4F par le facteur 4E-BP (*4E-binding protein*). En effet, ce facteur compétitionne avec eIF4G pour la liaison d'eIF4E. L'activité de 4E-BP est contrôlée par son degré de phosphorylation. Lorsqu'il est hypophosphorylé, 4E-BP lie eIF4E, mais, lorsqu'il est hyperphosphorylé, il ne le lie pas. La phosphorylation de 4E-BP est contrôlée par la kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*), qui elle-même est contrôlée par plusieurs voies de signalisation (Gebauer and Hentze 2004; Hentze et al. 2007; Raught and Gingras 2007).

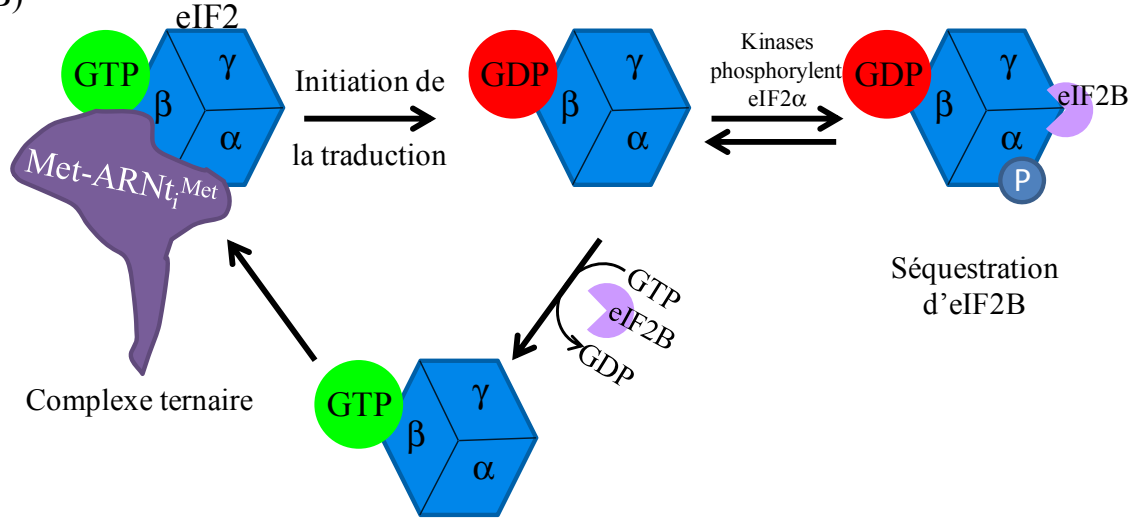
Un facteur essentiel de la traduction coiffe-dépendante est le facteur eIF2 qui fait partie du complexe ternaire eIF2•GTP•Met-ARNt^{Met}. Nous avons expliqué plus haut (section 1.4.5) que lorsque eIF2 interagit avec la 40S, il est lié à du GTP. Quand le codon initiateur est reconnu par l'anticodon de l'ARNt initiateur lié à la 43S, il y a hydrolyse du GTP en GDP et eIF2•GDP est relâché. Afin de pouvoir participer à un nouveau cycle d'initiation de la traduction, eIF2 doit échanger le GDP qu'il lie pour du GTP. Ce processus est catalysé par le facteur d'échange eIF2B. Quand eIF2 est lié au GTP, sa conformation lui confère une haute affinité pour Met-ARNt^{Met}, ce qui permet la formation d'un complexe ternaire (Gebauer and Hentze 2004; Pestova et al. 2007). eIF2 est composé de trois sous-unités : α , β et γ . La phosphorylation du résidu sérine 51 de la sous-unité α entraîne une séquestration du facteur eIF2B, empêchant ainsi le recyclage d'eIF2-GDP en eIF2GTP, ce qui inhibe la traduction coiffe-dépendante (Figure 1-11). Quatre kinases cellulaires peuvent phosphoryler la sous-unité α d'eIF2 : HRI (*heme-regulated inhibitor*), qui est activée par le manque d'hème dans les réticulocytes, PKR (protéine kinase contrôlée régulée par l'ARN db), qui peut être activée et inhibée par la présence d'ARN db (voir plus bas), PERK (kinase semblable à PKR localisée au réticulum endoplasmique), qui est activée par des stress dans le réticulum endoplasmique et GCN2 (*general control*

Figure 1-11 : Représentation de deux facteurs d'initiation de la traduction dont la régulation influence le taux d'initiation (adapté de Hentze et al. 2007). A) Le facteur eIF4E lie la coiffe de l'ARNm ainsi que le facteur eIF4G. Le facteur 4E-BP a une forte affinité pour eIF4E lorsqu'il est hypophosphorylé et ce facteur compétitionne alors avec eIF4G pour lier eIF4E. La phosphorylation de 4E-BP libère eIF4E. B) eIF2 lié au GTP est recruté pour former le complexe ternaire eIF2-GTP-Met-ARNt^{Met} qui se lie à la 40S. Le GTP est hydrolysé en GDP suite à la reconnaissance du codon initiateur AUG de l'ARNm par l'anticodon du Met-ARNt^{Met} et le facteur eIF2 lié au GDP quitte la 40S. Afin d'entrer dans un nouveau cycle d'initiation de la traduction, il doit échanger le GDP pour du GTP. Cet échange est catalysé par le facteur eIF2B. La phosphorylation d'une des sous-unités d'eIF2, eIF2- α , entraîne la séquestration d'eIF2B par eIF2. L'échange de GDP pour du GTP ne peut donc plus se faire, ce qui empêche eIF2 de participer à un nouveau cycle d'initiation et inhibe la traduction coiffe-dépendante.

A)



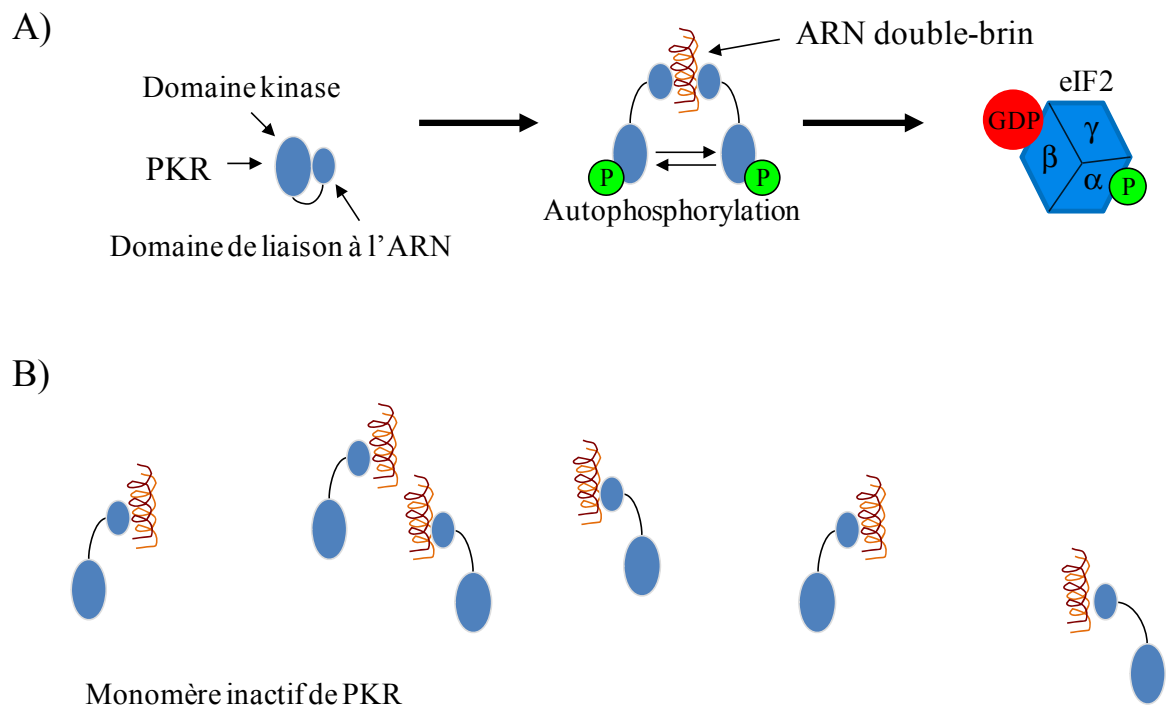
B)



non-derepressible-2) chez la levure, dont l'équivalent chez les mammifères est eIF2AK4, qui est activé par un manque d'acides aminés (Gebauer and Hentze 2004; Dever et al. 2007). La phosphorylation d'eIF2 α peut être éliminée par des phosphatases. Ceci est réalisé grâce à la formation d'un complexe entre la sous-unité catalytique de la phosphatase I (PP1c) et la sous-unité de phosphatases CREP (exprimée constitutivement) ou la sous-unité GADD34 (induite par les stress). Ce complexe déphosphoryle eIF2 α et permet à l'initiation de la traduction de reprendre (Ron and Harding 2007).

Dans nos travaux, nous nous sommes intéressés, entre autres à l'effet de PKR sur l'initiation de la traduction et sur un déphasage durant l'élongation de la traduction (voir section 1.7) PKR est exprimée constitutivement en faible quantité dans les cellules eucaryotes. Son expression est induite par les interférons (Benkirane et al. 1997; Pflugheber et al. 2002). PKR exerce son effet en deux étapes, soit son activation par autophosphorylation, suivie de la phosphorylation de ses substrats. De façon plus détaillée, la liaison de l'ARN db à PKR induit un changement de conformation de cette kinase (Benkirane et al. 1997). En absence d'ARN db, les deux domaines de liaison à l'ARN de PKR cachent son domaine à activité kinase et, par le fait même, l'inhibe (Figure 1-12). La liaison à l'ARN db supprime cette inhibition de PKR en exposant le domaine kinase (Dever et al. 2007). La présence de faibles concentrations d'ARN db active PKR alors que de grandes concentrations d'ARN db l'inhibent (Hunter et al. 1975; Lemaire et al. 2005). Cela est dû au fait qu'il doit y avoir liaison de deux molécules de PKR à une molécule d'ARN db afin que la kinase soit activée. La cinétique d'activation de PKR implique que de grandes concentrations d'ARN db favorisent la présence de plusieurs monomères inactifs de PKR liés à des molécules d'ARN db. Comme PKR n'est pas dimérisée dans ces conditions, elle n'est pas active. En effet, un rapport d'ARN db:PKR d'environ 1:2 favorise la dimérisation et l'activation de la kinase alors qu'un rapport excédant 1:1 inhibe la dimérisation de PKR (revue par Dever et al. 2007; Clerzius et al. 2011).

Figure 1-12 : Activation ou inhibition de la protéine kinase PKR par l'ARN db. A) En absence d'ARN db, le domaine kinase de PKR est caché et inactif. Lorsque deux PKR lient une molécule d'ARN db, les kinases s'autophosphorylent et sont alors actives. Le facteur d'initiation eIF2 est phosphorylé et séquestre eIF2B. B) Lorsque le rapport d'ARN db par PKR approche de 1, PKR est inhibée puisque chaque PKR lie une molécule d'ARN db différente. PKR ne peut alors pas s'autophosphoryler et, par conséquent, elle reste inactive.



1.4.5.2 Inhibiteurs de la traduction coiffe-dépendante

Comme indiqué à la section 1.4.5.1, l'initiation de la traduction peut être contrôlée en affectant différents facteurs d'initiation tels que eIF4E et eIF2 (Hentze et al. 2007). Elle peut aussi être perturbée par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques. En voici trois que nous avons utilisés lors de nos études (Figure 1-13).

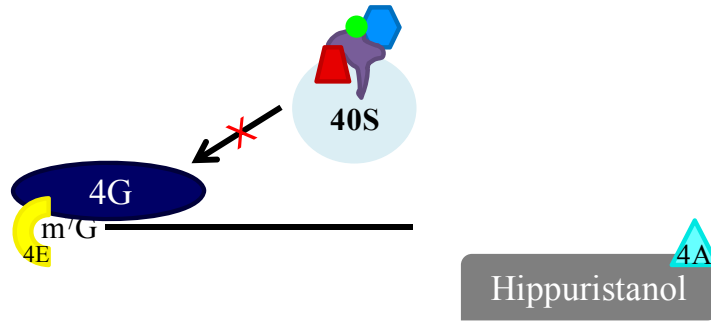
L'hippuristanol est un inhibiteur du facteur d'initiation eIF4A (voir section 1.4.5). En absence d'inhibiteur, eIF4A utilise son activité hélicase afin de défaire les structures secondaires de l'ARNm, ce qui permet l'attachement de la 43S à l'extrémité 5' de l'ARNm et son balayage de la 5'UTR. L'hippuristanol séquestre eIF4A en interagissant avec son extrémité C-terminale, ce qui empêche la liaison de la petite sous-unité à l'ARNm ainsi que son balayage subséquent de la 5'UTR des ARNm inhibant ainsi l'initiation coiffe-dépendante. L'effet de l'hippuristanol est spécifique pour eIF4A, car cet inhibiteur n'affecte pas l'activité d'autres hélicases appartenant à la famille à boîte DEAD tout comme eIF4A (Bordeleau et al. 2006; Lindqvist et al. 2008).

Un autre inhibiteur de la traduction coiffe-dépendante, la rapamycine, agit indirectement sur le facteur d'initiation eIF4E. En absence d'inhibiteur, la kinase mTOR phosphoryle le facteur 4E-BP qui a alors peu d'affinité pour le facteur d'initiation eIF4E (voir section 1.4.5.1). Lorsqu'elle est présente, la rapamycine interagit avec une protéine (FKBP12) qui inhibe alors l'activité de mTOR. L'inhibition de mTOR entraîne l'hypophosphorylation de 4E-BP qui séquestre eIF4E, inhibant ainsi l'initiation coiffe-dépendante (Dutcher 2004).

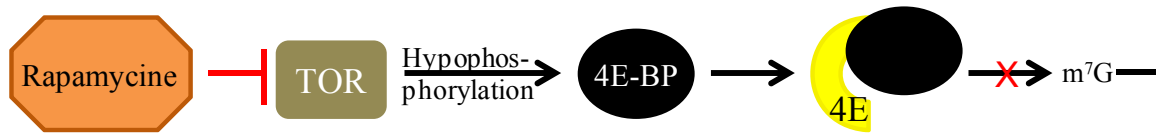
Un troisième inhibiteur, la thapsigargine, agit via le facteur d'initiation eIF2. La présence de thapsigargine entraîne un stress au niveau du réticulum endoplasmique, ce qui active la kinase PERK (voir section 1.4.5.1). Cette kinase cause la phosphorylation du facteur eIF2 ce qui inhibe l'initiation coiffe-dépendante de la traduction (Williams 1999; Ron and Harding 2007).

Figure 1-13 : Mode d'action de l'hippuristanol, de la rapamycine et de la thapsigargine, trois inhibiteurs de l'initiation coiffe-dépendante. (A) L'hippuristanol agit en séquestrant l'hélicase eIF4A. Cette hélicase ne peut alors plus lier eIF4G, ce qui nuit à la liaison de la petite sous-unité du ribosome à l'ARNm ainsi qu'à son balayage de la région 5'UTR. (B) La rapamycine bloque la voie de mTOR, ce qui mène à une hypophosphorylation du facteur 4E-BP. Ce dernier va alors séquestrer eIF4E. (C) La thapsigargine induit un stress au niveau du réticulum endoplasmique, ce qui active la kinase PERK. PERK phosphoryle alors eIF2- α et inhibe l'échange de GDP pour du GTP.

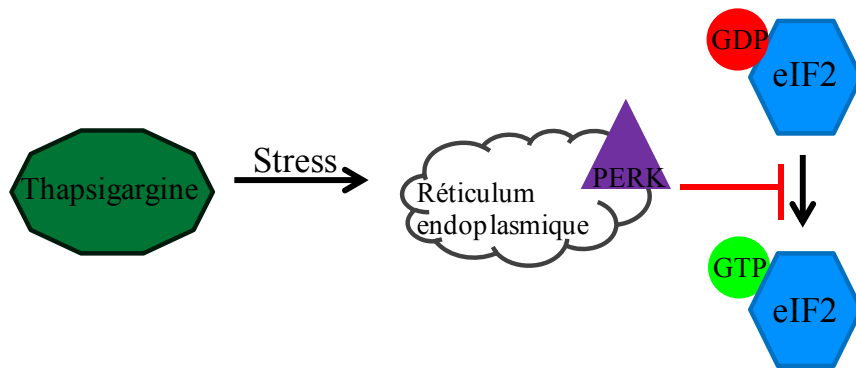
A)



B)



C)

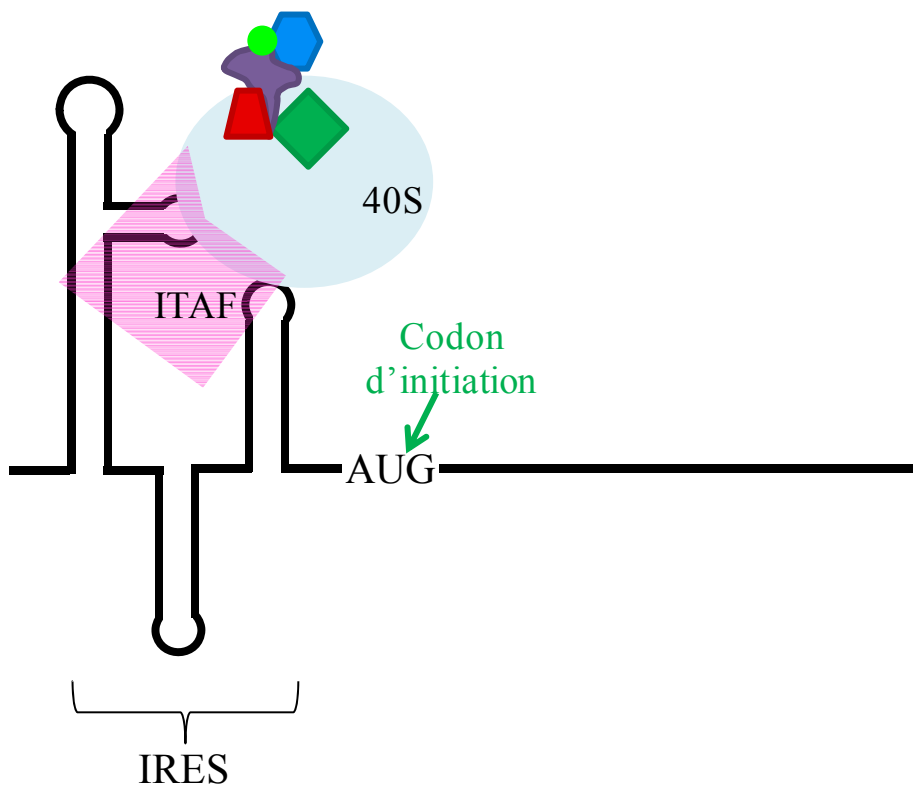


1.4.6 Initiation IRES-dépendante

L'initiation IRES-dépendante est coiffe-indépendante et permet à de nombreux virus de traduire leur génome suite à l'arrêt de la traduction coiffe-dépendante dans les cellules hôtes. Ce type d'initiation a premièrement été identifié chez le virus de la poliomyélite et chez le virus encéphalo-myocardique (EMCV), qui ne contiennent pas de coiffe et qui, par conséquent, doivent utiliser un mode d'initiation de la traduction qui n'est pas coiffe-dépendant (revue par Balvay et al. 2009; Hellen 2009; Pacheco and Martinez-Salas 2010). Le mode d'initiation IRES-dépendant permet la liaison de la sous-unité ribosomique 40S à l'ARNm sur un site d'entrée dit interne (IRES; *internal ribosome entry site*) à proximité du codon initiateur ou directement au niveau de ce codon initiateur. Elle n'a donc pas besoin des facteurs d'initiation de la traduction liant la coiffe tel qu'eIF4E et la portion N-terminale d'eIF4G servant à lier eIF4E. Chez plusieurs virus, le facteur eIF4G est clivé par une protéase virale, ce qui privilégie l'initiation IRES-dépendante (Lopez-Lastra et al. 2005; Doudna and Sarnow 2007; Fitzgerald and Semler 2009). Les IRES ont généralement besoin de facteurs cellulaires spécifiques (ITAF; *IRES trans-acting factors*) afin d'augmenter leur efficacité (Figure 1-14). Le rôle principal des ITAF semble être d'aider certains IRES à adopter une forme active pour l'initiation de la traduction (Balvay et al. 2009; Fitzgerald and Semler 2009). L'utilisation et le nombre d'ITAF varient dépendamment des IRES. Il n'est pas possible de prédire les ITAF nécessaires pour le bon fonctionnement d'un IRES, mais une corrélation inverse entre le degré de stabilité des structures d'ARN de l'IRES et le nombre d'ITAF nécessaire à son bon fonctionnement a été observée (Filbin and Kieft 2009).

Une méthode couramment utilisée afin de déterminer la présence d'un IRES est l'utilisation d'un système bicistronique. Dans ce système, la région contenant un IRES hypothétique est positionnée entre les séquences codant pour deux cistrons. Le premier cistron est produit selon un mode d'initiation coiffe-dépendant et sa traduction s'arrête à un codon de terminaison précédant la région intercistronique. L'initiation de la traduction du second cistron a lieu uniquement s'il y a un IRES dans la région intercistronique. Il est

Figure 1-14 : Schéma représentant l'initiation de la traduction IRES-dépendante par la 40S aidée de facteurs d'initiation. La 40S est en effet représentée avec différents facteurs (eIF2, eIF3) souvent requis pour l'initiation IRES-dépendante. Un ITAF (*IRES trans-acting factors*) permettant à l'IRES d'adopter une conformation active est représenté.



important de s'assurer que la traduction du second cistron n'est pas due à l'apparition d'un ARNm résultant d'un épissage alternatif ou de la présence d'un promoteur cryptique. Différentes stratégies ont été développées pour s'assurer de l'intégrité de l'ARNm codant pour les deux cistrons utilisés comme rapporteurs (Van Eden et al. 2004).

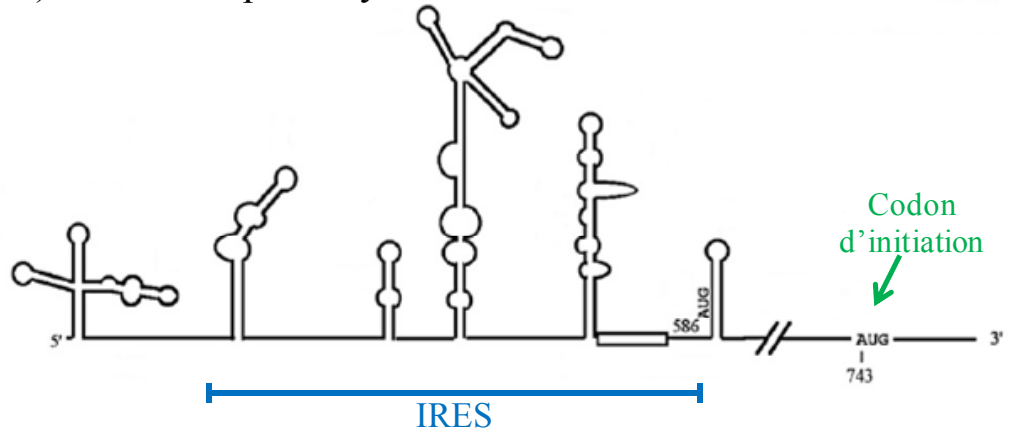
Les 5'UTR des ARNm viraux qui contiennent des IRES sont longues, possèdent plusieurs régions structurées et ont souvent plusieurs AUG précédant l'AUG initiateur. Ces caractéristiques ne sont pas compatibles avec une initiation coiffe-dépendante. Des IRES ont été retrouvés chez plusieurs virus ainsi que chez certains ARNm cellulaires (Figure 1-15). Les IRES cellulaires sont associés à la différenciation cellulaire, à la mitose, à la réponse au stress ainsi qu'à d'autres conditions durant lesquelles la traduction coiffe-dépendante est inhibée (Filbin and Kieft 2009). Il n'existe pas de consensus sur la structure de l'ARNm ou sur les facteurs nécessaires à un tel mode d'initiation. Les IRES sont donc définis uniquement par leur fonction et leur présence ne peut pas être prédite par la séquence d'ARNm ni par des motifs structuraux d'ARN. La structure secondaire et tertiaire de chacun des IRES doit être maintenue afin que ce mode d'initiation soit efficace (revue par Filbin and Kieft 2009; Hellen 2009; Pacheco and Martinez-Salas 2010).

Les virus utilisent l'appareil traductionnel de la cellule hôte afin de produire leurs protéines virales. Pour ce faire, ils utilisent plusieurs moyens afin de détourner les ressources de la cellule à leur avantage. Certains virus clivent le facteur d'initiation eIF4G à l'aide de leur protéase inhibant ainsi l'initiation de la traduction coiffe-dépendante. D'autres virus entraînent la déphosphorylation de 4E-BP qui, une fois hypophosphorylée, séquestre eIF4E, ce qui inhibe également la traduction coiffe-dépendante (Lopez-Lastra et al. 2005).

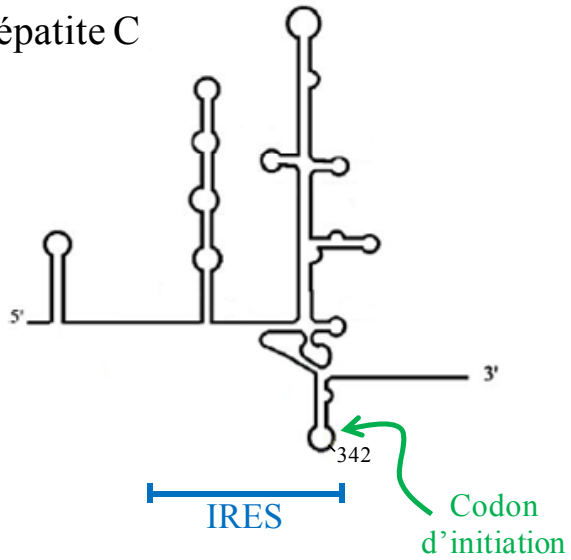
L'initiation de la traduction eucaryote débute lors du positionnement de Met-ARNt^{Met} au codon initiateur d'un ARNm. Cet ARNt est lié au codon d'initiation grâce au facteur eIF2. Lorsque la cellule est soumise à différents stress qui inhibent la traduction coiffe-dépendante, il y a aussi fréquemment phosphorylation de la sous-unité α d'eIF2, ce qui l'empêche de jouer son rôle (voir section 1.4.5.1). La traduction IRES-dépendante

Figure 1-15 : Exemple d'IRES contenus dans la 5'UTR d'ARNm (A) du virus de la poliomyélite, (B) du virus de l'hépatite C (Balvay et al. 2009) et (C) de c-myc, un ARNm cellulaire (Filbin and Kieft 2009).

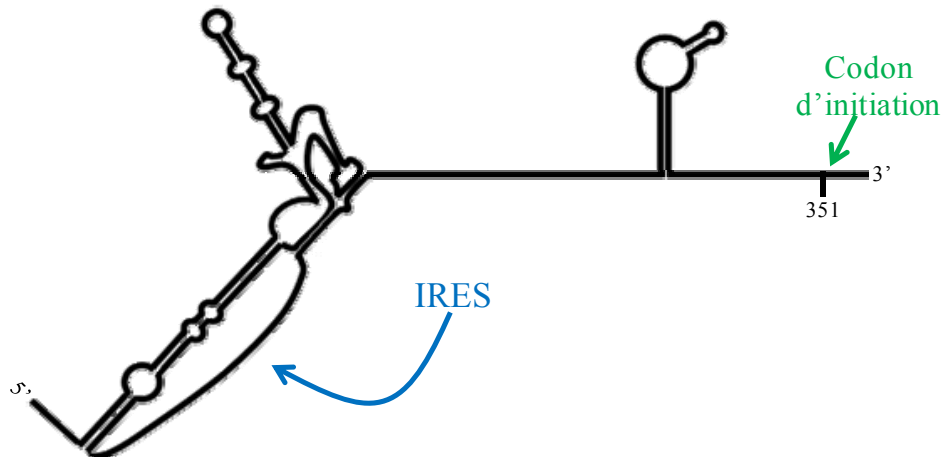
A) Virus de la poliomyélite



B) Virus de l'hépatite C



C) ARNm de c-myc



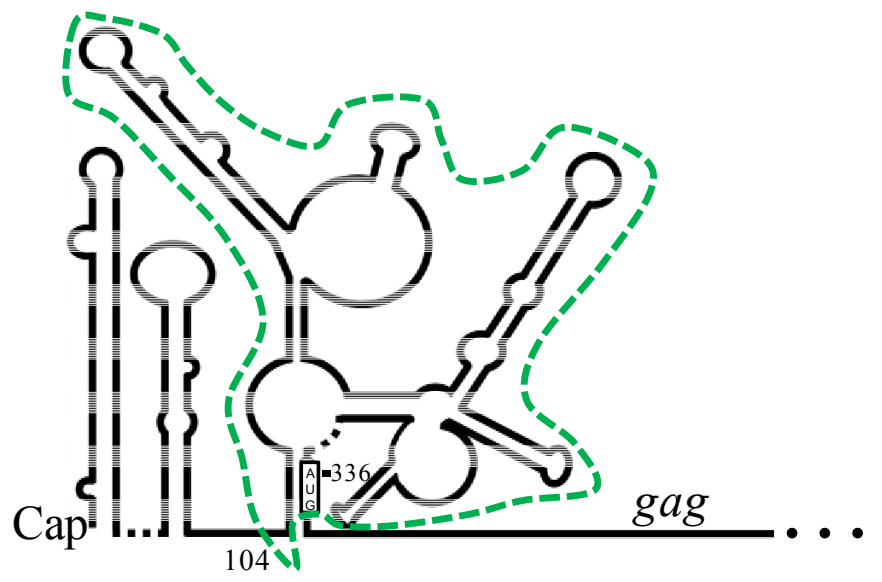
utilise eIF2 pour amener l'ARNt initiateur lorsqu'il est disponible. Si eIF2 n'est pas disponible, d'autres protéines cellulaires peuvent se substituer à eIF2 et le remplacer pour amener l'ARNt initiateur à la petite sous-unité. C'est le cas, par exemple du facteur d'initiation eIF5B et de la ligatine (Terenin et al. 2008; Skabkin et al. 2010; Thakor and Holcik 2012).

1.5 Traduction des ARN messagers viraux

1.5.1 Initiation coiffe-dépendante des ARNm du VIH-1

Comme les ARNm cellulaires, les ARNm du VIH-1 possèdent un coiffe en 5' et une queue de poly(A) en 3', suggérant qu'ils utilisent une initiation coiffe-dépendante. Certains ARNm viraux ont leur coiffe (m⁷G) hyperméthylée (TMG; trimethylguanosine) par une enzyme cellulaire via l'interaction de Rev, ce qui favorise leur expression par un mécanisme qui n'est pas connu (Yedavalli and Jeang 2010). De plus, la 5'UTR des ARNm du VIH-1 ne contient pas de codons AUG en amont du codon initiateur régulier, pointant également en faveur d'une initiation coiffe-dépendante. On sait en effet que les ARNm utilisant un IRES, comme celui du virus de l'hépatite C, contiennent généralement plusieurs AUG en amont de l'AUG initiateur. Le groupe de Ohlmann (Ricci et al. 2008) a démontré que l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 est traduit de façon coiffe-dépendante dans des lysats de réticulocytes de lapin (RRL) et il a été observé que la traduction des ARNm du VIH-1 est affectée par des inhibiteurs de l'initiation coiffe-dépendante (revue par Balvay et al. 2009). Enfin, plus récemment, Berkhout et al. (2011) ont démontré que l'initiation de la traduction de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 se faisait par un mode coiffe-dépendant dans des cellules en culture. Pour ce faire, ils ont utilisé un gène rapporteur où l'ARNm contient la 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 précédant la région codante du rapporteur. Ils ont introduit des codons AUG dans cette 5'UTR et observé que ces mutations inhibaient la traduction du rapporteur. Ce résultat était attendu si l'initiation de l'ARNm rapporteur est coiffe-dépendante puisque les ribosomes effectuent alors un balayage de la 5'UTR après s'être liés à la coiffe.

Figure 1-16 : Représentation schématique de la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 selon la conformation de Weeks obtenue par la technique SHAPE (voir section 1.2.1). La région de l'IRES est délimitée par la ligne pointillée verte. L'AUG initiateur de *gag* est encadré (adaptée de Wilkinson et al. 2008).



IRES du 5'UTR
du VIH-1

On sait que la présence de TAR et Poly(A) à l'extrémité 5' d'un ARNm inhibe l'initiation de la traduction coiffe-dépendante, en bloquant la liaison de la 40S à l'extrémité 5' de cet ARNm (Parkin et al. 1988) (voir sections 1.2.1.1 et 1.2.1.2). Pourtant, l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 est traduit suivant un mode coiffe-dépendant. Comme nous allons le voir plus loin, ceci s'explique par le fait que diverses protéines cellulaires antagonisent l'effet de TAR-Poly(A) (voir section 1.5.4). La protéine virale Tat pourrait aussi contrecarrer l'effet de TAR-Poly(A) (voir section 1.3.4.1).

1.5.2 L'initiation IRES-dépendante

L'ARNm pleine-longueur du VIH-1 contient deux IRES permettant d'initier sa traduction dont la présence a été mise en évidence à l'aide de systèmes bicistroniques dont nous avons parlé plus haut (section 1.4.6). Un IRES a été identifié au début de la région codante de *gag* (Buck et al. 2001). Il permet à l'initiation de la traduction de débuter à deux AUG initiateurs différents : l'AUG initiateur de *gag* et le codon AUG suivant situé dans le même cadre de lecture à l'intérieur de la séquence codante de *gag*. Cela permet la production du précurseur Gag (p55) et d'une forme tronquée de Gag (p40), respectivement. La mutation de l'AUG initiateur de p40, empêchant la traduction de cette protéine, diminue la réplication virale. Cette forme tronquée de Gag est conservée chez les lentivirus. Cela suggère que cet IRES et cet isoforme de Gag sont importants pour le virus (Nicholson et al. 2007; Locker et al. 2011).

Un autre IRES a été identifié à l'intérieur de la 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 (Figure 1-16). Il s'étend du nt 104 au nt 335 de la séquence de Lai (où le nt 1 correspond au site de départ de la transcription). La région entre les nt 104 et 289 contient une portion de cet IRES qui est presque aussi active que l'IRES complet, indiquant que tous les ARNm du VIH-1 contiennent un IRES (Brasey et al. 2003), car tous les ARNm du VIH-1 contiennent cette région (Yilmaz et al. 2006). Nous avons étudié l'influence de la 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 contenant un IRES sur le déphasage -1 du VIH-1 et cet IRES est décrit plus en détail ci-dessous.

L'utilisation du mode IRES-dépendant lors de la réplication du VIH-1 demeure controversée (voir section 1.5.3). Il faut noter que l'IRES de la 5'UTR du VIH-1 est plus actif dans certaines conditions, comme durant la phase G2/M du cycle cellulaire. Ceci a été démontré avec des cellules transfectées avec un vecteur bicistronique contenant cet IRES, qui ont été arrêtées artificiellement à la phase G2/M par l'utilisation de nocodazole (Brasey et al. 2003). Dans cette phase, la traduction coiffe-dépendante est inhibée suite à l'hypophosphorylation du facteur 4E-BP qui séquestre eIF4E (Pyronnet et al. 2001). Cet IRES est également plus actif lorsque les cellules sont soumises à un stress oxydatif (Gendron et al. 2011) ou à un stress osmotique (Monette et al. 2009), des conditions qui entraînent aussi une inhibition de la traduction coiffe-dépendante. L'hypophosphorylation du facteur 4E-BP est également en cause pour expliquer l'inhibition de la traduction coiffe-dépendante dans ces conditions (van den Beucken et al. 2006; Raven and Koromilas 2008). De plus, les stress cellulaires entraînent la phosphorylation du facteur eIF2 via l'activation de kinases (voir section 1.4.5.1). Rappelons ici que l'initiation par le mode IRES résiste à cette inhibition d'eIF2 en utilisant d'autres facteurs pour amener l'ARNt initiateur à la 40S (voir section 1.4.6).

Certains facteurs cellulaires, agissant comme ITAF, modulent l'efficacité de l'IRES de la 5'UTR du VIH-1. Le facteur HuR (*human embryonic-lethal abnormal vision (ELAV)-like protein*) inhibe l'activité de cet IRES, mais cette inhibition ne semble pas impliquée une interaction directe IRES-HuR (Rivas-Aravena et al. 2009). Par contre, la ribonucléoprotéine hétérologue nucléaire A1 (hnRNP A1) (Monette et al. 2009), le facteur de traduction eIF5a, la protéine humaine interagissant avec Rev (hRIP) et l'hélicase d'ARN DDX3 (Liu et al. 2011) augmentent l'efficacité de cet IRES. De plus, le groupe de López-Lastra (Vallejos et al. 2011) a démontré que l'activité de l'IRES du VIH-1 est stimulée lors de la phase G2/M du cycle cellulaire et que certaines protéines lient spécifiquement l'IRES durant cette phase du cycle cellulaire.

1.5.3 La traduction coiffe-dépendante est inhibée lors de l'infection virale

L'infection par le VIH-1 entraîne plusieurs modifications du cycle cellulaire de la cellule hôte. Par exemple, Vpr bloque le cycle cellulaire en G2/M (phase du cycle cellulaire

où la traduction coiffe-dépendante est inhibée), Vif maintient la cellule à la phase G2 du cycle cellulaire (Izumi et al. 2010) et la protéase virale peut cliver les facteurs d'initiation eIF4G et PABP, ce qui contribue également à inhiber la traduction coiffe-dépendante. Pourtant, la traduction des ARNm du VIH-1 se poursuit (revue par Balvay et al. 2009; Castello et al. 2009), ce qui suggère qu'à ce moment, le virus utilise l'initiation IRES-dépendante.

Nous pouvons supposer qu'au début de l'infection virale, la traduction des ARNm viraux a lieu via un mécanisme coiffe-dépendant. Mais ensuite, lorsque l'initiation coiffe-dépendante est compromise, c'est le mode IRES-dépendant qui est employé pour traduire les ARNm viraux. Ainsi, l'initiation de la traduction pourrait varier au cours du cycle de réplication virale (revue par Yilmaz et al. 2006; Balvay et al. 2009).

1.5.4 Les protéines cellulaires qui influencent la traduction du VIH-1

La traduction des ARNm viraux est affectée par plusieurs éléments. Cette section décrit principalement les éléments agissant sur la tige-boucle TAR, puisque la présence de cette tige-boucle à l'extrémité 5' des ARNm interfère avec la liaison de la petite sous-unité du ribosome à l'ARNm lors de l'initiation coiffe-dépendante. Parmi les facteurs cellulaires qui contrecarrent l'effet de TAR, il y a TRBP, Staufen, l'autoantigène La ainsi que les hélicases RHA, DHX29 et DDX3.

Tel qu'indiqué à la section 1.4.5.1, l'activation de la kinase PKR est un mécanisme de défense cellulaire activé par les interférons en réponse notamment aux infections virales. Les virus, dont le VIH-1, ont par contre évolué de façon à contrecarrer l'effet de PKR. Cette kinase est activée en présence d'une certaine quantité d'ARN db telle que TAR, ce qui entraîne une diminution de l'initiation de la traduction par la phosphorylation de la sous-unité α du facteur d'initiation eIF2. Cependant, la présence d'une grande quantité de TAR inhibe l'activation de PKR en diminuant ses probabilités de dimérisation. La présence de la protéine Tat du VIH-1 inhibe également PKR en s'y liant directement ou en lui servant de substrat, compétitionnant ainsi avec eIF2 (voir section 1.3.4.1) (Clerzius et al.

2011). De plus, la présence de Tat entraîne une augmentation de la présence de TAR dans la cellule en activant la transcription des ARNm viraux (Sanghvi and Steel 2011).

Alors que PKR activée inhibe la traduction des ARNm, le virus utilise certains facteurs cellulaires afin de contrer cet effet et de poursuivre la traduction de ses ARNm. Parmi ces facteurs, il y a la protéine TRBP qui contient deux sites de liaison à l'ARN db. Elle peut lier directement PKR ou TAR, ce qui inhibe l'activation de PKR. Ceci est important pour que le VIH-1 puisse se répliquer efficacement. De plus, la liaison de TRBP à TAR permet de contrecarrer l'effet de TAR sur la traduction en déstabilisant la structure de cette tige-boucle, qui est présente à l'extrémité 5' de tous les ARNm du VIH-1. La présence de TRBP est, par conséquent, essentielle à la réplication de ce virus (revue par Clerzius et al. 2011; Sanghvi and Steel 2011).

Une autre protéine liant l'ARN db, la protéine Staufen, est une composante du système de transport des ARNm. Elle s'associe également aux polysomes, indiquant un rôle dans la traduction des ARNm. Dugré-Brisson et al. (2005) ont démontré que Staufen se lie à l'extrémité 5' des ARNm qui ont la structure TAR à cette extrémité. Staufen contrecarre le blocage produit par TAR sur l'initiation de la traduction. Elle ne possède pas d'activité hélicase intrinsèque et elle agirait par l'intermédiaire d'hélicases non identifiées.

L'autoantigène La, qui stimule la traduction des ARNm contenant des structures secondaires stables à l'extrémité 5' grâce à son activité hélicase, agit aussi sur les ARNm du VIH-1, en déroulant la structure TAR (Svitkin et al. 1994).

Plusieurs hélicases sont également impliquées dans la traduction des ARNm viraux. L'hélicase RHA intervient dans la réplication du VIH-1, ce qui peut être relié à un effet sur l'initiation de la traduction coiffe-dépendante (Bolinger et al. 2010). Il a d'ailleurs été montré que cette hélicase se lie à TAR (Fujii et al. 2001). Une autre hélicase, DDX3, stimule l'initiation de la traduction coiffe-dépendante des ARNm viraux (Liu et al. 2011). Cependant, sa liaison à TAR n'a pas été démontrée. Une troisième hélicase, DHX29, est également requise pour la traduction des ARNm contenant des structures secondaires stables (Pisareva et al. 2008). Elle pourrait intervenir dans la traduction des ARNm du VIH-1.

1.6 Reprogrammation de la traduction

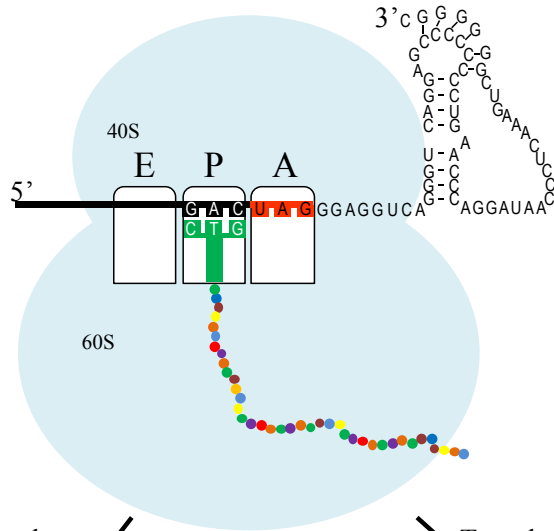
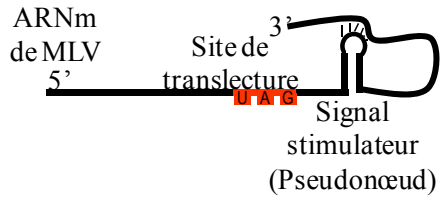
Chez les eucaryotes, les ARNm contiennent généralement un seul cadre de lecture permettant la production d'une protéine spécifique. La traduction des ARNm est régulée afin d'éviter la production de protéines inutiles et potentiellement nocives pour la cellule (voir section 1.4). Cependant, la traduction de certains ARNm viraux, et, moins fréquemment, de certains ARNm cellulaires, utilise un événement de reprogrammation (*recoding*), qui leur permet de produire une protéine supplémentaire en plus de la protéine traduite de façon conventionnelle, dans le cadre de lecture 0. Les deux cadres de lecture contiennent un codon de terminaison, alors que seul le premier cadre contient un codon d'initiation. La reprogrammation de la traduction nécessite la présence de signaux dans l'ARNm qui permettent de modifier les règles de synthèse des protéines. Cette reprogrammation peut se produire lors de l'étape de terminaison de la traduction (translecture d'un codon de terminaison (*readthrough*)), lors de l'étape d'élongation (changement de cadre de lecture en +1 ou en -1 (déphasage +1 ou -1) ou par un saut du ribosome (le ribosome ne traduit pas une portion de l'ARNm (*hopping* ou *bypassing*)).

Cette lecture anormale des ARNm est dite programmée, car elle ne se produit pas au hasard. Elle se fait à un site précis et elle est contrôlée par différents signaux dans l'ARNm. Le VIH-1 utilise un changement de cadre de lecture -1 afin de produire le précurseur Gag-Pol lors de la traduction de son ARNm pleine-longueur et ce phénomène sera décrit plus en détail (voir section 1.6.4) que les autres types de reprogrammation de la traduction.

1.6.1 Translecture d'un codon de terminaison (*readthrough*)

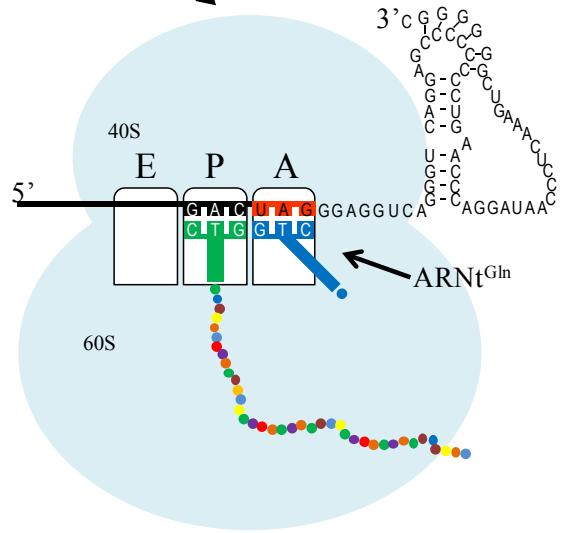
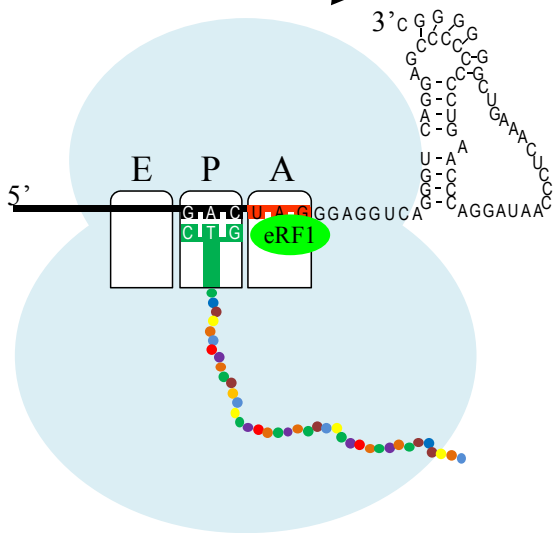
La translecture programmée est utilisée par certains virus, comme le virus de la leucémie murine (MLV), afin de produire Gag-Pol, le précurseur de leurs enzymes, alors que la traduction conventionnelle du même ARNm viral produit Gag, le précurseur des protéines de structure du virus. Gag-Pol est synthétisé en faible quantité (environ 5 % à 10 % par rapport à Gag pour MLV). Gag et Gag-Pol se trouvent dans le même cadre de lecture et les portions codant pour Gag et Pol sont séparées par un codon de terminaison

Figure 1-17 : Modèle de translecture lors de la traduction de l'ARNm du virus de la leucémie murine (MLV). Lorsque le codon de terminaison (UAG) se trouve au site A, deux situations sont possibles : le codon est lu comme un codon d'arrêt, ce qui arrive la plupart du temps, entraînant un arrêt de la traduction et la production de Gag, ou bien le codon est lu par un ARNt^{Gln} qui, normalement, reconnaît le codon CAG. Dans ce cas, la traduction se poursuit afin de produire la protéine de fusion Gag-Pol.



Lecture du codon d'arrêt

Translecture



Gag

Gag-Pol

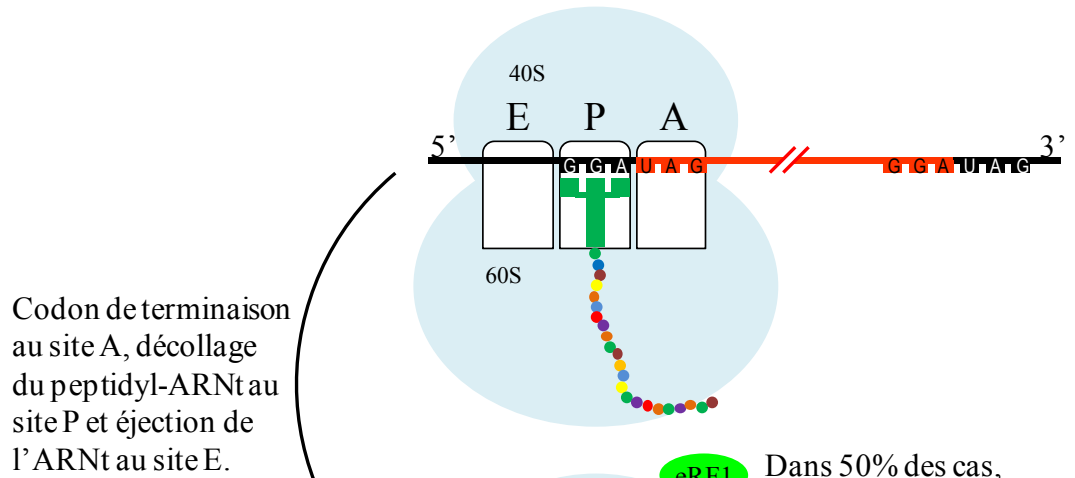
(UAG pour MLV). L'efficacité de cette translecture dépend de la compétition entre un ARNt et le facteur de terminaison eRF1.

Lors de la traduction de l'ARNm codant pour Gag, un petit nombre de ribosomes interprètent le codon de terminaison comme un codon sens. Ce codon est alors reconnu par un ARNt même si l'appariement de l'anticodon de cet ARNt est imparfait. Chez MLV, le codon d'arrêt UAG peut être reconnu par un ARNt^{Gln}, qui reconnaît normalement le codon CAG. La traduction se poursuit alors produisant la protéine de fusion Gag-Pol. Le contexte dans lequel se trouve le codon de terminaison est important pour qu'il y ait un événement de translecture. En effet, la translecture nécessite la présence d'un signal stimulateur pour s'effectuer. Les signaux stimulateurs utilisés pour les différentes reprogrammations sont souvent des pseudonœuds (structure de l'ARNm formée d'une tige-boucle dont la boucle interagit avec une séquence complémentaire située en aval sur le même ARNm), mais ils peuvent également prendre la forme d'une tige-boucle. Chez MLV, à huit nucléotides en aval du codon-stop, se trouve un signal stimulateur de translecture sous la forme d'un pseudonœud (Figure 1-17) (revue par Alam et al. 1999). De plus, la transcriptase inverse de MLV interagit avec le facteur de terminaison eRF1 et réduit son efficacité. Cette interaction permet au virus d'atteindre un taux de translecture optimal pour sa réplication (revue par Goff 2004). Selon une étude récente de Houck-Loomis et al. (2011), un équilibre existe entre deux conformations du pseudonœud chez MLV, l'une permettant la translecture et l'autre non. La conformation permissive est représentée à environ 5 %. La translecture programmée se rencontre, comme nous l'avons dit, chez certains virus, et aussi dans un certain nombre de gènes cellulaires, notamment chez la drosophile.

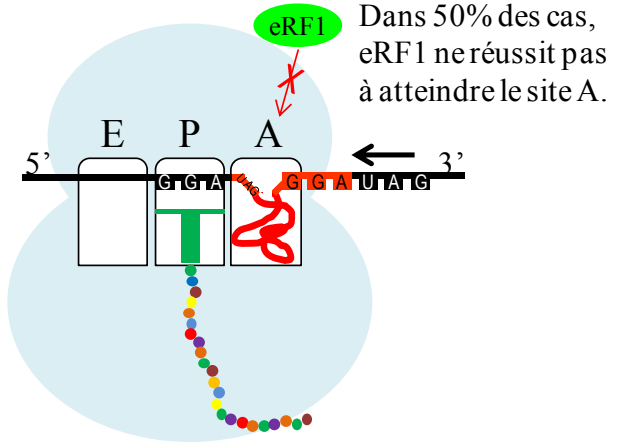
1.6.2 Saut du ribosome (*hopping* ou *bypassing*)

Le saut du ribosome permet à ce dernier de ne pas traduire une portion de la séquence codante. Ce type de reprogrammation est utilisé lors de la traduction du gène 60 du phage T4. Environ 50 % des ribosomes traduisant l'ARNm du gène 60 du phage T4 sautent une région de 50 nt sans la traduire permettant ainsi au phage de produire une sous-unité de sa topoisomérase. Cette séquence de 50 nt protège le génome de T4 contre le

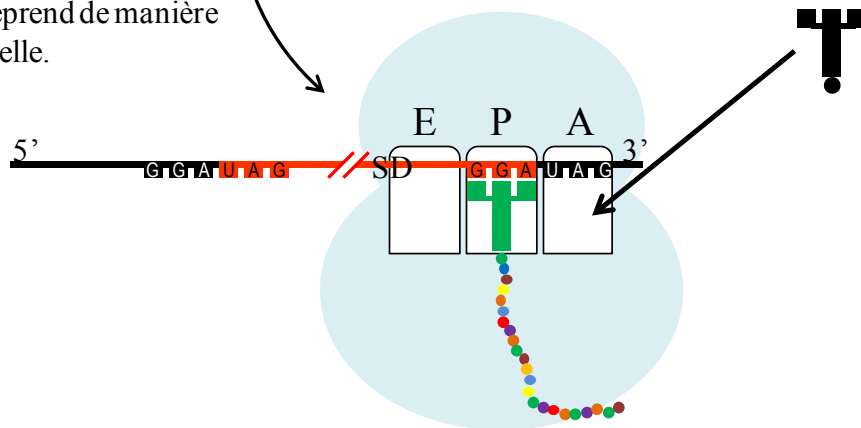
Figure 1-18 : Modèle du saut de ribosome lors de la traduction de l'ARNm du gène 60 du phage T4 (adaptée de Wills et al. 2008).



Codon de terminaison au site A, décollage du peptidyl-ARNt au site P et éjection de l'ARNt au site E.



La structure au niveau du site A se défait et l'ARNm retourne à une forme linéaire. Le peptidyl-ARNt se réapparie à l'ARNm quand il rencontre un codon lui correspondant (atterrissage). La traduction reprend de manière conventionnelle.



clivage par une nucléase, ce qui explique qu'elle ait été conservée (Herr et al. 2001; Bonocora et al. 2011).

Le groupe de Atkins (Wills et al. 2008) a démontré que le saut du ribosome s'effectue sans que ce dernier balaie les 50 nt qu'il ne traduit pas. Lorsque le ribosome atteint la région qu'il ne traduira pas, la présence au site A d'un codon de terminaison immobilise temporairement ce ribosome, ce qui permet aux ARNt situés aux sites E et P de se dissocier de l'ARNm. Il faut noter qu'à ce moment, le site P est occupé par un codon GGA. L'ARNm se replie alors au site A, ce qui empêche la liaison du facteur de terminaison. L'ARNt au site E est relâché. Ensuite, la structure d'ARNm au site A se défait et l'ARNm glisse alors le long du ribosome jusqu'à ce que l'ARNt au site P se réapparie à un codon GGA situé 50 nt en aval du codon GGA duquel il s'est dissocié. Une séquence semblable à une séquence Shine-Dalgarno minimale, GAG, est localisée à 6 nt du codon de réappariement de l'ARNt au site P et l'importance de cette séquence pour l'efficacité de saut a été démontrée par des études de mutagenèse. L'élongation de la traduction peut alors se poursuivre de façon conventionnelle (Figure 1-18). Différentes particularités de la structure non traduite interviennent dans ce saut qui est très efficace (plus de 50 % d'efficacité).

1.6.3 Le changement de cadre de lecture ribosomique programmé (déphasage)

Lors d'un changement de cadre de lecture ribosomique programmé (déphasage), le ribosome change de cadre de lecture par rapport au codon initiateur. Si le ribosome avance d'une base (en direction 3'), il s'agit d'un décalage en +1. S'il recule d'une base (en direction 5'), il s'agit d'un décalage en -1. Les changements de cadre de lecture permettent de produire deux protéines se chevauchant sur deux cadres de lecture différents. Les déphasages programmés se retrouvent chez les eucaryotes, chez les bactéries et chez les virus.

1.6.3.1 Le changement de cadre de lecture +1 (déphasage +1)

Le déphasage +1 se produit au niveau d'une séquence particulière de l'ARNm, nommée la séquence glissante. Le déphasage +1 se produit généralement grâce à une structure ou une séquence en *cis* de cet ARNm. Voici quelques exemples de déphasage +1.

Chez *Escherichia coli* (*E. coli*), la traduction du facteur de terminaison RF2, qui reconnaît les codons UGA et UAA, nécessite un déphasage +1. La séquence glissante où se produit ce déphasage +1 est située au 26^e codon, un codon de terminaison UGA. Le ribosome fait une pause quand ce codon occupe le site A. Si le codon est reconnu par le facteur RF2, la traduction s'arrête et il y a production d'un peptide court qui est rapidement dégradé. Il peut cependant y avoir un déphasage +1, qui conduit à la synthèse de RF2. Le contexte dans lequel se trouve le codon de terminaison affecte grandement l'efficacité de déphasage. Un nucléotide C suit immédiatement en 3' les nucléotides UGA rendant ce codon de terminaison peu efficace (Poole et al. 1995). Des interactions entre le codon et l'anticodon du deac-ARNt au site E affectent ce déphasage +1. Sanders et Curran (2007) ont montré que la mutation du codon au site E peut faire varier le déphasage jusqu'à 17 fois, supportant l'implication du site E dans l'événement du déphasage +1 ainsi que la possibilité d'interactions codon-anticodon au site E, qui, nous l'avons vu, a été contestée (section 1.4.1). Un autre élément nécessaire au déphasage +1 est une séquence semblable à la séquence Shine-Dalgarno, riche en purines, située en amont de la séquence glissante. La liaison du ribosome, via l'ARN 16S, à cet endroit favorise le déphasage +1. Finalement, ce déphasage est régulé par l'abondance de RF2 présente dans la cellule. Si la quantité de RF2 dans la cellule est grande, la probabilité qu'il se lie au codon UGA est très forte. La traduction sera alors arrêtée. Inversement, si la quantité de RF2 est faible, la pause du ribosome sera plus longue, augmentant les chances de déphasage. Dans ces conditions, l'ARNt^{Leu} situé au site P se dissocie de l'ARNm et se réapparie dans le cadre de lecture +1. La traduction se poursuit dans ce cadre de lecture, produisant le facteur RF2 (Baranov et al. 2002).

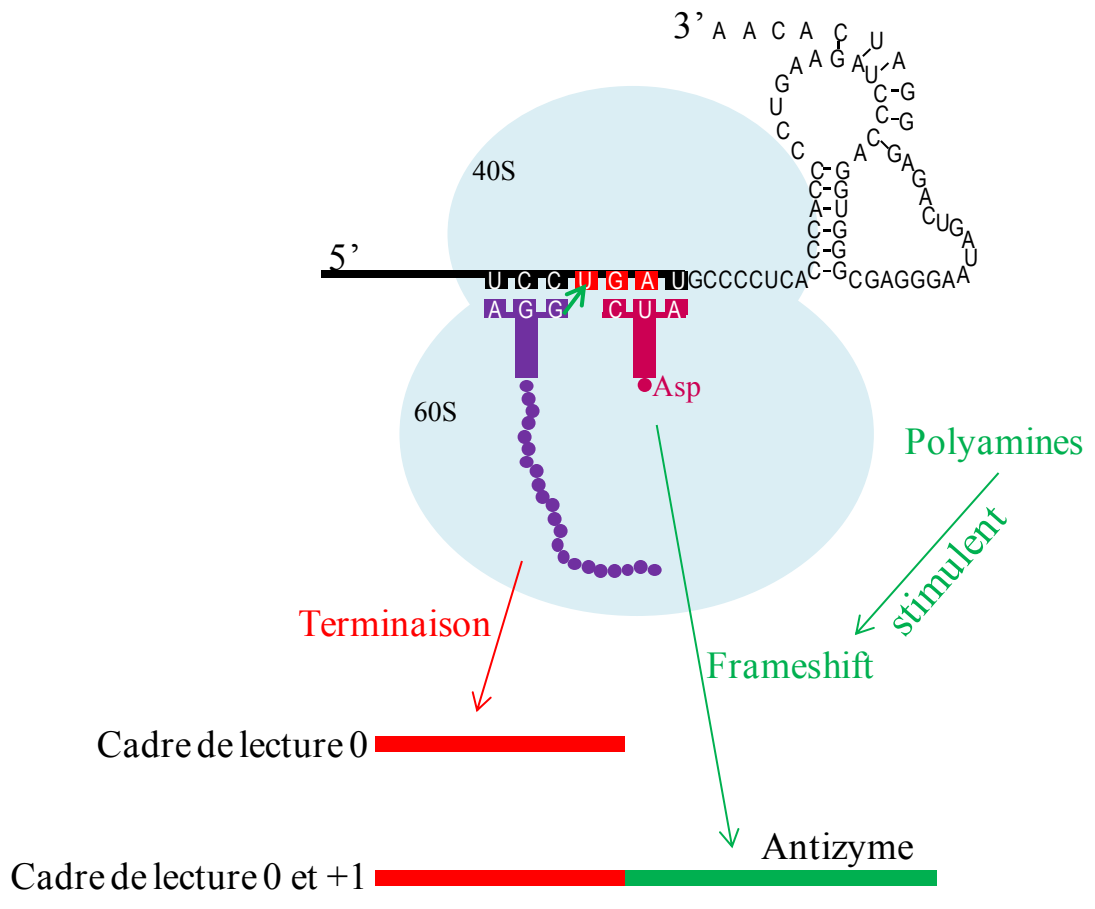
Un autre exemple de déphasage +1, qui est rencontré chez les eucaryotes comme les mammifères, la drosophile et les levures, est la régulation de la synthèse des polyamines

par l'antizyme. Les polyamines sont des polycations qui interviennent dans plusieurs processus comme la division cellulaire, le cancer et le vieillissement. Les cellules contrôlent leur production de polyamines en agissant sur une enzyme essentielle de leur biosynthèse, l'ornithine décarboxylase (ODC). Elles contrôlent en fait la quantité d'ODC en modulant la traduction de l'antizyme de l'ODC, c'est-à-dire l'enzyme qui est responsable de la dégradation de l'ODC. L'ARNm de cet antizyme contient un codon de terminaison au début de la région codante. Pour que l'antizyme soit produit, il faut qu'il y ait un déphasage +1 au niveau de ce codon. L'efficacité de ce déphasage +1 est dépendante de la présence des polyamines. Un pseudonœud situé 3 nt en aval de la séquence glissante, UCC U, contribue à induire la pause essentielle au déphasage +1 (Figure 1-19). Le site A étant occupé par un codon de terminaison, l'ARNt au site P se dissocie de l'ARNm et se réapparie dans le cadre de lecture +1. C'est la chaîne peptidique en croissance qui agit comme détecteur des polyamines. Si la concentration en polyamine est faible, cette chaîne adopte une conformation, dans le tunnel de sortie, qui bloque la traduction. L'antizyme n'est alors pas traduit. Inversement, en présence d'une forte concentration de polyamines, la traduction a lieu. L'antizyme entraîne alors la dégradation de l'ODC et il y a diminution de la production des polyamines. Comme dans le cas de RF2, il s'agit d'un phénomène d'autorégulation (revue par Ivanov et al. 2000; Mangold 2005; Kurian et al. 2011).

1.6.3.2 Le changement de cadre de lecture -1 (déphasage -1)

Le changement de cadre de lecture en -1 (déphasage -1), tout comme le déphasage +1, permet la production protéique dans deux cadres de lectures se chevauchant sur un même ARNm. Mais alors qu'avec le déphasage +1, une des deux protéines est un court peptide non fonctionnel, dans le cas du déphasage -1, les deux protéines ont un rôle à jouer. Les deux cadres de lecture contiennent un codon de terminaison, alors que seul le premier cadre contient un codon d'initiation. La première protéine est traduite dans le cadre de lecture 0 selon les règles de traduction conventionnelle. La traduction de la deuxième protéine débute au même codon initiateur que la première. Cette deuxième protéine est traduite en suivant les règles conventionnelles de traduction jusqu'au site de déphasage. Il y

Figure 1-19 : Modèle de déphasage +1 lors de la traduction de l'ARNm codant pour l'antizyme de l'ornithine décarboxylase (ODC). Lorsque le ribosome rencontre le pseudonœud, il effectue une pause, ce qui peut permettre à l'ARNt au site P de se dissocier de l'ARNm et de se réappairier dans le cadre de lecture +1. Si cela se produit, la traduction se poursuit alors dans le cadre de lecture +1, ce qui permet la production de l'antizyme. Ce déphasage +1 est stimulé par la présence d'une grande concentration de polyamines, mais inhibé en absence de polyamines (adaptée de Baranov et al. 2001).

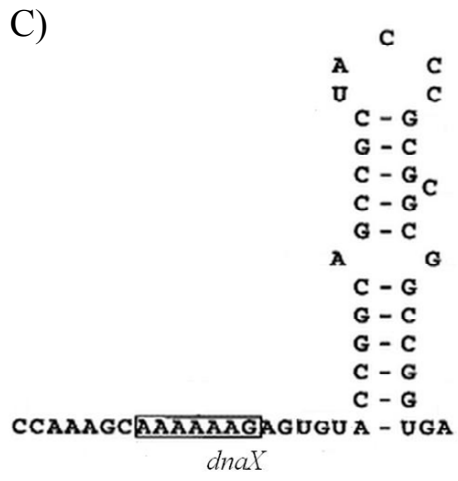
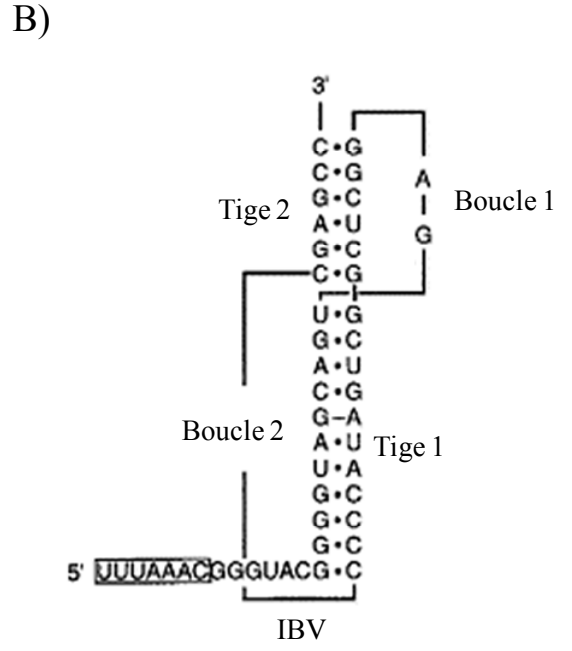
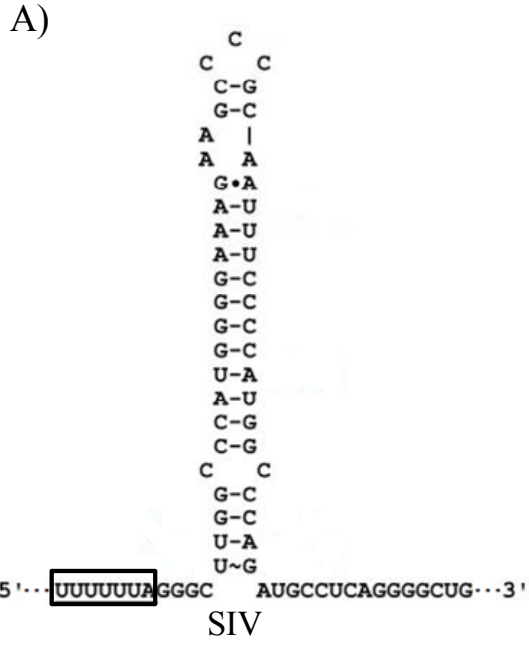


a alors un changement de cadre de lecture pour un petit nombre de ribosomes qui poursuivent alors la traduction dans le cadre de lecture -1, ce qui entraîne la production d'une protéine de fusion, dont le début, jusqu'au site de déphasage, est identique à la protéine produite dans le cadre de lecture 0.

L'évènement de déphasage programmé -1 nécessite deux éléments en *cis* de l'ARNm pour se produire. Le premier élément est une séquence glissante où le changement de cadre de lecture s'effectue. Elle est composée de sept nucléotides suivant le modèle X XXY YYZ; les espaces indiquant le cadre de lecture 0. Chez les eucaryotes, X correspond à n'importe quel nucléotide, Y correspond à A ou U et Z correspond à A, C ou U. Chez les procaryotes, Z peut également être un G. Une vision simplifiée du processus montre que les ARNt se désappariaient de l'ARNm et qu'ils reculent d'une base avec le ribosome avant de se réappairer dans le cadre de lecture -1. La séquence glissante a la particularité de permettre de maintenir au moins deux appariements sur trois à la suite du changement de cadre de lecture.

Le second élément est une structure d'ARNm, appelée signal stimulateur de déphasage (SSF) (revue par Brierley and Pennell 2001). La position optimale pour les SSF est à 8 nt en aval de la séquence glissante, ce qui les positionne là où est localisée l'activité hélicase du ribosome, tel qu'établi par le groupe de Noller (Takyar et al. 2005). La présence d'un SSF est nécessaire pour qu'un évènement de déphasage -1 se produise. Cette structure entraîne une pause des ribosomes traduisant l'ARNm. Cette pause est nécessaire, mais non suffisante pour que les ribosomes effectuent un déphasage. Des interactions spécifiques entre le SSF et le ribosome favoriseraient le déphasage. En effet, la substitution du SSF du coronavirus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) par une tige-boucle de même stabilité, causant aussi une pause des ribosomes, diminue l'efficacité de déphasage. Des interactions spécifiques entre le ribosome et un SSF pourraient stabiliser celui-ci ou perturber l'activité hélicase du ribosome. Suite à l'interaction avec un SSF, le ribosome défait la structure de ce signal afin de poursuivre la traduction. Le groupe de Brierley (Namy et al. 2006) a d'ailleurs démontré, en utilisant une technique de cryo-EM, que le SSF de IBV interagit avec les protéines hélicases du ribosome.

Figure 1-20 : Exemple de région de déphasage -1 (A) du virus de l'immunodéficience simienne (SIV) (Marcheschi et al. 2009), (B) du coronavirus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) (Brierley 1995) et (C) du gène *dnaX* d'*Escherichia coli* (Larsen et al. 1997). Les séquences glissantes ont été encadrées.



Nous présenterons plus loin le mécanisme du déphasage -1, avec l'exemple du VIH-1. Une remarque que nous voulons faire ici est qu'un petit nombre de ribosomes effectuent un déphasage, qu'il soit +1 ou -1. Une possibilité est que la population de ribosomes est hétérogène et qu'une minorité de ribosomes diffère du reste suite à des modifications post-transcriptionnelles de l'ARN ou post-traductionnelles des protéines ribosomiques (voir Gilbert 2011). Une autre possibilité est que le SSF existe sous deux conformations, l'une permettant le déphasage, l'autre non, comme nous l'avons vu pour le pseudonœud de MLV lors de la translecture (voir section 1.6.1) (Houck-Loomis et al. 2011). Cette possibilité n'a toutefois pas été confirmée pour le VIH-1.

1.6.3.3 Quelques exemples de déphasage -1

Le déphasage -1 est utilisé par plusieurs rétrovirus afin de produire le précurseur de leurs protéines structurales, Gag, et le précurseur de leurs enzymes, Pol, dans des proportions optimales à leur réplication (voir section 1.6.4.3). Certaines protéines cellulaires sont également produites grâce à un déphasage -1. Le premier cas de déphasage -1 a été identifié par Jacks et Varmus (1985; 1988a) chez le rétrovirus du sarcome de Rous (RSV). Depuis, des déphasages -1 ont été identifiés chez plusieurs rétrovirus : le VIH-1 (Jacks et al. 1988b), le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) (Marcheschi et al. 2007), le virus de l'immunodéficience féline (Morikawa and Bishop 1992) et le virus de tumeurs mammaires de souris (Hizi et al. 1987); chez plusieurs coronavirus : IBV (Brierley et al. 1991) et le virus du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) (Baranov et al. 2005); chez des gènes bactériens : *dnaX* (Tsuchihashi and Brown 1992); ainsi que chez des gènes humains : l'antigène paranéoplasique Ma3 (Wills et al. 2006) et *PEG10* (*paternally expressed gene 10*) (Clark et al. 2007) (Figure 1-20).

Les gènes humains utilisant un déphasage lors de leur expression semblent être dérivés de rétrovirus. Par exemple, le gène *PEG10* contient deux cadres de lecture se chevauchant et ayant des structures semblables à celles de *gag* et *gag-pol*, deux gènes communs aux rétrovirus. La région LTR, la région codant pour l'intégrase et la majorité de la région codant pour la transcriptase inverse sont absentes de *PEG10*. Le déphasage -1 permet la production d'une région codant pour une protéase qui joue un rôle essentiel lors

du développement de l'être humain (Clark et al. 2007). Chez l'adulte, *PEG10* est exprimé dans les ovaires, les testicules et plusieurs autres tissus, dont le cerveau. On ignore son rôle, mais il pourrait être impliqué dans l'apparition de cancers (Lux et al. 2010).

1.6.4 Le changement de cadre de lecture -1 (déphasage -1) chez le VIH-1

Chez le VIH-1, le précurseur des protéines de structure Gag et le précurseur des enzymes virales Pol sont tous deux produits à partir de l'ARNm viral pleine-longueur (voir sections 1.3.1 et 1.3.2). Sur cet ARNm, les séquences codant pour ses précurseurs se chevauchent sur une courte région d'environ 200 nt, mais dans deux cadres de lecture différents. Le précurseur Gag est exprimé en suivant les règles conventionnelles d'élongation de la traduction. La traduction de la région Pol, qui ne possède pas de codon initiateur, nécessite un déphasage -1. Ce genre de reprogrammation a été décrit pour la première fois par le groupe de Varmus (Jacks and Varmus 1985). L'efficacité de déphasage -1 gère le rapport entre les protéines structurales et les enzymes du VIH-1. Le déphasage -1 se produit pour environ 10 % des ribosomes dans des cellules en culture, mais ce chiffre varie dépendamment du système utilisé pour le mesurer (Harger and Dinman 2003; Dulude et al. 2006).

1.6.4.1 Structures nécessaires au déphasage -1 du VIH-1

Tel que mentionné à la section 1.6.3.2, deux éléments en *cis* de l'ARNm sont nécessaires pour qu'un déphasage programmé -1 se produise (Figure 1-21). Le premier élément nécessaire au déphasage programmé -1 est une séquence glissante de sept nucléotides suivant le modèle X XXY YYZ décrit plus haut. Chez le VIH-1, il s'agit de la séquence U UUU UUA (les espaces indiquant le cadre de lecture 0). Une comparaison de séquences de 1000 variants du VIH-1 montre que la séquence glissante est parfaitement conservée (Biswas et al. 2004). La nature des trois nucléotides précédant la séquence glissante affecte également l'efficacité de déphasage -1 (Léger et al. 2007).

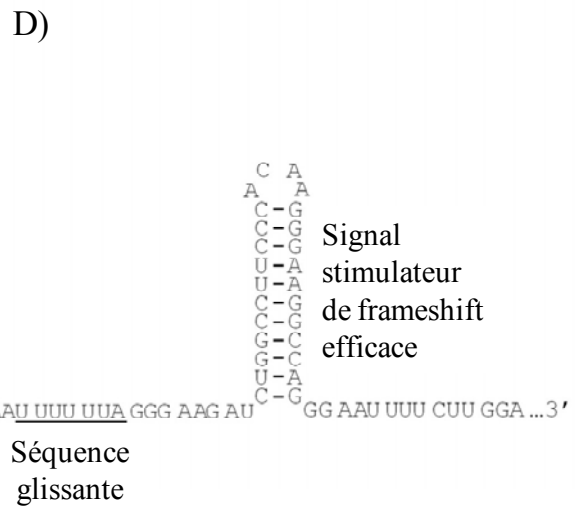
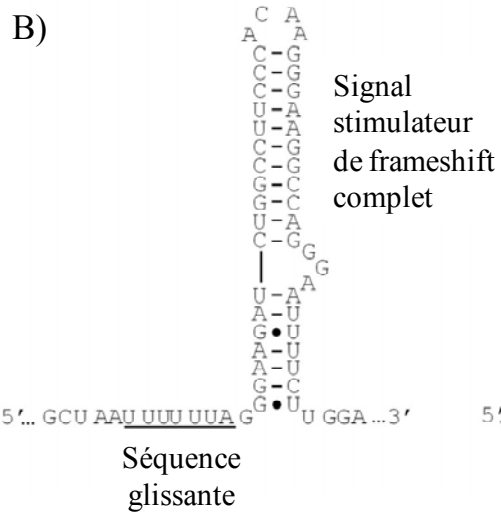
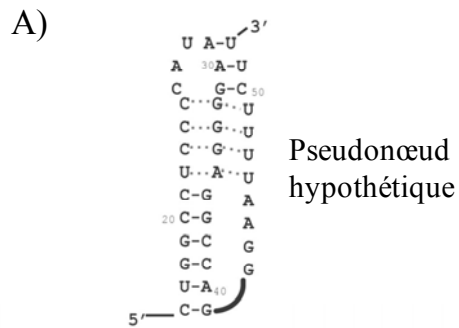
Le deuxième élément nécessaire afin que les ribosomes effectuent un déphasage -1 est le SSF. Dans le cas du VIH-1, deux structures furent proposées : un pseudonœud (Dinman et al. 2002), déterminé par analyse de séquences et digestion de nucléases

spécifiques (*nuclease mapping*) (Figure 1-21A), et une tige-boucle irrégulière (Dulude et al. 2002), déterminée par analyse de séquences, mutagenèse et analyse de la réactivité à des agents chimiques et des nucléases (Figure 1-21B). La structure de la tige-boucle irrégulière fut ensuite confirmée par résonance magnétique nucléaire (RMN) (Figure 1-21C) (Gaudin et al. 2005; Staple and Butcher 2005). Le SSF est constitué de deux tiges séparées par une excroissance (*bulge*) asymétrique composée de trois purines. Le SSF complet est séparé de la séquence glissante par un nucléotide, mais la tige du bas se déroule facilement et c'est la tige du haut qui constitue le SSF efficace (Figure 1-21D). La tige du bas favoriserait un premier contact entre le ribosome et la tige-boucle du haut du SSF. La tige du bas est peu stable et elle est donc aisément déroulée. Après un premier contact avec le SSF, le ribosome déroule la tige du bas et progresse le long de l'ARNm jusqu'à ce que le premier codon de la séquence glissante dans le cadre de lecture 0, du côté 5', se retrouve au site A (voir section 1.6.4.2). La tige-boucle du haut, le SSF efficace, se trouve alors 11 nt en aval de la séquence glissante, au site hélicase du ribosome. La tige du haut est beaucoup plus stable que celle du bas, et le ribosome prend un certain temps pour la défaire.

Un modèle intéressant, mais encore hypothétique, a été proposé par Léger et al. (2007) pour expliquer le déroulement du déphasage programmé -1. Selon ce modèle, pour un petit nombre de ribosomes, la translocation de l'ARNm est incomplète, se déplaçant de deux nucléotides au lieu de trois. Cette translocation incomplète se produit lorsque le site A est occupé par le premier codon de la séquence glissante (UUU) et le site P par le codon précédent la séquence glissante (AAU). Elle résulte du fait que l'ARNm est bloqué à l'entrée du ribosome par le SSF, car le ribosome n'a pas réussi à défaire le SSF suffisamment pour permettre une translocation complète. La section suivante présente ce modèle.

Figure 1-21 : La région de déphasage du VIH-1. La séquence glissante est soulignée.

A) Structure hypothétique en pseudonœud du SSF complet du VIH-1 déterminée par Dinman et al. (2002). B) Le SSF complet du VIH-1 est une tige-boucle irrégulière avec une boucle asymétrique composée de trois purines séparant la tige du haut de la tige du bas. C) Structure du SSF complet déterminée par RMN. D) La tige du bas est peu stable et facile à dérouler par les ribosomes alors que la tige du haut, qui constitue le SSF efficace, résiste à l'activité hélicase du ribosome (adapté de Brakier-Gingras and Dulude 2010).

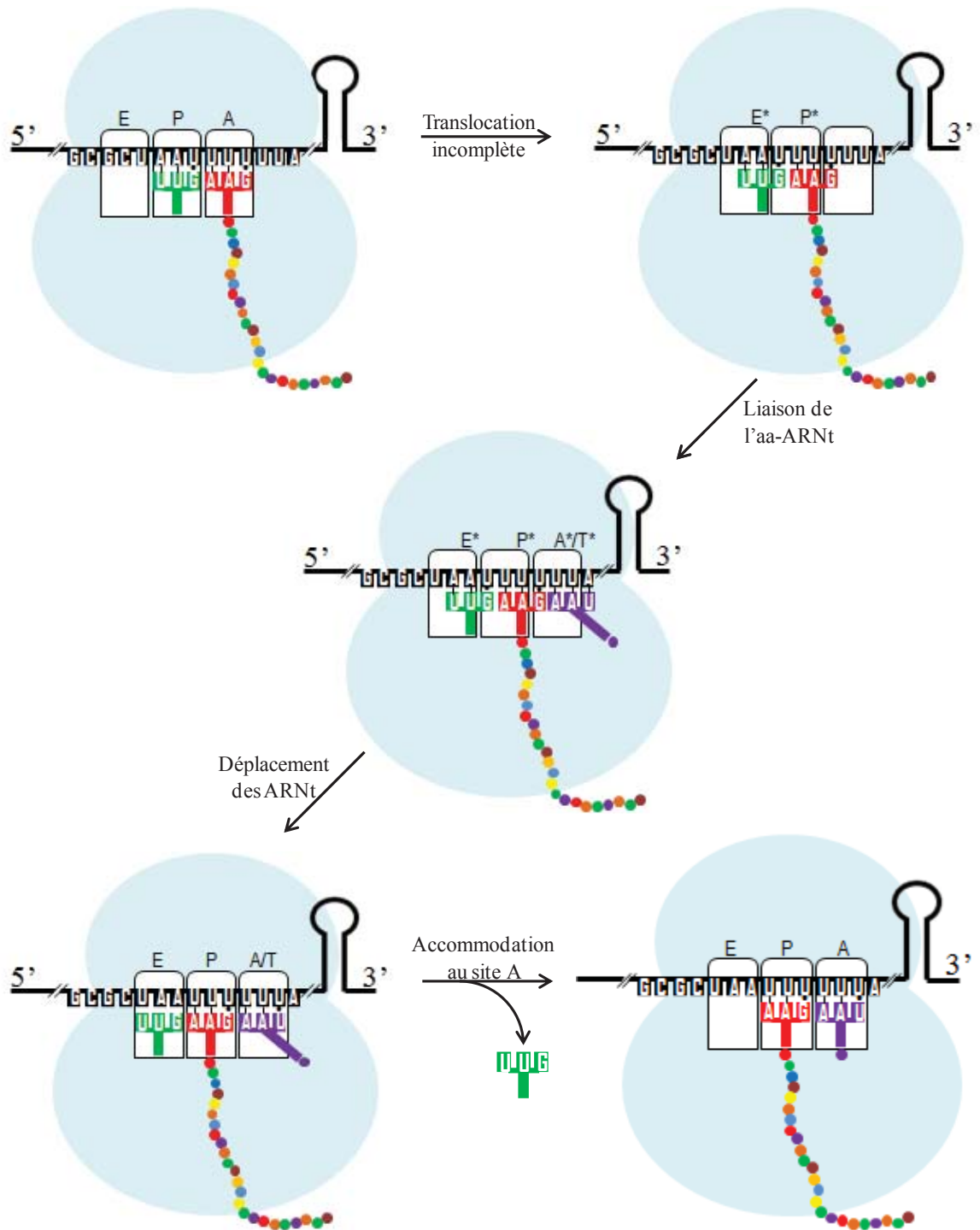


1.6.4.2 Description de l'événement du déphasage -1 du VIH-1

La séquence des événements menant au déphasage -1 du VIH-1 (Figure 1-22) commence quand les codons AAU UUU (cadre de lecture 0) occupent respectivement les sites P et A du ribosome, c'est-à-dire au cycle précédent l'occupation des sites P et A par la séquence glissante. Après la formation du lien peptidique, le deac-ARNt et le peptidyl-ARNt des sites P et A sont engagés dans le processus de translocation. Les tiges acceptrices des ARNt se déplacent spontanément vers les sites E et P sur la sous-unité 60S du ribosome. La translocation continue avec la liaison du facteur eEF2 associé au GTP et l'hydrolyse de ce GTP, ce qui permet le déplacement des tiges-boucles anticodon entraînant l'ARNm et se déplaçant de trois nucléotides. Pour un petit nombre de ribosomes, les ARNt se déplacent dans les sites intermédiaires E*/E* et P*/P* (* indique des sites différents des sites traditionnels), à cause d'une translocation incomplète. Dans ce cas, l'ARNm se déplace uniquement de deux nucléotides parce que le SSF résiste à l'hélicase du ribosome. Un ARNt^{Leu} lié à eEF1A•GTP va ensuite tenter d'occuper le site d'entrée A/T. La translocation incomplète a comme conséquence que ce nouvel aa-ARNt occupe un site d'entrée A*/T* intermédiaire, déplacé par rapport au site A/T standard.

Les interactions codon-anticodon sont dynamiques et se brisent puis se reforment. Le modèle de Léger et al. (2007) propose que les ARNt localisés dans les sites intermédiaires se repositionnent dans les sites standards. Pour ce faire, ils se désappariaient de l'ARN et se réappariaient alors dans le cadre de lecture -1. C'est donc la tendance des ARNt à occuper leurs sites standards de liaison sur le ribosome qui est le moteur du déphasage. Par ailleurs, le mouvement des ARNt n'est probablement pas simultané, mais séquentiel. Le déplacement commencerait avec l'ARNt situé dans le site E*/E*, suivi de celui au site P*/P*, puis de celui au site A*/T*. Suite à ce repositionnement, il y a éjection de l'ARNt situé au site E et accommodation de l'aa-ARNt dans le site A/A. La traduction va alors se poursuivre dans le cadre de lecture -1 à la suite du déroulement du SSF par l'hélicase du ribosome.

Figure 1-22 : L'événement de déphasage du VIH-1 est initié par une translocation incomplète due à la présence du SSF. Cette translocation incomplète se produit lorsque le site A est occupé par le premier codon de la séquence glissante (UUU) et que le site P est occupé par le codon précédant la séquence glissante (AAU). Le signal oppose une résistance au mouvement de l'ARNm. Les ARNt aux sites P et A se déplacent seulement de deux nucléotides au lieu de trois lors de la translocation et ils occupent alors des sites intermédiaires (E*/E* et P*/P*). L'aa-ARNt qui tente de se lier au site d'entrée A/T se retrouve aussi dans un site intermédiaire (A*/T*). Les trois ARNt vont ensuite se déplacer afin d'occuper les sites traditionnels du ribosome. Il y a éjection de l'ARNt déchargé du site E et accommodation de l'aa-ARNt au site A. La traduction se poursuit alors dans le cadre de lecture -1 (adapté de Léger et al. 2007). Il faut noter que dans ces conditions de translocation incomplète, l'ARNt déchargé au site E quitterait le ribosome lors de l'accommodation de l'aa-ARNt au site A (comme suggéré par Uemura et al. 2010).



1.6.4.3 L'importance du rapport Gag-Pol/Gag

La traduction de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 permet la production de deux précurseurs essentiels pour la réplication du VIH-1 : Gag (par traduction conventionnelle) et Gag-Pol (suite à un déphasage -1). Le rapport Gag-Pol/Gag est important pour l'assemblage et la maturation des virions. Plusieurs études suggèrent que ce rapport devrait être constant pour une réplication optimale du virus. Dinman et Wickner (1992) ont été parmi les premiers à analyser l'effet de changements de l'efficacité de déphasage sur la réplication du virus L-A de la levure. Les auteurs concluent qu'une variation du déphasage -1 affecte la réplication virale, cependant, leurs résultats montrent que ce virus supporte une efficacité de déphasage variant entre 1,3 % et 3,5 % sans que cela affecte sa réplication. Des études avec le VIH-1 ont ensuite montré qu'une diminution de 30 à 60 % de l'efficacité de déphasage due à des mutations de la séquence glissante ou du SSF chez des variants naturels (Telenti et al. 2002) ou chez des mutants faits en laboratoire (Dulude et al. 2006) handicape sévèrement la réplication du virus. Le groupe de Mak (Shehu-Xhilaga et al. 2001) a étudié l'effet d'une augmentation du rapport Gag-Pol/Gag sur la réplication du VIH-1. Ils ont cotransfecté des cellules en culture avec le génome viral et un vecteur exprimant Gag-Pol, ce qui leur a permis de tester artificiellement plusieurs rapports Gag-Pol/Gag. Ils ont ainsi démontré qu'une augmentation de quatre fois du rapport de Gag-Pol/Gag interfère avec la réplication virale. Ils suggèrent que cette interférence est reliée à un problème de dimérisation de l'ARNg du virus. Par ailleurs, deux études ont montré qu'une augmentation de l'efficacité de déphasage de deux fois (obtenue à l'aide de sparsomycine, un inhibiteur de la traduction qui se lie au ribosome (Miyachi et al. 2006) ou avec un dérivé hybrazide (Dulude et al. non publié), qui se lie probablement aussi au ribosome) n'interfère pas avec la réplication virale et, au contraire, la stimule. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la quantité de Gag-Pol est limitante à l'étape d'assemblage du virion. Par contre, aucun changement n'a été observé dans la proportion de Gag-Pol/Gag dans les virions produits lors de ces différentes études. Ces résultats suggèrent que la réplication du VIH-1 tolère une fenêtre de valeurs d'efficacité de déphasage.

Puisque le VIH-1 développe une résistance aux agents utilisés pour traiter les patients, il est important de trouver de nouvelles cibles pour le développement d'agents anti-VIH-1. L'événement de déphasage -1 est une cible intéressante pour le développement d'agents anti-VIH-1, mais les observations rapportées ci-dessus démontrent l'importance d'altérer suffisamment l'efficacité de déphasage afin de sortir de la fenêtre d'efficacité acceptables pour le virus.

1.7 Description du projet de recherche

Le VIH-1 utilise un déphasage -1 lors de l'étape d'élongation de la traduction de son ARNm pleine-longueur afin de produire Gag-Pol, le précurseur de ses enzymes virales. Il est essentiel pour les ribosomes de rencontrer le SSF afin d'effectuer un déphasage. En effet, l'efficacité de déphasage est contrôlée par la rencontre des ribosomes avec le SSF, qui est déroulé lors du passage d'un ribosome et qui peut se reformer ensuite. La première partie de mon projet de recherche a consisté à déterminer l'impact de l'étape d'initiation de la traduction sur l'efficacité de déphasage. Pour ce faire, nous avons utilisé un rapporteur dual-luciférase standard contenant les gènes codant pour les luciférases de la *Renilla* (Rluc) et de la luciole (Fluc) séparés par la région de déphasage du VIH-1. Les vecteurs utilisés sont construits de façon à ce que la Rluc soit exprimée par tous les ribosomes traduisant l'ARNm rapporteur, alors que seuls les ribosomes effectuant un déphasage à la région de déphasage du VIH-1 produisent la Fluc. La Fluc est exprimée sous forme d'une protéine de fusion Rluc-Fluc. Des cellules en culture (Jurkat-T et HEK 293T) ont été transfectées par ces rapporteurs luciférases. Ces cellules ont ensuite été traitées avec des inhibiteurs de l'étape d'initiation de la traduction. Nous avons observé qu'une diminution du taux d'initiation de la traduction augmente l'efficacité de déphasage. Puisque la tige-boucle TAR affecte l'initiation de la traduction coiffe-dépendante en modulant l'activité de PKR, nous avons voulu ensuite déterminer si cet effet de TAR change l'efficacité de déphasage. Pour ce faire, nous avons ajouté TAR en *cis*, à une distance d'au moins 40 nt de l'extrémité 5', ou en *trans* du rapporteur dual-luciférase. En procédant de la sorte, nous évitons l'effet de TAR sur la liaison des 40S à l'ARNm qui requiert que TAR soit localisée à l'extrémité 5'. Nos résultats montrent que, dans ces conditions où l'effet de TAR sur l'initiation de la

traduction est médié par PKR, le taux d'efficacité de déphasage du VIH-1 est inversement proportionnel aux changements du taux d'initiation causés par TAR. Les résultats de ce premier article (Chapitre 2) nous ont permis de présenter un modèle dans lequel le taux d'initiation de la traduction affecte l'efficacité de déphasage en modulant la distance entre les ribosomes traduisant l'ARNm. Cette distance contrôlerait le temps dont dispose le SSF pour se reformer entre le passage des ribosomes, influençant ainsi la probabilité de rencontre entre le ribosome et le SSF (Gendron et al. 2008).

Nous avons démontré l'effet de variations du taux d'initiation de la traduction sur le déphasage -1 du VIH-1 en utilisant un ARNm ayant une 5'UTR courte et peu structurée. Cependant, la 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 est longue, très structurée et contient un IRES. La traduction de cet ARNm peut être initiée via un mode coiffe-dépendant ou IRES-dépendant puisqu'il possède les éléments nécessaires à ces deux modes d'initiation de la traduction. La deuxième partie de mon projet de recherche a consisté à déterminer l'impact de cette 5'UTR sur l'efficacité de déphasage dans le but d'avoir une situation mimant la situation rencontrée par les ribosomes traduisant l'ARNm pleine-longueur du VIH-1. Pour ce faire, nous avons modifié le rapporteur dual-luciférase standard en remplaçant la région 5'UTR de l'ARNm rapporteur de cette construction par différentes régions 5'UTR dérivées de celle de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 : la région 5'UTR complète, la région 5'UTR dépourvue de la région TAR-Poly(A), mais contenant l'IRES, et, enfin, uniquement la région TAR-Poly(A). Une quatrième construction a été faite où les ribosomes expriment le rapporteur dual-luciférase uniquement s'ils utilisent l'IRES. Des cellules en culture (Jurkat-T et HEK 293T) ont été transfectées avec ces différents rapporteurs. Nous avons observé que la présence de la 5'UTR complète diminue le taux d'initiation de la traduction et que cela entraîne une augmentation de l'efficacité de déphasage. Cet effet est en fait dû à la présence de la région TAR-Poly(A) qui entraîne une diminution du taux d'initiation de la traduction similaire à celle de la 5'UTR complète. Son effet sur l'efficacité de déphasage est aussi similaire à celui obtenu avec la 5'UTR complète. La présence d'une 5'UTR longue et structurée sans TAR-Poly(A) à l'extrémité 5' entraîne une diminution du taux d'initiation de la traduction qui est cependant moins importante que celle provoquée lorsque TAR-Poly(A) est présent à

l'extrémité 5' de l'ARNm. L'augmentation de l'efficacité de déphasage est proportionnelle à la diminution du taux d'initiation de la traduction. Lorsque les rapporteurs dual-luciférase sont traduits via le mode IRES-dépendant, le taux d'initiation de la traduction est faible, mais l'efficacité de déphasage est faible aussi, contrairement à la situation observée avec les autres rapporteurs où un faible taux d'initiation s'accompagne d'une forte efficacité de déphasage. Cette situation peut s'expliquer par la dynamique de la rencontre des ribosomes avec l'IRES. Par la suite, nous avons étudié, avec nos constructions dual-luciférase, l'impact de la protéine Tat sur l'efficacité de déphasage du VIH-1. Une controverse existait à savoir si cette protéine peut contrer l'effet de TAR sur l'initiation de la traduction coiffe-dépendante. Nos résultats (Chapitre 3) démontrent que la présence de la protéine Tat contrecarre l'effet de TAR sur l'efficacité de déphasage et sur le taux d'initiation de la traduction de façon dose-dépendante. Ces résultats nous ont conduits à proposer un modèle expliquant l'effet de la région 5'UTR et de Tat sur l'efficacité de déphasage (Charbonneau et al. 2012).

Chapitre 2

Gendron K, Charbonneau J, Dulude D, Heveker N, Ferbeyre G, Brakier-Gingras L. 2008. The presence of the TAR RNA structure alters the programmed -1 ribosomal frameshift efficiency of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by modifying the rate of translation initiation. *Nucleic Acids Res* 36: 30-40.

Les expériences de transfection (HEK 293T et Jurkat-T), d'inhibition de l'initiation de la traduction et d'immunobuvardage de type Western, ainsi que les mesures d'activité luciférase à partir des rapporteurs permettant d'évaluer l'efficacité du frameshift, ont toutes été effectuées en parallèle par Karine Gendron et moi. J'ai également fait les expériences d'infection qui sont présentées en données supplémentaires. En ce qui concerne la rédaction, j'ai participé à la rédaction des différentes sections et à la correction du manuscrit.

The presence of the TAR RNA structure alters the programmed -1 ribosomal frameshift efficiency of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by modifying the rate of translation initiation

Karine Gendron¹, Johanie Charbonneau¹, Dominic Dulude², Nikolaus Heveker^{1,2}, Gerardo Ferbeyre^{1*} and Léa Brakier-Gingras^{1*}

¹ Département de biochimie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3T 1J4

² Centre de recherche, Hôpital Ste-Justine, Montréal, Québec, Canada, H3T 1C5

Nucleic Acids Research, January 2008, Vol. 36, p.30-40

*Corresponding authors:

Gerardo Ferbeyre and Léa Brakier-Gingras

Département de biochimie, Université de Montréal,

2900, Blvd Édouard-Montpetit,

Montréal, Québec, Canada, H3T 1J4

ABSTRACT

HIV-1 uses a programmed -1 ribosomal frameshift to synthesize the precursor of its enzymes, Gag-Pol. The frameshift efficiency that is critical for the virus replication, is controlled by an interaction between the ribosome and a specific structure on the viral mRNA, the frameshift stimulatory signal. The rate of cap-dependent translation initiation is known to be altered by the TAR RNA structure, present at the 5' and 3' end of all HIV-1 mRNAs. Depending upon its concentration, TAR activates or inhibits the double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR). We investigated here whether changes in translation initiation caused by TAR affect HIV-1 frameshift efficiency. CD4⁺ T cells and 293T cells were transfected with a dual-luciferase construct where the firefly luciferase expression depends upon the HIV-1 frameshift. Translation initiation was altered by adding TAR in cis or trans of the reporter mRNA. We show that HIV-1 frameshift efficiency correlates negatively with changes in the rate of translation initiation caused by TAR and mediated by PKR. A model is presented where changes in the rate of initiation affect the probability of frameshifting by altering the distance between elongating ribosomes on the mRNA, which influences the frequency of encounter between these ribosomes and the frameshift stimulatory signal.

Keywords: HIV-1, ribosomal frameshift, translation initiation, TAR, PKR.

INTRODUCTION

The precursor of HIV-1 structural proteins, Gag, and the precursor of the viral enzymes, Pol, are translated from the full-length viral messenger RNA (mRNA). Gag is produced by conventional translation whereas Pol requires a programmed -1 ribosomal frameshift during the elongation step of translation, which generates the fusion protein Gag-Pol (Jacks et al. 1988b; reviewed in Brierley and Pennell 2001; Brierley and Dos Ramos 2006). Previous studies showed that a 2- to 20-fold increase in the Gag-Pol to Gag ratio prevents viral infectivity (Park and Morrow 1991; Karacostas et al. 1993; Hung et al. 1998; Shehu-Xhilaga et al. 2001) and our group showed that a decrease in the frameshift efficiency as low as 30% severely impairs the replication of the virus in cultured cells (Dulude et al. 2006). The Gag-Pol to Gag ratio is therefore critical for viral infectivity and the programmed -1 frameshift that determines this ratio represents an interesting target for the development of novel antiretroviral agents against HIV-1.

The HIV-1 frameshift event requires two cis-acting elements in the viral mRNA: a slippery sequence, UUUUUUA, where the frameshift occurs (Jacks et al. 1988b; reviewed in Brierley and Pennell 2001; Brierley and Dos Ramos 2006), followed by an irregular stem-loop (Dulude et al. 2002; Gaudin et al. 2005; Staple and Butcher 2005), the frameshift stimulatory signal, that makes the ribosomes pause over the slippery sequence and controls the frameshift efficiency. Only a fraction of the ribosomes that encounter the stimulatory signal make a frameshift. After the pause, the ribosomes unfold the signal, which can reform after their passage.

HIV-1 can use a cap-dependent mechanism to initiate translation of its mRNAs, like most eukaryotic mRNAs (for a review on translation initiation, see Poulin and Sonenberg 2003; Gebauer and Hentze 2004; Clemens 2005; Pestova et al. 2007). There are two major control steps in eukaryotic cap-dependent translation initiation (see details in Figure 2-1A). One is the binding of the initiator tRNA, Met-tRNAⁱ Met, to the 40S ribosomal subunit, which requires the participation of the initiation factor 2 (eIF2) associated to GTP. The other one is the binding of the 40S subunit bearing the ternary complex to the 50 cap structure of the mRNA, which is controlled by the eIF4F complex. Double-stranded RNA

(dsRNA), such as the TAR RNA structure, can modify the rate of translation initiation. TAR, the transactivation response element, is a 59-nt stem-bulge-loop structure present at the 5' and 3' end of all HIV-1 mRNAs in the nucleus and the cytoplasm (reviewed in Bannwarth and Gagnol 2005). It is also present under a free form of 58-66 nt in the cytoplasm of cells infected with the virus (Gunnery et al. 1992; Kessler and Mathews 1992). In the nucleus, TAR mediates transcription activation by binding to the viral Tat protein and the cellular cyclinT protein (Gagnol and Jeang 2000; Marcello et al. 2001). In the cytoplasm, a low concentration of TAR activates PKR, the dsRNA-dependent protein kinase, whereas a higher concentration of TAR inhibits this kinase by blocking its dimerization, which is essential for its activity (reviewed in Dever et al. 2007). When PKR is activated, it phosphorylates the α subunit of eIF2, interfering with translation initiation, whereas, when it is inhibited, the amount of eIF2 phosphorylated decreases and the rate of translation initiation increases.

In this study, we investigated whether the presence of TAR affects HIV-1 frameshift efficiency in relationship with the changes it causes in the rate of cap-dependent translation initiation. To this end, we used a dual-luciferase construct (see Dulude et al. 2006) which expresses the Renilla luciferase (Rluc) and the firefly luciferase (Fluc) separated by HIV-1 frameshift region as a fusion protein. Rluc is expressed following conventional rules of translation whereas Fluc expression requires a -1 frameshift in the HIV-1 frameshift region. This type of construct is adapted from Grentzmann et al. (1998), who pioneered the use of a dual-luciferase reporter for studying recoding signals. CD4⁺ T cells (Jurkat) or 293T cells were transfected with the dual-luciferase plasmid and TAR was added either in cis or in trans of the reporter mRNA. Several conditions were assayed to characterize the effect of TAR on frameshift efficiency and the involvement of PKR in this effect, such as the introduction of a small or a large amount of TAR in the cells, the use of mutants of TAR that cannot perturb PKR activity and the silencing of PKR expression with short interfering RNA (siRNA).

Our results show that HIV-1 frameshift efficiency increases at a low concentration of TAR, when cap-dependent translation initiation is slowed down, whereas it decreases at a high concentration of TAR, when translation initiation is stimulated. These effects were shown to be dependent on PKR. A model is presented which relates the effects of TAR on frameshift efficiency to changes in the spacing between the elongating ribosomes on the mRNA caused by changes in the rate of translation initiation. Such changes affect the frequency of encounter between the ribosomes and the frameshift stimulatory signal.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

To measure HIV-1 frameshift efficiency, we used the dual-luciferase reporters pDual-HIV(-1) and (0) (Dulude et al. 2006). These plasmids are derived from pcDNA3.1Hygro+ (Invitrogen) and contain the HIV-1 frameshift region inserted between the coding sequences of the Renilla luciferase (Rluc) and the firefly luciferase (Fluc). Expression of these genes is under control of a CMV promoter, which is followed by a T7 promoter. Plasmid pDual-HIV(0) differs from pDual-HIV(-1) by the addition of an adenine after the slippery sequence in the frameshift region. Derivatives of pDual-HIV(-1) and (0) were constructed where the TAR sequence was inserted after the CMV and T7 promoters. A TAR-containing fragment flanked with HindIII sites obtained from pcDNA3-RSV-TAR-Rluc plasmid (Dugre-Brisson et al. 2005), a kind gift from L. DesGroseillers (Université de Montréal), was cloned in the HindIII site of pDual-HIV to produce pDual-HIV-TAR(-1) and (0), where the TAR sequence is located at a distance of about 40 nt from the 50 end of the reporter mRNA. To produce pDual-HIV-50TAR(-1) and (0), where the TAR sequence is at a larger distance from the 50 end of the reporter mRNA, a cassette of a 50-nt non-coding sequence was inserted in the AflII site of pDual-HIV, followed by the insertion of TAR immediately after these 50 nt, in the HindIII site. The oligonucleotides for the cassette were cass50nt-fwd and cass50nt-rev (see the sequence of all the oligonucleotides used in this study in Table 1 of the Supplementary Data). Plasmid pTAR, which expresses the free TAR sequence in trans from the reporter mRNA, was made by inserting the TAR-containing fragment flanked with HindIII sites into the HindIII restriction site of

pcDNA3.1Hygro+. Derivatives of pTAR, pTARuucg* and pTAR Δ bulge*, which express mutants of TAR, were constructed by cloning oligonucleotide cassettes (cass_TAR-uucg* fwd and cass_TAR-uucg* rev or cass_TAR-bulge* fwd and cass_TAR-bulge* rev) between the two NheI restriction sites present in the TAR sequence of pTAR. In the first mutant, the upper loop, CUGGGA, is replaced with UUCG and, in the second mutant, the bulge UCU preceding the upper loop is deleted. Plasmid pCGNiC [a generous gift from N. Hernandez, Cold Spring Harbor Laboratory (Morrison et al. 1999)] expresses a mutant of the TAR-binding protein Tat (Tat*), named TatC30,31A.

Transfection of Jurkat and HEK 293T cells

Jurkat cells (CD4⁺ T cells) were maintained in RPMI 1640 medium (Wisent) supplemented with 10% (v/v) FBS (Wisent) and HEK 293T cells (human embryonic kidney cells transformed with adenovirus and simian virus 40 large-T) were maintained in DMEM (Gibco) supplemented with 10% (v/v) FBS. Transfections were performed with polyethylenimine (PEI) (Polysciences, Inc.) in six-well plates containing Jurkat cells (1.2×10^6), 293T cells (4.0×10^5) or 293T stable transfectants (6.0×10^5 cells) expressing a dual-luciferase HIV reporter (see subsequently). PEI was added drop-wise to serum-free medium and incubated 10 min at room temperature. In parallel, serum-free medium was added to DNA. The diluted PEI was added to the DNA solution (PEI to DNA ratio of 2:1) and incubated at least 15 min at room temperature. An empty plasmid, pcDNA3.1Hygro+, was added, when required, to maintain an equivalent DNA input.

Effect of translation inhibitors

Translation inhibitors were added as follows: rapamycin (Fisher), 16 h post-transfection (final concentration: 25 nM), hippuristanol (a generous gift from J. Pelletier, McGill University), 24 h before harvest (final concentration: 400 nM) and thapsigargin (Sigma), 4 h before harvest (final concentration: 300 nM). Transfected cells were harvested 48 h post-transfection. Non-adherent cells were centrifuged at 3000 g for 5 min, washed with PBS and lysed in 100 ml of Cell Passive Lysis Buffer (Promega). Adherent cells were washed with PBS and lysed in 400 ml of Cell Passive Lysis Buffer. Cell lysates were centrifuged 2 min at 13 000 g at 48C to remove cell debris, before luciferase assays.

Selection of stable 293T transfectants expressing a dual-luciferase HIV reporter

Plasmids pcDNA5-Dual-HIV(-1) and (0) were made by inserting the HindIII–ApaI fragment from pDual-HIV(-1) or (0), respectively, into pcDNA5-FRT (Invitrogen), which contains a resistance gene to hygromycin B. An in-frame construct without the HIV-1 frameshift region was generated by cloning an oligonucleotide cassette (inframe-fwd and inframe-rev) into the KpnI and BamHI restriction sites of linearized pDual-HIV. In pDual-in-frame, the luciferase coding sequences are in the same reading frame and separated by a short linker. The HindIII–ApaI fragment from pDual-in-frame was cloned into pcDNA5-FRT.

Cell lines stably expressing the (-1) or (0) dual-luciferase HIV reporter, or the in-frame construct, were generated following the manufacturer's instructions, using 293T Flp-in™ cells (Invitrogen). Individual clones that stably incorporated the plasmids were selected on the basis of their resistance to hygromycin B (Wisent) (250 µg/ml) and maintained in hygromycin B.

Silencing of PKR with siRNA

293T transfectants (6.0×10^5 cells) stably expressing the (-1) and (0) dual-luciferase HIV reporter were transfected with 150 ng of the PKR ShortCut® siRNA Mix or the eGFP ShortCut® siRNA Mix (New England BioLabs), using PEI. The TAR-expressing plasmids were transfected 24 h after the transfection with a siRNA mix. Cells were harvested 48 h after this second transfection and luciferase assays were performed.

Control of PKR silencing by western blotting

293T transfectants, transfected with a siRNA mix, as described above, were harvested 48 h after the transfection, washed in PBS and lysed in 100 µl of Ripa-Doc (final concentration: 140mM NaCl, 8mM Na₂HPO₄, 2mM NaH₂PO₄, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate and 0.05% sodium dodecyl sulphate), containing a cocktail of protease and phosphatase inhibitors. Equal amounts of proteins (15 µg) were separated on a 10% SDS–PAGE gel, transferred on a nitrocellulose membrane and immunoblotted with a mouse anti-PKR hybridoma supernatant (clone F9) (a generous gift from A. Koromilas,

McGill University) and a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (Amersham) diluted 1/1500. After detection of the antigen–antibody complexes, the membrane was washed with 25 ml of stripping buffer (final concentration: 0.08M β -mercaptoethanol, 2% sodium dodecyl sulphate and 0.06M Tris–HCl, pH 6.9) for 30 min at 50°C, and immunoblotted with a mouse anti- α -tubulin monoclonal antibody (clone B-5-1-2 Sigma) diluted 1/5000 and a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse secondary antibody diluted 1/1500. Antigen–antibody complexes were detected with an enhanced chemiluminescence (ECL) system.

Luciferase assays

The Fluc versus the Rluc activities of the (-1) and (0) constructs were measured as relative light units with a Berthold Lumat LB 9507 luminometer, as previously described (Dulude et al. 2006). A Dual-Luciferase Reporter Assay System kit (Promega) was used for Jurkat cells and home-made reagents (Balvay et al. 2007) were used for 293T cells. The Rluc activity is used to normalize the Fluc activity (Fluc/Rluc). The frameshift efficiency is equal to: $[\text{Fluc}(-1)/\text{Rluc}(-1)] / [\text{Fluc}(0)/\text{Rluc}(0) + \text{Fluc}(-1)/\text{Rluc}(-1)]$.

RESULTS

Inhibition of cap-dependent translation initiation with specific inhibitors increases HIV-1 frameshift efficiency

Our aim was to investigate whether the presence of TAR affects HIV-1 frameshift efficiency in relationship with its effect on cap-dependent translation initiation. To this end, we used a dual-luciferase construct, pDual-HIV(-1), which contains the Rluc and the Fluc reporter genes separated by the HIV-1 frameshift region (Figure 2-1B). In this construct, the Fluc is produced only by ribosomes that make a -1 frameshift when translating the HIV-1 frameshift region. To assess the frameshift efficiency, we used a control construct, pDual-HIV(0), in which an adenine is added after the slippery sequence in the frameshift region, so that the Fluc coding sequence is in-frame with the Rluc coding sequence. The Rluc is synthesized by conventional translation in both (-1) and (0) constructs. Before investigating the effect of TAR, we verified that changes in cap-dependent translation

initiation affect HIV-1 frameshift efficiency. Jurkat cells, a CD4⁺ T-cell line, were transfected with pDual-HIV(-1) or (0) plasmids and treated with thapsigargin, rapamycin or hippuristanol, three inhibitors perturbing a different step of cap-dependent translation initiation (Figure 2-1A). The frameshift efficiency, which is $5.1 \pm 0.4\%$ in the absence of inhibitors, was increased about twofold in the presence of either one of these three inhibitors (Figure 2-1C).

The presence of a high amount of TAR decreases HIV-1 frameshift efficiency

We next assessed the effect of TAR on the frameshift efficiency. TAR (Figure 2-2A) was inserted at about 40 nt from the 5' end of the mRNA in pDual-HIV, generating pDual-HIV-TAR(-1) and (0) (Figure 2-2B). We avoided placing TAR at the very end of the mRNA, since such a position could interfere with the binding of the 40S subunit to the messenger (Parkin et al. 1988; Dorin et al. 2003; Dugre-Brisson et al. 2005 and references therein). We first examined the effect of a high amount of TAR that inhibits PKR and stimulates translation initiation (Dever et al. 2007). The frameshift efficiency was assessed in Jurkat and 293T cells. When 2 μg of pDual-HIV-TAR were delivered into the cells, the frameshift efficiency was decreased to 70% of its value in absence of TAR in either Jurkat or 293T cells (Figure 2-2C and D). Under the conditions of these assays, the frameshift efficiency in absence of TAR was $6.1 \pm 0.2\%$ in Jurkat cells and $11.3 \pm 0.9\%$ in 293T cells. These values, and the value of $5.1 \pm 0.4\%$ observed in the experiment described in the preceding section with Jurkat cells that were transfected under slightly different conditions (see details in 'Materials and Methods' section), are comparable to the values obtained with different heterologous systems containing the HIV-1 frameshift region, which were shown to range between 2 and 10% in mammalian cultured cells (Grentzmann et al. 1998; Harger and Dinman 2003; Biswas et al. 2004; Dulude et al. 2006). It can be recalled here that several groups observed that the absolute value of the frameshift efficiencies changes, depending upon various parameters such as the conditions used for the assay and the type of cultured cells (Baranov et al. 2005).

We then investigated whether the decrease in frameshift efficiency observed with pDual-HIV-TAR was influenced by the position of TAR in cis or in trans from the reporter

mRNA. Two other constructs were used, pDual-HIV-50TAR, where the distance between TAR and the 50 end of the reporter mRNA was increased by 50 nt compared to pDual-HIV-TAR, and pTAR, that provides TAR in trans from the reporter mRNA expressed from pDual-HIV (Figure 2-2B). The frameshift efficiency was decreased to 75 and 60%, respectively, in Jurkat cells and 293T cells transfected with pDual-HIV-50TAR compared to the value in absence of TAR. When Jurkat and 293T cells were co-transfected with 2 μ g of pDual-HIV and 2 μ g of pTAR, the frameshift efficiency was reduced to 70% of its value in absence of TAR, a decrease similar to that observed when TAR was present in cis of the reporter mRNA (Figure 2-2C and D). These results indicate that it is the presence of TAR in the cells and not its presence in the reporter mRNA that decreases HIV-1 frameshift efficiency. The effect of TAR on the frameshift efficiency was confirmed when using an infection system to deliver the reporters into the cells (see Figure 1 in the Supplementary Data).

Inhibiting PKR decreases HIV-1 frameshift efficiency

To verify that PKR was involved in the changes in HIV-1 frameshift efficiency observed with a high amount of TAR, we created two constructs, pTAR Δ bulge* and pTARuucg*, expressing mutants of TAR that cannot bind PKR (Kim et al. 2006) (Figure 2-3A). When Jurkat cells were co-transfected with pDual-HIV and plasmids generating these TAR mutants, the frameshift efficiencies were similar to that obtained in absence of TAR and significantly higher than the value obtained in the presence of wild-type TAR (Figure 2-3B). This result supports that PKR is involved in the changes of frameshift efficiency observed in the presence of TAR. To further confirm that inhibiting PKR decreases HIV-1 frameshift efficiency, a plasmid expressing Tat, a HIV-1 viral protein, was co-transfected with the dual-luciferase plasmids. In addition to its well-characterized transactivation effect on transcription of the viral mRNAs by binding to TAR, Tat influences translation by inhibiting PKR, either directly by binding this kinase or indirectly by blocking the binding of TAR to PKR (Brand et al. 1997; Cai et al. 2000). We used a Tat mutant (Tat*) that can bind TAR and inhibit PKR but cannot transactivate transcription, and, thereby, that does not affect mRNA levels (Morrison et al. 1999). Jurkat cells were co-

transfected with the plasmid coding for this Tat mutant and with pDual-HIV, pDual-HIV-TAR or pDual-HIV-50TAR. In the presence of Tat*, the frameshift efficiency was decreased to approximately 60% of its value in absence of Tat* (Figure 2-3C). The decrease with Tat* was the same, whether TAR was present or not, which suggests that Tat* and TAR both act via the same mechanism, the inhibition of PKR.

TAR increases or decreases HIV-1 frameshift efficiency depending upon its concentration and this dose-dependent effect is mediated by PKR

Next, we investigated the effect of a small amount of TAR, which activates PKR and thus interferes with translation initiation (Dever et al. 2007). We used stable 293T transfectants expressing a dual-luciferase HIV reporter. Stable transfectants expressing a (-1) or (0) dual-luciferase HIV reporter were transfected with pTAR, pTAR Δ bulge* or pTARuucg* in amounts ranging from 0 to 2.3 μ g. Figure 2-4A shows the effect of wild-type TAR. In the presence of a small quantity of TAR, the frameshift efficiency increases to about 140% of its value in absence of TAR but with a larger quantity of TAR, the frameshift efficiency decreases to about 80%, a decrease comparable to that observed with a transient transfection of pDual-HIV (Figure 2-2). As a control, we used stable 293T transfectants expressing Rluc and Fluc in-frame, separated by a linker instead of the HIV-1 frameshift region. The ratio of Fluc activity to Rluc activity in lysates from these transfectants was unchanged in the presence of pTAR (data not shown), confirming that changes in the Fluc to Rluc ratio observed with stable transfectants expressing the dual-luciferase HIV reporter are due to variations in the frameshift efficiency. When the stable 293T transfectants expressing the dual-luciferase HIV reporter were transfected with plasmids producing TAR mutants that cannot bind PKR, the frameshift efficiency was unaltered (Figure 2-4B). The effect of a low amount of TAR was also assessed by transient co-transfection of Jurkat cells with pDual-HIV and different quantities of pTAR, ranging from 0 to 2 μ g, the ratio of pTAR to pDual-HIV being equal or inferior to 1:1. The frameshift efficiency also increases under the conditions corresponding to low amounts of TAR, the highest increase being \approx 140% of the frameshift efficiency without TAR (data not shown).

We investigated the involvement of PKR in the changes in frameshift efficiency observed with a low amount of TAR. To this end, PKR expression was silenced by transfecting a PKR siRNA mix into stable 293T transfectants expressing a dual-luciferase HIV reporter. After 24 h, cells were transfected with pTAR in different amounts and harvested 48 h later. As a negative control, an eGFP siRNA mix targeting GFP was used. In the presence of the eGFP siRNA, the frameshift efficiency increases when TAR is present. However, when PKR expression is silenced, this effect disappears, supporting that it is related to PKR activation (Figure 2-5A). Effective silencing of PKR is achieved under the conditions of the assay as shown in Figure 2-5B. It can be noted that the response of the cells to the increase in the amount of TAR appears to differ from that in Figure 2-4. This is due to a difference in the experimental protocol resulting in a lower ratio of the quantity of transfected pTAR to the number of cells (see ‘Materials and Methods’ section).

DISCUSSION

Using a dual-luciferase reporter system in Jurkat and 293T cells, we showed that the presence of TAR alters HIV-1 frameshift efficiency. The addition of a high amount of TAR, in cis or in trans of the reporter mRNA, decreases the frameshift efficiency. This effect is related to an inhibition of PKR. Conversely, a low amount of TAR increases the frameshift efficiency, by activating PKR.

Activation or inhibition of PKR is well-known to affect translation initiation via changes in eIF2 phosphorylation (reviewed in Dever et al. 2007). However, it is also known that transformed cells, such as those we used in this study, tolerate a certain degree of endoplasmic reticulum stress leading to a certain level of phosphorylation of eIF2 via PERK, a kinase functionally homologous to PKR (Nawrocki et al. 2005). Our experimental conditions do not drastically affect the expression of our reporters, implying that the changes in the translation initiation rate caused by activation or inhibition of PKR are small and that the changes in eIF2 phosphorylation should be modest. Using western blotting, we could not detect significant variations in the phosphorylation level of eIF2 in 293T or Jurkat cells transfected with different quantities of TAR (data not shown). We nevertheless suggest that the effect of PKR on HIV-1 frameshift efficiency results from changes in eIF2

phosphorylation that are too small to be detected in presence of the endogenous signal for phosphorylated eIF2 in these cells. However, we cannot exclude that PKR could also influence HIV-1 frameshift efficiency via another yet undiscovered mechanism.

Contradictory effects were seen in previous observations on the influence of the translation initiation rate on the frameshift efficiency. The frameshift efficiency of a plant virus, the beet western yellow virus (BWYV), was higher in a reticulocyte lysate than in a wheat germ extract, which has a lower rate of translation initiation (Garcia et al. 1993). Also, the frameshift efficiency of the human T-cell leukemia virus type II (HTLV-2), when measured in a reticulocyte lysate, was higher with capped than with uncapped mRNAs, which have a lower rate of translation initiation (Honigman et al. 1995). These observations disagree with our results that show a negative relationship between the rate of translation initiation and the frameshift efficiency. However, Paul et al. (2001), when comparing the frameshift efficiency of the barley yellow dwarf virus (BYDV) with capped and uncapped mRNAs in a yeast extract, found that increasing the translation initiation rate decreased the frameshift efficiency. Furthermore, Lopinski et al. (2000), who investigated in vivo the effect of a reduced translation initiation rate on the frameshift efficiency of the L-A virus of *S. cerevisiae*, found that this efficiency was increased under these conditions. The results of Paul et al. (2001) and Lopinski et al. (2000) are in perfect agreement with our findings, and, in line with them, we present the following model that explains our results (Figure 2-6).

When a ribosome translates the HIV-1 frameshift region, it encounters the frameshift stimulatory signal and makes a pause, its decoding center covering the slippery sequence (Tu et al. 1992; Somogyi et al. 1993; Kontos et al. 2001). During the pause, the ribosome can shift or not the reading frame, and, after the pause, the ribosome unfolds the frameshift stimulatory signal and translation continues. If the upstream ribosome reaches the frameshift region before the signal has refolded, the probability that the frameshift occurs is extremely weak. The spacing between ribosomes translating the HIV-1 frameshift region, which is determined by the rate of translation initiation [basal rate estimated to about one initiation event every 6.5 s (Mathews et al. 2007)], could thus affect the frameshift efficiency. Therefore, if we assume an average elongation speed of five amino

acids per second per ribosome, corresponding to a displacement of 15 nt per second on the mRNA (Mathews et al. 2007), the minimal distance between the decoding centers of two ribosomes translating a mRNA would be of about 100 nt. A ribosome covers about 32 nt on the mRNA and heel-printing studies showed that the first base of the P-site codon is at a distance of 12 nt from the 50 edge of the ribosome and of 20 nt from the 30 edge (Wolin and Walter 1988). From these calculations, there would be about 70 exposed nt between two elongating ribosomes. Thus, the HIV-1 frameshift region, including the 43-nt frameshift stimulatory signal, would be exposed after the passage of the first ribosome. The signal would then re-form, which takes only a few microseconds (Moore 1999), before the upstream ribosome reaches the region of the mRNA containing the sequence of this signal. However, the pause made by the first ribosome when encountering the signal decreases the distance with the following ribosome, which has continued to progress during the pause of the first ribosome. This second ribosome could reach the region corresponding to the stimulatory signal before this signal could refold, being still partially covered by the first ribosome. A pause of about three seconds for the first ribosome is sufficient to prevent the refolding of the stimulatory signal. The second ribosome would thus avoid frameshifting and the spacing between this ribosome and the third ribosome would not be altered. As a consequence, the third ribosome would encounter the stimulatory signal and pause, and frameshifting would be possible. This analysis shows that the signal affects every other ribosome under basal conditions. According to this model, an increase in the rate of translation initiation would decrease the frameshift efficiency, since ribosomes would be closer to each other and a smaller proportion of ribosomes would encounter the folded frameshift stimulatory signal. Conversely, a decrease in translation initiation would increase the frameshift efficiency since ribosomes would be further apart and it is very likely that each ribosome would encounter the folded signal. Interestingly, Lopinski et al. (2000), when studying the effect of a reduced translation initiation rate with the L-A virus in yeast cells, observed that the frameshift efficiency doubled, independently of the severity of the initiation defect. Their interpretation was that every other ribosome encounters the signal under basal conditions and that, with a reduced initiation rate, every ribosome encounters this signal. Our analysis fully supports this interpretation.

Although HIV-1 does not induce a rapid and dramatic global shutdown of host cell translation following infection, in contrast to other viruses such as poliovirus, cap-dependent translation initiation is decreased due to cellular stress following infection by this virus (Yilmaz et al. 2006; Balvay et al. 2007) and this decrease can be related to PKR activation (Mohr et al. 2007). Our results suggest that a change in cap-dependent translation initiation could affect HIV-1 frameshift efficiency in infected cells. As mentioned in the 'Introduction' section, the virus replication appears to be exquisitely sensitive to changes in frameshift efficiency. Given the detrimental effect of such changes, the virus likely uses various strategies to counteract this effect. One strategy is inhibition of PKR (reviewed in Ong et al. 2005; Balvay et al. 2007) to stimulate translation initiation. HIV-1 uses two major ways to inhibit PKR: its Tat protein inhibits PKR and its TAR RNA structure blocks PKR dimerization when present in large quantities. TAR is located at the 5' and 3' end of all HIV-1 mRNAs and is also present under a free cytoplasmic form of 58-66 nt (Gunnery et al. 1992; Kessler and Mathews 1992). All these forms of TAR can participate in the inhibition of PKR.

However, inhibition of cap-dependent translation initiation can occur independent of PKR activation. Indeed, the HIV-1 Vpr protein is capable of inducing G2 arrest in cultured CD4⁺ T cells (Belzile et al. 2007; Bolton and Lenardo 2007 and references therein), and, during such arrest, cap-dependent translation initiation is severely impaired (Pyronnet et al. 2001). Another possible strategy to circumvent the problem caused by this situation is the use of a cap-independent mechanism by HIV-1 to initiate the translation of its full-length mRNA (Yilmaz et al. 2006; Balvay et al. 2007). The virus would thus continue to express Gag and Gag-Pol and would maintain a frameshift efficiency that is optimal for its replication. An internal ribosomal entry site (IRES) was identified in the 5'UTR region of HIV-1 full-length mRNA (Brasey et al. 2003) and another IRES was found in the beginning of the gag coding sequence (Buck et al. 2001). IRES have also been found in HIV type 2 (Herbreteau et al. 2005) and in simian immunodeficiency virus (Ohlmann et al. 2000), two viruses related to HIV-1. However, the use of an IRES by HIV-1 in the context of replication-competent viruses remains to be proven (Yilmaz et al. 2006). The two strategies that are described above are not mutually exclusive. HIV-1 could

first counteract changes in cap-dependent translation initiation by inhibiting PKR, until a larger stress in the cellular environment severely perturbs cap-dependent initiation. The virus would then switch to an IRES-driven mode to translate its full-length mRNA.

This scheme is deduced from studies in cultured cells and it will now be important to investigate the frameshift efficiency in the context of a viral infection. A detailed understanding of the mechanisms used by HIV-1 to control its frameshift efficiency will provide valuable information for the design of drugs targeting the frameshift event.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to L.B.-G. And N.H. K.G. and J.C. acknowledge a studentship, respectively, from CIHR, and from the GRUM (Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament de l'Université de Montréal). D.D. acknowledges a fellowship from CIHR. N.H. acknowledges a CIHR New Investigator fellowship and G.F. acknowledges a FRSQ Junior II fellowship. We are grateful to Dr Luc DesGroseillers and Dr N. Hernandez for the gift of plasmids, to Dr J. Pelletier for the gift of hippuristanol and to Dr A. Koromilas for providing us with mouse anti-PKR hybridoma supernatant. We thank Dr Pascal Chartrand and Dr Luc Desgroseillers for stimulating discussions and for critical reading of this manuscript. Funding to pay the Open Access publication charges for the article was provided by CIHR.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

Balvay L, Lopez Lastra M, Sargueil B, Darlix JL, Ohlmann T. 2007. Translational control of retroviruses. *Nat Rev Microbiol* 5: 128-140.

Bannwarth S, Gatignol A. 2005. HIV-1 TAR RNA: the target of molecular interactions between the virus and its host. *Curr HIV Res* 3: 61-71.

Baranov PV, Henderson CM, Anderson CB, Gesteland RF, Atkins JF, Howard MT. 2005. Programmed ribosomal frameshifting in decoding the SARS-CoV genome. *Virology* 332: 498-510.

Belzile JP, Duisit G, Rougeau N, Mercier J, Finzi A, Cohen EA. 2007. HIV-1 Vpr-mediated G2 arrest involves the DDB1-CUL4AVPRBP E3 ubiquitin ligase. *PLoS Pathog* 3: e85.

Biswas P, Jiang X, Pacchia AL, Dougherty JP, Peltz SW. 2004. The Human Immunodeficiency Virus Type 1 Ribosomal Frameshifting Site Is an Invariant Sequence Determinant and an Important Target for Antiviral Therapy. *Journal of Virology* 78: 2082-2087.

Bolton DL, Lenardo MJ. 2007. Vpr cytopathicity independent of G2/M cell cycle arrest in human immunodeficiency virus type 1-infected CD4⁺ T cells. *J Virol* 81: 8878-8890.

Bordeleau ME, Mori A, Oberer M, Lindqvist L, Chard LS, Higa T, Belsham GJ, Wagner G, Tanaka J, Pelletier J. 2006. Functional characterization of IRESes by an inhibitor of the RNA helicase eIF4A. *Nat Chem Biol* 2: 213-220.

Brand SR, Kobayashi R, Mathews MB. 1997. The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 is a substrate and inhibitor of the interferon-induced, virally activated protein kinase, PKR. *J Biol Chem* 272: 8388-8395.

Brasey A, Lopez-Lastra M, Ohlmann T, Beerens N, Berkhout B, Darlix JL, Sonenberg N. 2003. The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA

harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle. *J Virol* 77: 3939-3949.

Brierley I, Dos Ramos FJ. 2006. Programmed ribosomal frameshifting in HIV-1 and the SARS-CoV. *Virus research* 119: 29-42.

Brierley I, Pennell S. 2001. Structure and function of the stimulatory RNAs involved in programmed eukaryotic-1 ribosomal frameshifting. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 66: 233-248.

Buck CB, Shen X, Egan MA, Pierson TC, Walker CM, Siliciano RF. 2001. The human immunodeficiency virus type 1 gag gene encodes an internal ribosome entry site. *J Virol* 75: 181-191.

Cai R, Carpick B, Chun RF, Jeang KT, Williams BR. 2000. HIV-1 TAT inhibits PKR activity by both RNA-dependent and RNA-independent mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 373: 361-367.

Clemens MJ. 2005. Translational control in virus-infected cells: models for cellular stress responses. *Seminars in cell & developmental biology* 16: 13-20.

Dever TE, Dar AC, Sicheri F. 2007. The eIF2a kinases. In *Translational Control in Biology and Medicine*, (ed. MB Matthews, Sonenberg, N. and Hershey, J.W.B.), pp. 319-344. Cold Spring Harbor Laboratory Press, United States.

Dorin D, Bonnet MC, Bannwarth S, Gatignol A, Meurs EF, Vaquero C. 2003. The TAR RNA-binding protein, TRBP, stimulates the expression of TAR-containing RNAs in vitro and in vivo independently of its ability to inhibit the dsRNA-dependent kinase PKR. *J Biol Chem* 278: 4440-4448.

Dugre-Brisson S, Elvira G, Boulay K, Chatel-Chaix L, Mouland AJ, DesGroseillers L. 2005. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res* 33: 4797-4812.

Dulude D, Baril M, Brakier-Gingras L. 2002. Characterization of the frameshift stimulatory signal controlling a programmed -1 ribosomal frameshift in the human immunodeficiency virus type 1. *Nucleic Acids Res* 30: 5094-5102.

Dulude D, Berchiche YA, Gendron K, Brakier-Gingras L, Heveker N. 2006. Decreasing the frameshift efficiency translates into an equivalent reduction of the replication of the human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 345: 127-136.

Dutcher JP. 2004. Mammalian target of rapamycin inhibition. *Clin Cancer Res* 10: 6382S-6387S.

Garcia A, van Duin J, Pleij CW. 1993. Differential response to frameshift signals in eukaryotic and prokaryotic translational systems. *Nucleic Acids Res* 21: 401-406.

Gatignol A, Jeang KT. 2000. Tat as a transcriptional activator and a potential therapeutic target for HIV-1. *Adv Pharmacol* 48: 209-227.

Gaudin C, Mazauric MH, Traikia M, Guittet E, Yoshizawa S, Fourmy D. 2005. Structure of the RNA signal essential for translational frameshifting in HIV-1. *J Mol Biol* 349: 1024-1035.

Gebauer F, Hentze MW. 2004. Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 827-835.

Grentzmann G, Ingram JA, Kelly PJ, Gesteland RF, Atkins JF. 1998. A dual-luciferase reporter system for studying recoding signals. *RNA* 4: 479-486.

Gunnery S, Green SR, Mathews MB. 1992. Tat-responsive region RNA of human immunodeficiency virus type 1 stimulates protein synthesis in vivo and in vitro: relationship between structure and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 11557-11561.

Harger JW, Dinman JD. 2003. An in vivo dual-luciferase assay system for studying translational recoding in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna* 9: 1019-1024.

Herbreteau CH, Weill L, Decimo D, Prevot D, Darlix JL, Sargueil B, Ohlmann T. 2005. HIV-2 genomic RNA contains a novel type of IRES located downstream of its initiation codon. *Nature structural & molecular biology* 12: 1001-1007.

Honigman A, Falk H, Mador N, Rosental T, Panet A. 1995. Translation efficiency of the human T-cell leukemia virus (HTLV-2) gag gene modulates the frequency of ribosomal frameshifting. *Virology* 208: 312-318.

Hung M, Patel P, Davis S, Green SR. 1998. Importance of ribosomal frameshifting for human immunodeficiency virus type 1 particle assembly and replication. *J Virol* 72: 4819-4824.

Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, Varmus HE. 1988. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 331: 280-283.

Karacostas V, Wolffe EJ, Nagashima K, Gonda MA, 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.

Kaufman RJ. 2000. Double-stranded RNA-activated Protein Kinase PKR. In *Translational Control of Gene Expression*, (ed. N Sonenberg, JWB Hershey, MB Mathews), pp. 503-527. CSHL Press, Cold Spring Harbor.

Kessler M, Mathews MB. 1992. Premature termination and processing of human immunodeficiency virus type 1-promoted transcripts. *J Virol* 66: 4488-4496.

Kim I, Liu CW, Puglisi JD. 2006. Specific recognition of HIV TAR RNA by the dsRNA binding domains (dsRBD1-dsRBD2) of PKR. *J Mol Biol* 358: 430-442.

Kontos H, Napthine S, Brierley I. 2001. Ribosomal pausing at a frameshifter RNA pseudoknot is sensitive to reading phase but shows little correlation with frameshift efficiency. *Mol Cell Biol* 21: 8657-8670.

Lopinski JD, Dinman JD, Bruenn JA. 2000. Kinetics of ribosomal pausing during programmed -1 translational frameshifting. *Mol Cell Biol* 20: 1095-1103.

Marcello A, Zoppe M, Giacca M. 2001. Multiple modes of transcriptional regulation by the HIV-1 Tat transactivator. *IUBMB Life* 51: 175-181.

Mathews MB, Sonenberg N, Hershey JWB. 2007. Origins and Principles of Translational Control. In *Translational Control in Biology and Medicine*, (ed. MB Mathews, N Sonenberg, JWB Hershey), pp. 1-40. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Mohr IJ, Pe'ery T, Mathews MB. 2007. Protein Synthesis and Translational Control during Viral Infection. In *Translational Control in Biology and Medicine*, (ed. MB Mathews, N Sonenberg, JWB Hershey), pp. 545-599. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Moore PB. 1999. Ribosomes and the RNA world. In *The RNA World*, (ed. RF Gesteland, TR Cech, JF Atkins), pp. 381-401. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Morrison DJ, Pendergrast PS, Stavropoulos P, Colmenares SU, Kobayashi R, Hernandez N. 1999. FBI-1, a factor that binds to the HIV-1 inducer of short transcripts (IST), is a POZ domain protein. *Nucleic Acids Res* 27: 1251-1262.

Nawrocki ST, Carew JS, Pino MS, Highshaw RA, Dunner K, Jr., Huang P, Abbruzzese JL, McConkey DJ. 2005. Bortezomib sensitizes pancreatic cancer cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Cancer Res* 65: 11658-11666.

Ohlmann T, Lopez-Lastra M, Darlix JL. 2000. An internal ribosome entry segment promotes translation of the simian immunodeficiency virus genomic RNA. *J Biol Chem* 275: 11899-11906.

Ong CL, Thorpe JC, Gorry PR, Bannwarth S, Jaworowski A, Howard JL, Chung S, Campbell S, Christensen HS, Clerzius G et al. 2005. Low TRBP levels support an innate human immunodeficiency virus type 1 resistance in astrocytes by enhancing the PKR antiviral response. *J Virol* 79: 12763-12772.

Park J, Morrow CD. 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.

Parkin NT, Cohen EA, Darveau A, Rosen C, Haseltine W, Sonenberg N. 1988. Mutational analysis of the 5' non-coding region of human immunodeficiency virus type 1: effects of secondary structure on translation. *EMBO J* 7: 2831-2837.

Paul CP, Barry JK, Dinesh-Kumar SP, Brault V, Miller WA. 2001. A sequence required for -1 ribosomal frameshifting located four kilobases downstream of the frameshift site. *J Mol Biol* 310: 987-999.

Pestova TV, Lorsh JR, Hellen CUT. 2007. The Mechanism of Translation Initiation in Eukaryotes. In *Translational control in Biology and Medicine*, (ed. MB Mathews, N Sonenberg, JWB Hershey), pp. 87-128. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Poulin F, Sonenberg N. 2003. Mechanism of translation initiation in eukaryotes. In *Translational Mechanisms*, (ed. J Lapointe, L Brakier-Gingras), pp. 380-297. Landes Bioscience/Eurekah.com/Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Pyronnet S, Dostie J, Sonenberg N. 2001. Suppression of cap-dependent translation in mitosis. *Genes Dev* 15: 2083-2093.

Raught B, Gingras A-C. 2007. Signaling to Translation Initiation. In *Translational control in Biology and Medicine*, (ed. MB Mathews, N Sonenberg, JWB Hershey), pp. 369-400. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Ron D, Harding P. 2007. eIF2a Phosphorylation in Cellular Stress Responses and Disease. In *Translational control in Biology and Medicine*, (ed. MB Mathews, N Sonenberg, JWB Hershey), pp. 345-368. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Shehu-Xhilaga M, Crowe SM, Mak J. 2001. Maintenance of the Gag/Gag-Pol ratio is important for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization and viral infectivity. *J Virol* 75: 1834-1841.

Somogyi P, Jenner AJ, Brierley I, Inglis SC. 1993. Ribosomal pausing during translation of an RNA pseudoknot. *Mol Cell Biol* 13: 6931-6940.

Staple DW, Butcher SE. 2005. Solution structure and thermodynamic investigation of the HIV-1 frameshift inducing element. *J Mol Biol* 349: 1011-1023.

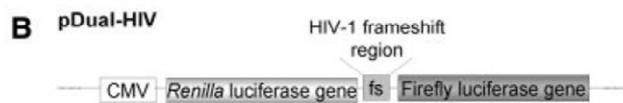
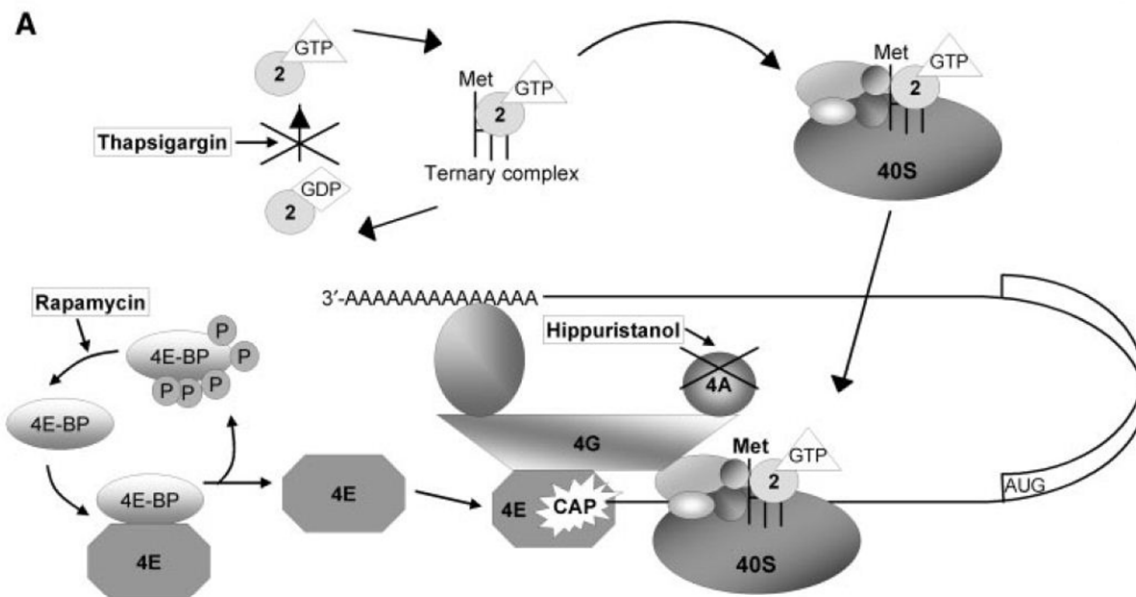
Tu C, Tzeng TH, Bruenn JA. 1992. Ribosomal movement impeded at a pseudoknot required for frameshifting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8636-8640.

Williams BR. 1999. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* 18: 6112-6120.

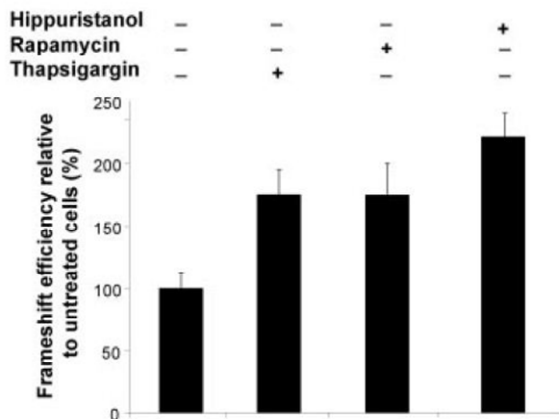
Wolin SL, Walter P. 1988. Ribosome pausing and stacking during translation of a eukaryotic mRNA. *EMBO J* 7: 3559-3569.

Yilmaz A, Bolinger C, Boris-Lawrie K. 2006. Retrovirus translation initiation: Issues and hypotheses derived from study of HIV-1. *Curr HIV Res* 4: 131-139.

Figure 2-1 : HIV-1 frameshift efficiency increases in the presence of inhibitors of cap-dependent translation initiation. (A) Major control steps of cap-dependent translation initiation in eukaryotes (Pestova et al. 2007). The figure is adapted from Gebauer and Hentze (2004). Only the factors we refer to in the text are named. The 40S ribosomal subunit associates with the ternary complex [initiation factor 2 (eIF2) plus GTP plus the initiator tRNA, Met-tRNAⁱ Met] and with other factors, and binds to the 5' cap structure of the mRNA. This binding requires the eIF4F complex formed by three initiation factors: eIF4E, the cap-binding protein, eIF4G, a scaffold protein and eIF4A, a RNA helicase that unfolds secondary structures. After each round of initiation, eIF2 is released from the ribosome in association with GDP. Phosphorylation of the α subunit of eIF2 (eIF2- α) prevents the recycling of eIF2-GDP in eIF2-GTP, blocking translation initiation. Thapsigargin induces endoplasmic reticulum stress, which stimulates the PERK kinase that phosphorylates eIF2- α , reducing the level of functional eIF2 (Williams 1999; Kaufman 2000; Ron and Harding 2007). Rapamycin shuts down the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway, which blocks the phosphorylation of the translation repressor 4E-BP, and hypophosphorylated 4E-BP sequesters the initiation factor eIF4E (Dutcher 2004; Raught and Gingras 2007). Hippuristanol is a selective inhibitor of eIF4A (Bordeleau et al. 2006), which interferes with the binding of the 40S subunit to the mRNA. (B) Plasmid pDual-HIV contains the Rluc and the Fluc coding sequences under the control of a CMV promoter and separated by the HIV-1 frameshift region. (C) The frameshift efficiency was assessed in lysates from Jurkat cells transfected with 2 μ g of pDual-HIV(-1) or (0) and, subsequently, treated with thapsigargin, rapamycin or hippuristanol or left untreated (see 'Materials and Methods' section for details). The frameshift efficiency with untreated cells transfected with pDual-HIV was arbitrarily set at 100%. Results are the means \pm SD of at least four independent experiments.



C Jurkat cells transfected with pDual-HIV



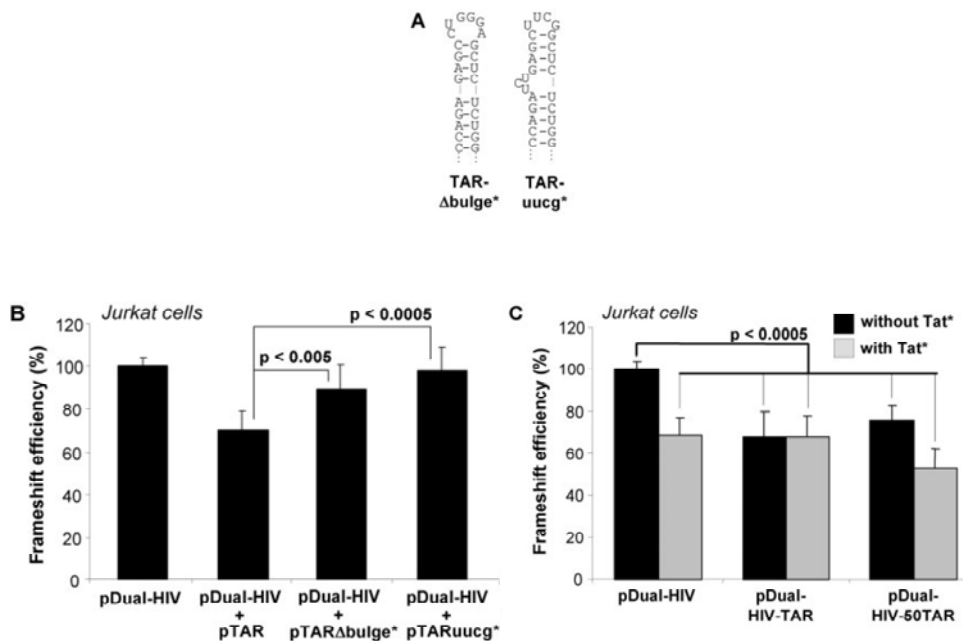


Figure 2-3 : PKR is involved in the decrease in HIV-1 frameshift efficiency observed when a high amount of TAR is present. (A) Sequence and structure of TAR mutants that cannot bind PKR (Kim et al. 2006) used in this study. (B) The frameshift efficiency is not affected by the TAR mutants. The frameshift efficiency was assessed in lysates from Jurkat cells co-transfected with pDual-HIV and plasmids expressing wild-type TAR or mutants of TAR. The frameshift efficiency with pDual-HIV was arbitrarily set at 100%. Results are the means \pm SD of at least five independent experiments. The P values are indicated. The values with pDual-HIV and pTAR Δ bulge* or pDual-HIV and pTARuucg* were not significantly different from the value with pDual-HIV, but were significantly higher than the value with pDual-HIV and pTAR. (C) The presence of a Tat mutant (Tat*) that inhibits PKR decreases the frameshift efficiency. The frameshift efficiency was assessed in lysates from Jurkat cells co-transfected with pDual-HIV, pDual-HIV-TAR or pDual-HIV-50TAR and a plasmid coding for Tat* or an empty vector in a 1:1 ratio. The frameshift efficiency with pDual-HIV without Tat* was arbitrarily set at 100%. Results are the means \pm SD of at least four independent experiments. The P-values are indicated. The values with pDual-HIV-TAR and pDual-HIV-50TAR, with or without Tat*, were not significantly different from the value with pDual-HIV with Tat* but significantly lower than the value with pDual-HIV without Tat*.

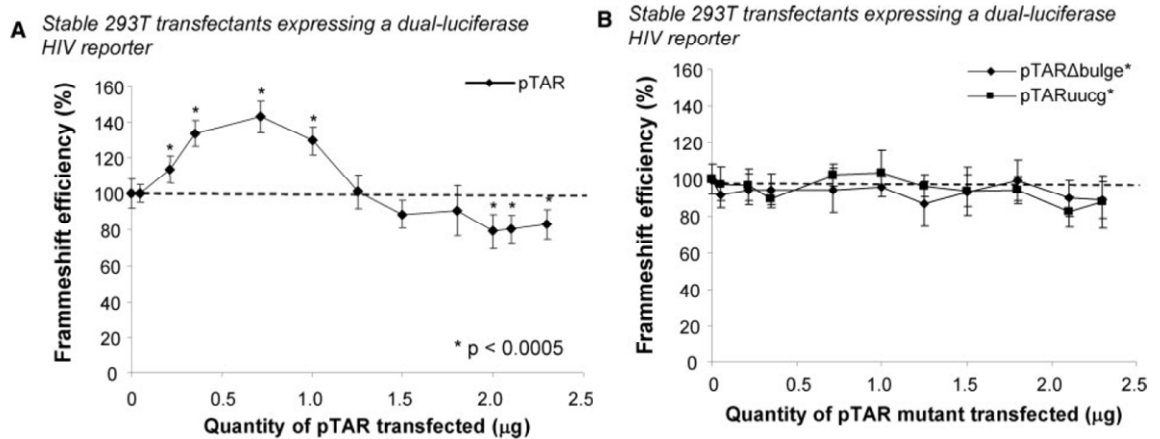


Figure 2-4 : Wild-type TAR, but not the TAR mutants, increases or decreases HIV-1 frameshift efficiency in a dose-dependent manner. The frameshift efficiency was assessed in lysates from stable 293T transfectants expressing the (-1) or (0) dual-luciferase HIV reporter transfected with pTAR (A), pTAR Δ bulge* (B) or pTARuucg* (B) in different amounts ranging from 0 to 2.3 μ g. The asterisks indicate the frameshift efficiencies that significantly differ from the frameshift efficiency without pTAR ($P < 0.0005$). Results are the means \pm SD of at least six independent experiments.

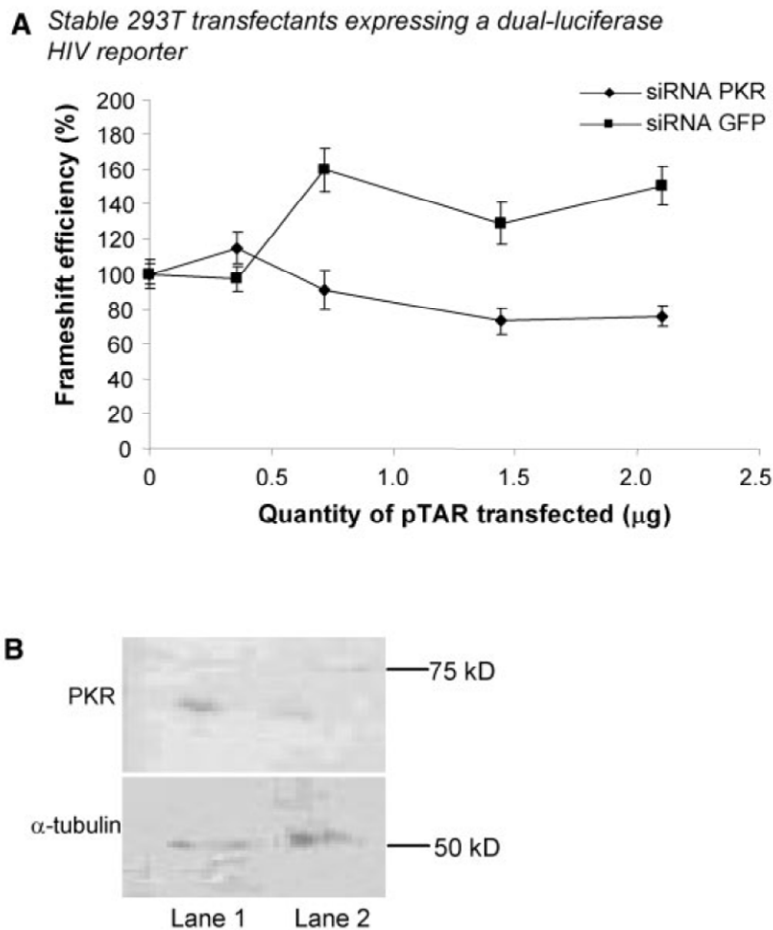


Figure 2-5 : The effect of TAR on HIV-1 frameshift efficiency disappears when PKR expression is silenced. (A) The frameshift efficiency was assessed in lysates from stable 293T transfectants expressing the (-1) or (0) dual-luciferase HIV reporter and transfected first with a eGFP siRNA mix (negative control) or a PKR siRNA mix, and, after 24 h, with pTAR in different amounts ranging from 0 to 2.3 μg . Results are the means \pm SD of at least three independent experiments. (B) Control of the silencing of PKR expression. Equal amounts of proteins from lysates of stable 293T transfectants expressing a dual-luciferase HIV reporter and transfected with either the eGFP siRNA mix (lane 1) or PKR siRNA mix (lane 2) were separated by SDS-PAGE, transferred on a nitrocellulose membrane and immunoblotted with a mouse anti-PKR monoclonal antibody. Anti- α -tubulin blotting was used as an internal control for loading.

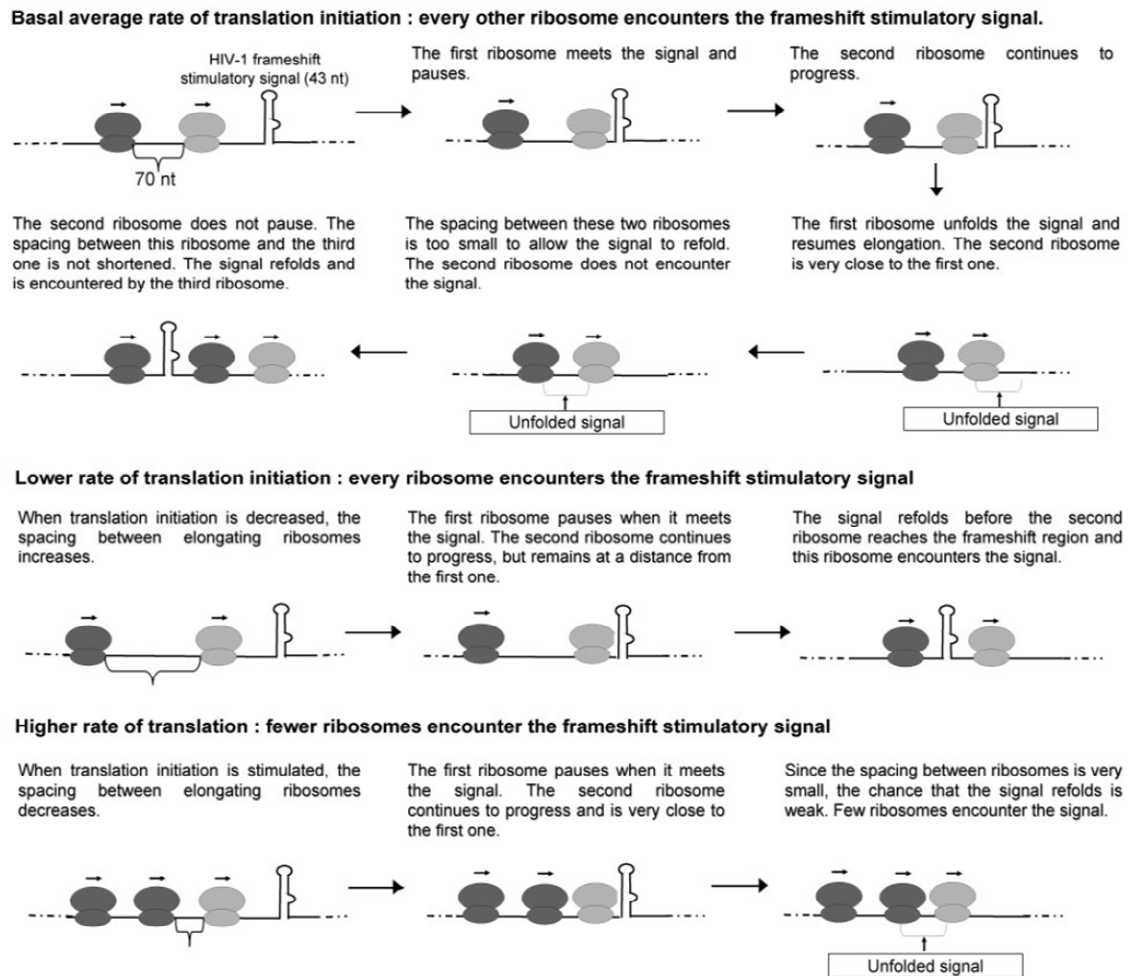


Figure 2-6 : Changes in the rate of translation initiation influence the frameshift efficiency by modifying the spacing between elongating ribosomes. This model shows elongating ribosomes that reach the frameshift region and explains how the rate of translation initiation, which determines the spacing between these ribosomes, affects the frameshift efficiency (see the text). Note that a ribosome must encounter a folded frameshift stimulatory signal to make a frameshift, but this encounter does not ensure that frameshifting will occur.

Chapitre 3

Charbonneau J, Gendron K, Ferbeyre G, Brakier-Gingras L. 2012. The 5' UTR of HIV-1 full-length mRNA and the Tat viral protein modulate the programmed -1 ribosomal frameshift that generates HIV-1 enzymes. Rna 18: 519-529.

Les expériences ont toutes été faites par moi excepté les immunobuvardages de type Western qui ont été effectués par Karine Gendron. J'ai rédigé le manuscrit avec l'aide du Dr Léa Brakier-Gingras.

The 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA and the Tat viral protein
modulate the programmed -1 ribosomal frameshift that generates
HIV-1 enzymes

Johanie Charbonneau¹, Karine Gendron^{1,2}, Gerardo Ferbeyre^{1,*}

and Léa Brakier-Gingras^{1,*}

¹ Département de biochimie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3T 1J4

² Centre de recherche, Hôpital Ste-Justine, Montréal, Québec, Canada, H3T 1C5

RNA, March 2012, Vol. 18, p.519-529

*Corresponding authors:

Léa Brakier-Gingras and Gerardo Ferbeyre

Département de biochimie, Université de Montréal,

2900, Blvd Édouard-Montpetit,

Montréal, Québec, Canada, H3T 1J4

ABSTRACT

Translation of the full-length messenger RNA (mRNA) of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) generates the precursor of the viral enzymes via a programmed -1 ribosomal frameshift. Here, using dual-luciferase reporters, we investigated whether the highly structured 5' untranslated region (UTR) of this mRNA, which interferes with translation initiation, can modulate HIV-1 frameshift efficiency. We showed that, when the 5'UTR of HIV-1 mRNA occupies the 5' end of the reporter mRNA, HIV-1 frameshift efficiency is increased about four-fold in Jurkat T cells, compared to a control dual-luciferase reporter with a short unstructured 5'UTR. This increase was related to an interference with cap-dependent translation initiation by the TAR-Poly(A) region at the 5' end of the messenger. HIV-1 mRNA 5'UTR also contains an internal ribosome entry site (IRES), but we showed that, when the cap-dependent initiation mode is available, the IRES is not or weakly utilized. However, when the ribosomes have to use the IRES to translate the dual-luciferase reporter, the frameshift efficiency is comparable to that of the control dual-luciferase reporter. The decrease in cap-dependent initiation and the accompanying increase in frameshift efficiency caused by the 5'UTR of HIV-1 mRNA is antagonized, in a dose-dependent way, by the Tat viral protein. Tat also stimulates the IRES-dependent initiation and decreases the corresponding frameshift efficiency. A model is presented that accounts for the variations in frameshift efficiency depending upon the 5'UTR and the presence of Tat and it is proposed that a range of frameshift efficiencies are compatible with the virus replication.

Keywords: HIV-1 programmed -1 ribosomal frameshift, translation initiation, TAR, Tat, IRES.

INTRODUCTION

Conventional translation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) full-length messenger RNA (mRNA) produces Gag, the precursor of its structural proteins. It also produces Gag-Pol, the precursor of its enzymes, via a programmed -1 ribosomal frameshift (Jacks et al. 1988; reviewed in Brierley and Dos Ramos 2006; Brakier-Gingras and Dulude 2010). This frameshift occurs in a specific region of HIV-1 full-length mRNA (Figure 3-1), the slippery sequence, which is followed by an irregular stem-loop, the frameshift stimulatory signal (FSS) that controls frameshift efficiency (Dulude et al. 2002; Gaudin et al. 2005; Staple and Butcher 2005). Current models propose that the encounter between ribosomes and the FSS forces them to make a pause. This pause would be responsible for an incomplete translocation for a small proportion of the ribosomes, which triggers the -1 frameshift (Namy et al. 2006; Leger et al. 2007; Liao et al. 2011). Whether they frameshift or not, ribosomes continue translation by unfolding the FSS with their helicase-associated activity (Takyar et al. 2005). We previously showed (Gendron et al. 2008) that the frameshift event is affected by changes in the rate of translation initiation although it occurs during the elongation step of translation. A ribosome must encounter the folded FSS to frameshift. A high initiation rate results in the ribosomes being close to each other, reducing the time available for the FSS to refold between the passage of the ribosomes whereas a low initiation rate has the converse effect. HIV-1 frameshift efficiency is thus inversely proportional to the translation initiation rate. This was demonstrated by using a control dual-luciferase reporter containing HIV-1 frameshift region inserted between the *Renilla* (Rluc) and the firefly (Fluc) luciferase genes, such that a -1 frameshift is required to produce Fluc (expressed as a Rluc-Fluc fusion protein) whereas Rluc is produced following the conventional rules of translation. The control dual-luciferase mRNA reporter has a short (about 90 nucleotides (nt)-long) and unstructured 5' untranslated region (UTR). This contrasts with the about 300 nt-long 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA, which is highly structured. This 5'UTR contains a number of extremely conserved signals (Figure 3-1) that are required for several steps in virus replication (reviewed in Berkhout 1996). HIV-1 full-length mRNA is capped and polyadenylated and can therefore be translated, like the majority of cellular mRNAs, via a cap-dependent

translation initiation (for reviews on translation, see Gebauer and Hentze 2004; Pestova et al. 2007; Sonenberg and Hinnebusch 2009; Jackson et al. 2010). This mode of initiation involves loading of the 40S ribosomal subunit and associated factors at the 5' end of the mRNA and subsequent scanning in the 3' direction until an AUG codon in an appropriate context is encountered. An alternative translation initiation way is via an internal ribosome entry site (IRES) to which the 40S subunit binds within the mRNA, proximal to the AUG start codon (reviewed in Lopez-Lastra et al. 2005; Doudna and Sarnow 2007; Hellen 2009; Pacheco and Martinez-Salas 2010). Such an entry site was detected in the 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA (Figure 3-1) (Brasey et al. 2003). Therefore, the translation of this mRNA can be initiated in a cap-dependent and also in an IRES-dependent way (reviewed in Yilmaz et al. 2006; Ricci et al. 2008; Balvay et al. 2009; Chamond et al. 2010).

The 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA is known to slow down mRNA translation (SenGupta et al. 1990; Geballe and Gray 1992; Miele et al. 1996), an effect mostly due to the TAR stem-loop at the 5' end (Cullen 1986), which is enhanced by the additional presence of the sequence encoding the neighbour Poly(A) hairpin (Parkin et al. 1988). It likely results from an interference of TAR with the binding of the 40S subunit to the mRNA. In addition, depending upon its concentration, TAR can activate or inhibit the double-stranded RNA-dependent kinase PKR (reviewed in Bannwarth and Gatignol 2005; Clerzius et al. 2011). This effect, which has an influence on global protein synthesis, is much weaker than the blockade of accessibility of the 5' end of the mRNA (SenGupta et al. 1990; Geballe and Gray 1992). The activation of PKR causes translation inhibition by phosphorylation of the α subunit of eIF2, an initiation factor essential for cap-dependent translation initiation, whereas the inhibition of PKR, by decreasing the amount of phosphorylated eIF2, has the opposite effect (reviewed in Clerzius et al. 2011).

A number of cellular proteins, such as La autoantigen (Chang et al. 1994; Svitkin et al. 1994), Staufin (Dugre-Brisson et al. 2005) and the TAR RNA-binding protein (TRBP) (Dorin et al. 2003), bind the TAR stem-loop and alleviate the blockade of translation initiation caused by TAR, probably by destabilizing this structure. Some cellular RNA helicases also contribute to antagonize the effect of TAR on translation such as RHA,

which binds to TAR (Fujii et al. 2001) and enhances the translation of HIV-1 mRNAs (Bolinger et al. 2010). DDX3 also enhances the translation of HIV-1 mRNAs (Liu et al. 2011), although it is not known so far whether it binds to TAR. Among HIV-1 proteins, it has been observed, more than two decades ago, that the Tat protein can counteract the effect of TAR and stimulates translation of the viral mRNAs but other studies contradicted these observations (see below). The major role of Tat is the transactivation of transcription of viral transcripts by binding to TAR (reviewed in Brady and Kashanchi 2005; Gatignol 2007) but, by interacting with a variety of cellular proteins, it has other pleiotropic effects (Pugliese et al. 2005; Gautier et al. 2009; Romani et al. 2009; Van Duyne et al. 2009; Johri et al. 2011). Interestingly, Tat upregulates several cellular RNA helicases among which DDX3 (Yedavalli et al. 2004) and probably RHA, with which it directly interacts (Van Duyne et al. 2009). As to the effect of Tat on the translation initiation of TAR-containing RNA transcripts, it was shown that in cultured cells, in reticulocyte lysates or in *Xenopus* oocytes (Cullen 1986; SenGupta et al. 1990; Braddock et al. 1993), Tat counteracted the inhibitory effect of TAR but other researchers did not see this effect of Tat either in cultured cells (Chin et al. 1991), in reticulocyte lysates or in *Xenopus* oocytes (Parkin et al. 1988; Svitkin et al. 1994).

Tat also has a stimulatory effect on global protein synthesis by competing with eIF2 for phosphorylation by PKR or by inhibiting PKR activity, independently of the presence of TAR (reviewed in Clerzius et al. 2011). Because of the conflicting results in the literature, the role of Tat in the translation of mRNAs containing TAR at their 5' end remained controversial. In the present study, we investigated, in absence and in presence of Tat, the effect of the 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA on the efficiency of the programmed -1 frameshift occurring upon translation of this messenger. We constructed dual-luciferase reporters in which the HIV-1 frameshift region is inserted between the two luciferases, with the complete HIV-1 full-length mRNA 5'UTR, or a part of it, at the 5' end of the reporter mRNA. Our results show that, when CD4+ Jurkat T cells or HEK 293T cells were transfected with these different plasmids, the frameshift efficiency with the constructs containing the TAR-Poly(A) region significantly increased compared to the frameshift efficiency obtained with the control dual-luciferase reporter with a short and unstructured

5'UTR. With a long structured 5'UTR devoid of the TAR-Poly(A) region, the frameshift efficiency was comparable to or slightly greater than that of the control dual-luciferase reporter. We constructed another reporter where the translation initiation for Rluc and Rluc-Fluc was exclusively IRES-dependent and found that its frameshift efficiency was comparable to that of the control dual-luciferase. With all the reporters, the addition of Tat decreased the frameshift efficiency, the effect being more pronounced with the constructs containing the TAR-Poly(A) region at their 5' end or using exclusively an IRES-dependent mode of translation initiation.

RESULTS

Description of dual-luciferase constructs containing the 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA or portions of this 5'UTR.

Our aim was to investigate the impact of the structured 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA on HIV-1 frameshift efficiency. To this end, we used dual-luciferase constructs coding for Rluc and Fluc separated by HIV-1 frameshift region (Figure 3-2A). The pDual-HIV* mRNA reporter contains a short and relatively unstructured 5'UTR, and corresponds to reporters commonly used to study HIV-1 frameshift so far (Figure 3-2B). We first studied the influence of the complete 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA on frameshift efficiency, using p5'UTR-HIV. Secondly, we determined the impact of different parts of this 5'UTR, by studying the influence of the TAR-Poly(A) structures at the 5' end of the mRNA reporter, with pTP-HIV, and the influence of the portion of the 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA encompassing an IRES (as determined by Brasey et al. (2003)) and without TAR-Poly(A), with pΔTP-5'UTR-HIV. Plasmids pDual-HIV* and pTP-HIV use a cap-dependent mode of initiation whereas pΔTP-5'UTR-HIV and p5'UTR-HIV could use both the cap-dependent and the IRES-dependent initiation mode. A last reporter, pCAT-5'UTR-HIV, was made that forced the ribosomes to use the IRES-dependent mode to translate the luciferases. The chloramphenicol acetyltransferase (CAT) coding sequence was added upstream of HIV-1 5'UTR in p5'UTR-HIV, such that the CAT coding sequence is translated via a cap-dependent initiation mode whereas Rluc and Rluc-Fluc are produced via an IRES-dependent initiation mode.

The 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA modulates HIV-1 frameshift efficiency

We assessed how the different 5'UTR of the mRNA reporters influence HIV-1 frameshift efficiency when the reporters were transfected in cultured cells. Since HIV-1 infects T-lymphocyte cells, we first chose CD4+ Jurkat T cells (Figure 3-3A). Using a reporter containing HIV-1 full-length mRNA 5'UTR (p5'UTR-HIV), we observed a four-fold increase in frameshift efficiency compared to a short and unstructured 5'UTR (pDual-HIV*). This increase mostly results from the presence of the TAR-Poly(A) region, since this region alone (pTP-HIV) causes an increase in frameshift efficiency comparable to that of the complete 5'UTR. The remaining structured region of the 5'UTR, devoid of the TAR-Poly(A) region (p Δ TP-5'UTR-HIV), causes about a two-fold increase in frameshift efficiency when compared to pDual-HIV* but does not contribute to further increase the frameshift efficiency obtained when TAR-Poly(A) is present. HIV-1 IRES is contained within this remaining structured region of the 5'UTR. We also observed that mutations in the IRES known to increase or decrease by two-fold the IRES activity (Gendron et al. 2011) did not affect frameshift efficiency when introduced in p5'UTR-HIV (data not shown). As to the frameshift efficiency of pCAT-5'UTR-HIV reporter, for which translation of the luciferases is IRES-dependent, it was slightly higher than that of pDual-HIV*, and about one-third of the frameshift efficiency observed with the p5'UTR-HIV reporter. Thus, the use of an IRES-dependent translation initiation mode when HIV-1 full-length mRNA is translated results in a frameshift efficiency that strongly differs from that observed with a cap-dependent initiation mode. Note that the changes in frameshift efficiency were assessed by comparing the Fluc/Rluc ratios in the constructs where Fluc expression depends upon a -1 frameshift (-1 constructs). Such a direct comparison of these ratios is valid to assess changes in frameshift efficiency because the frameshift site and its local context are identical in the different constructs. In some assays, the frameshift efficiencies were also assessed by dividing the Fluc/Rluc ratio in the -1 constructs by that of the Fluc/Rluc ratio in constructs where Rluc and Fluc are in-frame (0 constructs) (see Grentzmann et al.1998). The frameshift efficiency was found to be $9.1 \pm 0.8\%$ in pDual-HIV* and the variations of frameshift efficiency with pTP-HIV, p5'UTR-HIV and p Δ TP-

5'UTR-HIV, when compared to pDual-HIV*, reproduced the changes observed when comparing the Fluc/Rluc ratios in the -1 constructs.

We next investigated whether the changes seen in frameshift efficiency were directly related to translation efficiency by measuring the ratio of Rluc per mRNA produced, using real-time quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) (Figure 3-3B). This experiment showed that the level of intact reporter mRNA produced in transfected cells was similar for each construct, eliminating the possibility that premature termination or aberrant splicing could have occurred in some of the constructs (data not shown). It also showed changes in translational efficiency depending upon the 5'UTR of the construct. The presence of a structured 5'UTR, devoid of TAR-Poly(A) as in p Δ TP-5'UTR-HIV, causes a 1.5-fold decrease in translation efficiency when compared to the short and unstructured 5'UTR of pDual-HIV*. The TAR-Poly(A) region, as seen with pTP-HIV, or the complete 5'UTR, as seen in p5'UTR-HIV, reduces translation efficiency about four-fold when compared to pDual-HIV*. With these constructs, a high frameshift efficiency parallels a low translation efficiency. In contrast, translation efficiency of pCAT-5'UTR-HIV (Figure 3-3B) is lower than that of pTP-HIV and p5'UTR-HIV whereas its frameshift efficiency (Figure 3-3A) is much lower than that of those two plasmids. There is thus no apparent inverse correlation between translation rate and frameshift efficiency when the IRES-dependent mode is used.

We also verified whether and how the 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA influences HIV-1 frameshift efficiency in HEK 293T, another cell line that is commonly used to study HIV-1 replication (Figure 3-4A). We observed that the presence of the complete 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA (p5'UTR-HIV) increases frameshift efficiency by about 1.5-fold compared to the control pDual-HIV*. The TAR-Poly(A) region (pTP-HIV) causes the same increase of the frameshift efficiency as the complete 5'UTR, while the HIV-1 5'UTR devoid of TAR-Poly(A) (p Δ TP-5'UTR-HIV) does not affect the frameshift efficiency compared to pDual-HIV*. With pCAT-5'UTR-HIV, the frameshift efficiency is comparable to that of pDual-HIV*. Therefore, the general trend for changes in frameshift efficiency is the same for Jurkat T cells and HEK 293T cells,

although the latter cell line appears less sensitive than the Jurkat T cells to variations in the 5'UTR of the reporter mRNA. As for the Jurkat cells, the changes in the frameshift efficiency in HEK 293T were assessed by measuring the changes in the Fluc/Rluc ratios in the -1 constructs. When the frameshift efficiencies were measured by dividing the Fluc/Rluc ratios in the -1 constructs by those in the corresponding in-frame constructs, the frameshift efficiency was found to be 11.0 ± 1.0 % in pDual-HIV* and was increased about 1.5-fold in pTP-HIV or p5'UTR-HIV but did not change in p Δ TP-5'UTR-HIV, in agreement with the results obtained when comparing the Fluc/Rluc ratios in the -1 constructs.

The different 5'UTRs were also seen to affect translation efficiency of Rluc in HEK 293T cells, as examined by the same procedure described above for Jurkat T cells (Figure 3-4B). TAR-Poly(A), as seen with pTP-HIV and p5'UTR-HIV, reduces translation efficiency by about 2.5-fold compared to pDual-HIV*. A structured region lacking TAR-Poly(A), as in p Δ TP-5'UTR-HIV, has a translation rate comparable to pDual-HIV*. The translation rate of Rluc from pCAT-5'UTR-HIV is smaller (about one-fifth) than that of the reporter mRNAs containing TAR-Poly(A) (pTP-HIV and p5'UTR-HIV). Again, the general trend for the changes in translation efficiency was comparable to what was observed in Jurkat T cells although there are quantitative differences between the two types of cells.

Impact of the Tat viral protein on frameshift efficiency

As explained in the Introduction, the presence of the Tat viral protein counteracts the blockade imposed by TAR on translation initiation according to a number of researchers. However, this observation was contradicted by several studies, casting a doubt on a role of Tat in the control of translation of HIV-1 transcripts. In the present study, Tat was transiently expressed in Jurkat T cells, as assessed by Western blotting (data not shown). We investigated the effect of Tat on frameshift efficiency with luciferase reporters containing or not the TAR-Poly(A) structures (Figure 3-5A). Our results show a strong dose-dependent decrease in frameshift efficiency with increasing quantities of Tat when TAR is present at the 5' end of the mRNA (pTP-HIV and p5'UTR-HIV). For the lowest

quantity of Tat expressed, the frameshift efficiency amounts to 50% of its value in absence of Tat and the decline in frameshift efficiency continues, although less abruptly, for further increases in Tat expression. As to p Δ TP-5'UTR-HIV, with the 5'UTR of HIV-1 mRNA devoid of TAR-Poly(A), there is a slow decrease in frameshift efficiency in presence of increasing quantities of Tat, this efficiency amounting to 80% of its value in absence of Tat for the lowest quantity of Tat expressed. A similar pattern was seen with the control plasmid, pDual-HIV*. When an IRES-dependent mode of initiation was used, with pCAT-5'UTR-HIV, the frameshift efficiency strongly and rapidly decreased in presence of Tat, as for pTP-HIV and p5'UTR-HIV.

Next, we examined the translation efficiency in presence of Tat by measuring the Rluc/mRNA ratio (Figure 3-5B). Three constructs were selected for these assays: p Δ TP-5'UTR-HIV, p5'UTR-HIV, and pCAT-5'UTR-HIV. In all three cases, translation efficiency increases when Tat expression increases, likely accounting for the decrease in frameshift efficiency. The effect of Tat is stronger in presence of TAR-Poly(A) (with p5'UTR-HIV), the stimulation of translation being two- to four-fold that observed in absence of TAR-Poly(A) (with p Δ TP-5'UTR-HIV). The effect of Tat is also stronger with the reporter using the IRES mode of initiation for the luciferases (pCAT-5'UTR-HIV). Therefore, our results clearly demonstrate that, in cultured cells, Tat stimulates translation of the different reporters, whether translation is cap-dependent or IRES-dependent, and also decreases the frameshift efficiency.

It is observed that Tat slightly increases the amount of reporter mRNA in the absence of TAR at its 5'end whereas the effect of Tat is stronger in its presence (Figure 3-5C). This transcriptional effect of Tat with heterologous promoters has already been described (Dingwall et al. 1990; Kim and Risser 1993). An increased transcription could increase the frameshift efficiency by decreasing the ribosome load, thus antagonizing the effect of Tat. The inhibitory effect of Tat on frameshifting could thus have been even greater if Tat was not also stimulating the production of mRNA.

Finally, we also investigated the effect of a mutant of Tat, TatK41T (Kuppuswamy et al. 1989) on frameshift efficiency and on translation efficiency in Jurkat T cells. This mutant is transcriptionally inactive and the mutation is located in a region (amino acids 40 to 58) involved in the interaction of Tat with various cellular proteins, among which PKR (Cai et al. 2000; Bres et al. 2002; Brady and Kashanchi 2005). The expression of TatK41T in Jurkat T cells was verified by Western blot (data not shown) and was similar to that of wild-type Tat. We did not observe any significant effect on frameshift efficiency and on translation efficiency with this mutant, whether TAR was present or not (data not shown), suggesting that the effect of Tat on translation and, hence, on frameshift could be related to its capacity to interact with some cellular proteins.

DISCUSSION

Using a dual-luciferase reporter containing either the complete 5'UTR from HIV-1 full-length mRNA or portions of this UTR, we showed that mostly the TAR-Poly(A) structures, at the 5' end of this mRNA, affect the programmed -1 ribosomal frameshift that generates HIV-1 enzymes upon translation of this messenger. As explained in the Introduction, a ribosome that encounters a FSS downstream of a slippery sequence makes a pause that can result in a -1 frameshift. Whether it makes a -1 frameshift or not, the ribosome then unfolds the FSS when continuing translation. The spacing between ribosomes on the mRNA is determined by the rate of translation initiation and, depending upon the distance between the elongating ribosomes, the FSS will refold or not between the passage of the ribosomes. The results analyzed below were obtained with Jurkat T cells, but comparable results were obtained with HEK 293T cells. A strong increase in the frameshift efficiency is observed in presence of the complete 5'UTR, or of only the TAR-Poly(A) stem-loops, whereas a smaller increase is seen with the HIV-1 5'UTR devoid of TAR-Poly(A). As mentioned in the Introduction, it has been known for a long time that the 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA decreases translation initiation and we show here that an increase in HIV-1 frameshift efficiency can be linked to that effect. When translation is cap-dependent, the presence of the TAR-Poly(A) region, by interfering with the binding of the 40S subunit to the mRNA, slows down translation initiation such that the distance

between the ribosomes provides more time for the FSS to refold between their passage. It is likely that each ribosome encounters a folded FSS and an interference with the movement of the ribosomes such as that provoked by the portion of the 5'UTR following TAR-Poly(A) does not further affect the probability that a ribosome encounters a folded FSS. Consequently, a comparable frameshift efficiency is observed in presence of TAR-Poly(A), with or without the rest of HIV-1 full-length mRNA 5'UTR. Most studies on programmed ribosomal frameshifts were carried out with cassettes encompassing the slippery site and flanking sequence in the RNA whose translation can involve a frameshift. No attention was paid to the possible effect of distant sequence features of this mRNA. There are however notable exceptions such as the work of the group of Miller (Barry and Miller 2002), demonstrating that an interaction between a structure 4kb distant from the shift site and a structure downstream this shift site influences the frameshift in Barley yellow dwarf virus RNA. Also, a recent study by Kurian et al. (2011) investigated the synthesis of *S.cerevisiae* ornithine decarboxylase antizyme, a protein which controls the level of polyamines and whose synthesis depends upon a ribosomal frameshift. They demonstrated that the N-terminal part of the antizyme controls the completion of the synthesis of this protein, thus indirectly involving the portion of the antizyme mRNA coding for this N-terminal part in this control. The present study emphasizes the importance of the 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA for an event that occurs at a large distance but is nevertheless influenced by this region via an effect on the translation rate, which determines whether a ribosome will encounter or not a folded FSS.

In absence of TAR, the Tat viral protein increases the rate of translation and decreases the frameshift efficiency with our dual-luciferase reporters. The same type of response is seen in presence of TAR but it is more pronounced. The absence of TAR corresponds to the situation observed with the control plasmid and plasmid p Δ TP-5'UTR-HIV and the effect of Tat can be explained by the fact that it competes with eIF2 for phosphorylation or inhibits PKR (reviewed in Clerzius et al. 2011). With TAR-containing reporter mRNAs (p5'UTR-HIV and pTP-HIV), the competition with eIF2 for phosphorylation or the inhibition of PKR by Tat likely contribute to its stimulation of translation. However, this stimulation is stronger than in absence of TAR, implying that

another effect of Tat is involved. As mentioned in the Introduction, TAR interferes with the accessibility of the 5' end of the mRNA to the ribosomes and Tat was shown to antagonize this interference. An attractive suggestion is that Tat destabilizes the TAR structure, which would also contribute to its stimulation of translation with TAR-containing constructs. The mechanism for this destabilization is still hypothetical. It does not seem that Tat interacts with TAR in the cytoplasm since its tight specific binding to TAR in the nucleus requires the presence of a nuclear protein, cyclin T (Luo and Peterlin 1993; Stauber and Pavlakis 1998; Wei et al. 1998). A simple model that accounts for the effect of Tat on the translation of TAR-containing mRNAs would be that it is mostly exerted in the nucleus by stimulating the expression of specific proteins, which then counteract the blockade exerted by TAR on translation in the cytoplasm. This requires the capacity of Tat to interact with various proteins such as transcription factors, a property which is likely missing in the TatK41T mutant, which does not affect translation and frameshift efficiency and is altered in a domain of interaction with several cellular proteins. We propose that Tat indirectly destabilizes TAR by increasing the amount of RNA helicases, such as DDX3 and RHA, which stimulate HIV-1 mRNA translation. Other cellular proteins that destabilize the TAR stem-loop could also participate to this effect. We cannot explain the discrepancy in the literature concerning the antagonist effect of Tat on TAR in translation in cultured cells. That the effect of Tat was not seen in reticulocyte lysates makes sense since such system is inappropriate if the effect of Tat depends upon upregulation of DDX3 and RHA. The same comment can apply to the *Xenopus* oocytes. Interestingly, Tat was recently found to increase translation of its own mRNA, which possesses a truncated version of HIV-1 full-length mRNA 5'UTR including the TAR stem-loop (Charnay et al. 2009). This increase was not seen in a reticulocyte lysate but in cultured HeLa cells.

HIV-1 full-length mRNA possesses the characteristics allowing two modes of initiation to be used: a cap-dependent and an IRES-dependent mode. However, when both initiation modes are available, the cap-dependent mode seems to be highly favoured. Indeed, the frameshift efficiency corresponding to the IRES-dependent initiation mode is much smaller than that observed with the cap-dependent initiation mode. However, the frameshift efficiency for the construct containing the complete 5'UTR with the IRES is

comparable to that observed for the construct lacking the IRES region and containing only the TAR-Poly(A) region at its 5' end. Also, introduction of mutations in the complete HIV-1 full-length mRNA 5'UTR that increase or decrease the activity of HIV-1 IRES by two-fold did not affect the frameshift efficiency. These observations strongly support that the IRES is not used or weakly used under standard conditions of cellular growth. A similar conclusion was reached by Berkhout et al. (2011), using a mutagenesis approach. However, the IRES could become important under conditions triggered by the viral infection, in line with the findings of Brasey et al. (2003) and Vallejos et al. (2011), showing that HIV-1 IRES is active under specific conditions, such as when the cell cycle is blocked in the G2/M phase, and requires stimulatory factors present during this phase of the cell cycle. We found that, when the Rluc-Fluc reporter was translated exclusively via the IRES contained within the 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA, its translation efficiency was low, being smaller than that of a reporter containing the TAR-Poly(A) region or the complete 5'UTR of HIV-1 mRNA. This observation contrasts with the fact that the frameshift efficiency corresponding to the use of the IRES was comparable to that obtained with the control pDual-HIV* plasmid and, therefore, much lower than that of the reporters containing TAR-Poly(A). This suggests that only a fraction of the ribosomes encounter the folded FSS when the IRES is used, in spite of their low translation efficiency. The IRES-dependent initiation depends upon the conformation of the IRES (Fitzgerald and Semler 2009; Hellen 2009). One can hypothesize that the IRES oscillates between various conformations but in the period of time during which it adopts an active conformation, a bunch of ribosomes bind quickly. These few ribosomes that succeeded in initiating are close together and the FSS does not have time to refold between their passage, accounting for the low frameshift efficiency. When a cap-dependent initiation is possible, the adoption of an active IRES conformation must be much rarer due to the movement of the scanning ribosomes across the IRES sequence. Interestingly, Tat also increases the translation efficiency when the IRES-dependent initiation is used. This increase could result in part from the upregulation by Tat of proteins optimizing the conformation of the IRES. It is worth mentioning that upregulation of the RNA helicase DDX3 by Tat was recently shown to stimulate HIV-1 IRES activity (Liu et al. 2011).

The frameshift event constitutes an interesting target for the development of novel anti-HIV drugs. We observed in this study that the frameshift efficiency is extremely sensitive to the concentration of Tat. It is however unlikely that the concentration of Tat remains invariable during the viral replication cycle. This raises the point that there should be a range of frameshift efficiencies that are compatible with the virus replication. It has been shown that a decrease in frameshift efficiency handicaps HIV-1 replication (Telenti et al. 2002; Dulude et al. 2006) and it had been assumed that either decreasing or increasing the frameshift efficiency would interfere with HIV-1 replication (see Dinman and Wickner 1992). We propose that there is a minimal value providing a Gag-Pol/Gag ratio appropriate for virus replication. Decreasing this frameshift efficiency below the minimal value would interfere with the virus replication but increasing this frameshift efficiency should be tolerated to a given extent. This is in agreement with studies from the group of Yamamoto (Miyachi et al. 2006) and from our group (Dulude et al. submitted) showing that doubling HIV-1 frameshift efficiency does not handicap viral replication. Under these conditions, Dulude et al. also showed that the incorporation of Gag-Pol within the virions was unchanged. However, Shehu-Xhilaga et al. (2001) had shown that a greater increase in frameshift efficiency (about four-fold) decreases the infectivity of the virions and this decrease was related to a perturbation in the dimerization of HIV-1 genomic RNA. All these observations combined with our results have implications for the development of drugs targeting the HIV-1 frameshift, since it is not sufficient to alter the frameshift efficiency with a given drug to handicap the virus replication but it is important to bring this efficiency outside values acceptable for the viral replication.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

The frameshift efficiency was measured using plasmids which contain a dual-luciferase reporter based on a system pioneered by Atkins and coworkers (Grentzmann et al. 1998). Briefly, the HIV-1 frameshift region (nt 1608 to 1685 according to pLAI, a vector expressing a molecular clone of HIV-1 group M subtype B proviral DNA (Peden et al. 1991)) is inserted between the Rluc and the Fluc such that every ribosome that initiates

translation of the reporter mRNA produces Rluc but only those that make a -1 frameshift in the frameshift region produce Fluc (as a Rluc-Fluc fusion protein). Derivatives of pDual-HIV(-1) (Dulude et al. 2006) with a modified 5'UTR upstream of the Rluc were created. Briefly, p5'UTR-HIV contains the complete 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA (nt 1 to 335 from pLAI, where nt 1 corresponds to the transcription start point). p Δ TP-5'UTR-HIV contains a portion of the 5'UTR region of HIV-1 full-length mRNA lacking the TAR and Poly(A) structures but containing the HIV 1 IRES region (nt 95 to 335 in pLAI). Plasmid pTP-HIV contains HIV-1 TAR-Poly(A) region (nt 1 to 106 according to pLAI). In pCAT-5'UTR-HIV, the translation initiation of the luciferases was made IRES-dependent by adding the bacterial chloramphenicol acetyltransferase (CAT) coding sequence upstream of the 5'UTR in p5'UTR-HIV. Finally, the control pDual-HIV* contains a short and unstructured 5'UTR. In all derivatives, the first 30 nt of *gag* after the initiator codon and a 30 nt glycine-rich linker were added between the AUG initiator codon and the Rluc coding sequence. (see Supplementary Materials for all the details and the primers used for these constructs). In-frame derivatives (0 constructs) of pDual-HIV*, pTP-HIV, p5'UTR-HIV and p Δ TP-5'UTR-HIV, where the coding sequences of Rluc and Fluc are in frame were also created. This was done by using pDual-HIV(0) that contains HIV-1 frameshift region (Dulude et al. 2006). In this plasmid, an adenine was added after the slippery sequence of HIV-1 frameshift region and the slippery sequence was inactivated by mutagenesis to CUUCCUC. The frameshift region of pDual-HIV(0) was extracted with BsaBI and BamHI and inserted into pDual-HIV*, pTP-HIV, p5'UTR-HIV and p Δ TP-5'UTR-HIV digested with these enzymes.

Plasmid pFRT-Tat was derived from pCMV1-Tat (Gatignol et al. 1991). It expresses a Tat protein of 86 amino acids, which contains a HA tag. The Tat-coding fragment was amplified by PCR, using primers KK and LL (see Supplementary Table) and the fragment was inserted into the KpnI and the BamHI sites of pcDNA5/FRT (Invitrogen). The 86 amino acid form of Tat, which is frequently used in studies on Tat, corresponds to a C-terminal truncated form of the natural full-length 101 amino acid Tat form and was

obtained with a number of laboratory-passaged viral strains such as pLAI, pHXB2 and pN4-L3 (Jeang et al. 1999).

Transfection of CD4+ Jurkat T cells

CD4+ Jurkat T cells were maintained in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% (v/v) FBS (Wisent). Transfection of these cells was made by electroporation, using the NeonTM transfection system (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1.25 µg of DNA was mixed with 2×10^6 cells and subjected to one pulse of 1150 V for 40 ms. Two transfections were mixed per well of a 6-well plate. For assays with pFRT-Tat, co-transfections were performed with 1 µg of dual-luciferase reporters and increasing amounts of pFRT-Tat ranging from 0 to 4 µg. An empty plasmid, pcDNA5/FRT, was added, when required, to maintain an equivalent DNA input. The cells were harvested 24h post-transfection.

Transfection of HEK 293T cells

HEK 293T cells (human embryonic kidney cells transformed with adenovirus and simian virus 40 large-T) were maintained in DMEM (Wisent) supplemented with 10% (v/v) FBS (Wisent). Transfections were performed with 1 µg of dual-luciferase reporters per well, in 6-well plates containing HEK 293T cells (3×10^5) prepared one day before transfection, using polyethylenimine (PEI) (Polysciences, Inc.) as described before (Gendron et al. 2008). The cells were harvested 48h post-transfection.

Luciferase assays

The Fluc and the Rluc activities of the constructs were measured as relative light units with a Hidex Triathler multilabel tester, as previously described (Gendron et al. 2011). A Dual-Luciferase Reporter Assay System kit (Promega) was used, following the manufacturer's protocol. The relative frameshift efficiency is assessed by the ratio of the Fluc activity to the Rluc activity (Fluc/Rluc).

Real-time quantitative PCR (qPCR)

The Rluc mRNA expression was measured relative to that of GAPDH mRNA. To this end, total RNA was isolated, using the Trizol reagent (Invitrogen Corporation), from CD4+ Jurkat T cells or HEK 293T cells transfected with the different plasmids, following the manufacturer's protocol. DNase I (Fermentas) was then used to remove DNA from the extract and cDNA was generated, using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) with 1 µg of total RNA. Real-time analyses were performed on a Light Cycler 480 multi-well plate 96 (Roche Diagnostics) in a final volume of 10 µL. The reaction samples contained SYBR Green Supermix (BioRad) 2X, 0.125 µM of each of the gene-specific primers (Rluc-fwd: 5' GCTGCCAGCAAGATCATGAGAAA 3' and Rluc-rev: 5' GCTCTCAGGTAGGCGTTGTAGTTT 3') or GAPDH (GAPDH-fwd: 5' ACATCGCTCAGACACCATG 3' and GAPDH-rev: 5' TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG 3') and 2.5 µl of 1:5 dilution of cDNA as template. All primer sets were tested prior to use in this work to ensure that only a single product was amplified. The optimal thermal cycling parameters included a pre-incubation at 95°C for 5 min; 50 cycles of amplification at 95°C for 10 s, 65°C for 15 s and 72°C for 20 s; melting curve analysis at 95°C for 5 s (segment 1), 65°C/1 min (segment 2) and 95°C/0 s (segment 3). Controls lacking reverse transcriptase showed no significant amplification.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant (HOP-86864) from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). Johanie Charbonneau and Karine Gendron acknowledge a studentship from CIHR and Gerardo Ferbeyre acknowledges a senior fellowship from FRSQ (Fonds de la Recherche en Santé du Québec). We thank Luc Desgroseillers and Dominic Dulude for critical reading of this manuscript and for stimulating discussions and numerous advices and we thank Nikolaus Heveker for his interest in this work. We also thank Anne Gatignol (Lady Davis Institute, Montreal) and Martin Holcik (University of Ottawa) for their generous gift of pCMV1-Tat and pβgal/CAT, respectively.

REFERENCES

Balvay L, Soto Rifo R, Ricci EP, Decimo D, Ohlmann T. 2009. Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim Biophys Acta* 1789: 542-557.

Bannwarth S, Gatignol A. 2005. HIV-1 TAR RNA: the target of molecular interactions between the virus and its host. *Curr HIV Res* 3: 61-71.

Barry JK, Miller WA. 2002. A -1 ribosomal frameshift element that requires base pairing across four kilobases suggests a mechanism of regulating ribosome and replicase traffic on a viral RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11133-11138.

Berkhout B. 1996. Structure and function of the human immunodeficiency virus leader RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 54: 1-34.

Berkhout B, Arts K, Abbink TE. 2011. Ribosomal scanning on the 5'-untranslated region of the human immunodeficiency virus RNA genome. *Nucleic Acids Res* 39: 5232-5244.

Bolinger C, Sharma A, Singh D, Yu L, Boris-Lawrie K. 2010. RNA helicase A modulates translation of HIV-1 and infectivity of progeny virions. *Nucleic Acids Res* 38: 1686-1696.

Braddock M, Powell R, Blanchard AD, Kingsman AJ, Kingsman SM. 1993. HIV-1 TAR RNA-binding proteins control TAT activation of translation in *Xenopus* oocytes. *FASEB J* 7: 214-222.

Brady J, Kashanchi F. 2005. Tat gets the "green" light on transcription initiation. *Retrovirology* 2: 69.

Brakier-Gingras L, Dulude D. 2010. Programmed -1 ribosomal frameshift in the human immunodeficiency virus of type 1. In *Recoding: Expansion of Decoding Rules Enriches Gene Expression*, (ed. J Atkins, R Gesteland), pp. 175-192. Springer, New York, NY.

Brasey A, Lopez-Lastra M, Ohlmann T, Beerens N, Berkhout B, Darlix JL, Sonenberg N. 2003. The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA

harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle. *J Virol* 77: 3939-3949.

Bres V, Kiernan R, Emiliani S, Benkirane M. 2002. Tat acetyl-acceptor lysines are important for human immunodeficiency virus type-1 replication. *J Biol Chem* 277: 22215-22221.

Brierley I, Dos Ramos FJ. 2006. Programmed ribosomal frameshifting in HIV-1 and the SARS-CoV. *Virus Res* 119: 29-42.

Cai R, Carpick B, Chun RF, Jeang KT, Williams BR. 2000. HIV-I TAT inhibits PKR activity by both RNA-dependent and RNA-independent mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 373: 361-367.

Chamond N, Locker N, Sargueil B. 2010. The different pathways of HIV genomic RNA translation. *Biochem Soc Trans* 38: 1548-1552.

Chang YN, Kenan DJ, Keene JD, Gatignol A, Jeang KT. 1994. Direct interactions between autoantigen La and human immunodeficiency virus leader RNA. *J Virol* 68: 7008-7020.

Charnay N, Ivanyi-Nagy R, Soto-Rifo R, Ohlmann T, López-Lastra M, Darlix J-L. 2009. Mechanism of HIV-1 Tat RNA translation and its activation by the Tat protein. *Retrovirology* 6: 74.

Chin DJ, Selby MJ, Peterlin BM. 1991. Human immunodeficiency virus type 1 Tat does not transactivate mature trans-acting responsive region RNA species in the nucleus or cytoplasm of primate cells. *J Virol* 65: 1758-1764.

Clerzius G, Gelinis JF, Gatignol A. 2011. Multiple levels of PKR inhibition during HIV-1 replication. *Rev Med Virol* 21: 42-53.

Cullen BR. 1986. Trans-activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism. *Cell* 46: 973-982.

Dingwall C, Ernberg I, Gait MJ, Green SM, Heaphy S, Karn J, Lowe AD, Singh M, Skinner MA. 1990. HIV-1 tat protein stimulates transcription by binding to a U-rich bulge in the stem of the TAR RNA structure. *EMBO J* 9: 4145-4153.

Dinman JD, Wickner RB. 1992. Ribosomal frameshifting efficiency and gag/gag-pol ratio are critical for yeast M1 double-stranded RNA virus propagation. *J Virol* 66: 3669-3676.

Dorin D, Bonnet MC, Bannwarth S, Gatignol A, Meurs EF, Vaquero C. 2003. The TAR RNA-binding protein, TRBP, stimulates the expression of TAR-containing RNAs in vitro and in vivo independently of its ability to inhibit the dsRNA-dependent kinase PKR. *J Biol Chem* 278: 4440-4448.

Doudna JA, Sarnow P. 2007. Translation Initiation by Viral Internal Ribosome Entry Sites. In *Translational Control in Biology and Medicine*, (ed. MB Mathews, N Sonenberg, JWB Hershey), pp. 129-153. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.

Dugre-Brisson S, Elvira G, Boulay K, Chatel-Chaix L, Mouland AJ, DesGroseillers L. 2005. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res* 33: 4797-4812.

Dulude D, Baril M, Brakier-Gingras L. 2002. Characterization of the frameshift stimulatory signal controlling a programmed -1 ribosomal frameshift in the human immunodeficiency virus type 1. *Nucleic Acids Res* 30: 5094-5102.

Dulude D, Berchiche YA, Gendron K, Brakier-Gingras L, Heveker N. 2006. Decreasing the frameshift efficiency translates into an equivalent reduction of the replication of the human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 345: 127-136.

Dulude D, Guenier A-S, Duchaine J, Iannello A, Ahmad A, Lamarre D, Brakier-Gingras L, Heveker N. 2011. Screening for HIV-1 frameshift modulators: a new hydrazide compound increases frameshift efficiency and viral replication. Submitted to *PLoS Biol*.

Fitzgerald KD, Semler BL. 2009. Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus. *Biochim Biophys Acta* 1789: 518-528.

Fujii R, Okamoto M, Aratani S, Oishi T, Ohshima T, Taira K, Baba M, Fukamizu A, Nakajima T. 2001. A Role of RNA Helicase A in cis-Acting Transactivation Response Element-mediated Transcriptional Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Biol Chem* 276: 5445-5451.

Gatignol A. 2007. Transcription of HIV: Tat and cellular chromatin. *Adv Pharmacol* 55: 137-159.

Gatignol A, Buckler-White A, Berkhout B, Jeang KT. 1991. Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. *Science* 251: 1597-1600.

Gaudin C, Mazauric MH, Traikia M, Guittet E, Yoshizawa S, Fourmy D. 2005. Structure of the RNA signal essential for translational frameshifting in HIV-1. *J Mol Biol* 349: 1024-1035.

Gautier VW, Gu L, O'Donoghue N, Pennington S, Sheehy N, Hall WW. 2009. In vitro nuclear interactome of the HIV-1 Tat protein. *Retrovirology* 6: 47.

Geballe AP, Gray MK. 1992. Variable inhibition of cell-free translation by HIV-1 transcript leader sequences. *Nucleic Acids Res* 20: 4291-4297.

Gebauer F, Hentze MW. 2004. Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 827-835.

Gendron K, Charbonneau J, Dulude D, Heveker N, Ferbeyre G, Brakier-Gingras L. 2008. The presence of the TAR RNA structure alters the programmed -1 ribosomal frameshift efficiency of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by modifying the rate of translation initiation. *Nucleic Acids Res* 36: 30-40.

Gendron K, Ferbeyre G, Heveker N, Brakier-Gingras L. 2011. The activity of the HIV-1 IRES is stimulated by oxidative stress and controlled by a negative regulatory element. *Nucleic Acids Res* 39: 902-912.

Grentzmann G, Ingram JA, Kelly PJ, Gesteland RF, Atkins JF. 1998. A dual-luciferase reporter system for studying recoding signals. *RNA* 4: 479-486.

Hellen CUT. 2009. IRES-induced conformational changes in the ribosome and the mechanism of translation initiation by internal ribosomal entry. *Biochim Biophys Acta* 1789: 558-570.

Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, Varmus HE. 1988. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 331: 280-283.

Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 113-127.

Jeang KT, Xiao H, Rich EA. 1999. Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J Biol Chem* 274: 28837-28840.

Johri MK, Mishra R, Chhatbar C, Unni SK, Singh SK. 2011. Tits and bits of HIV Tat protein. *Expert Opin Biol Ther* 11: 269-283.

Kim YS, Risser R. 1993. TAR-independent transactivation of the murine cytomegalovirus major immediate-early promoter by the Tat protein. *J Virol* 67: 239-248.

Kuppuswamy M, Subramanian T, Srinivasan A, Chinnadurai G. 1989. Multiple functional domains of Tat, the trans-activator of HIV-1, defined by mutational analysis. *Nucleic Acids Res* 17: 3551-3561.

Kurian L, Palanimurugan R, Godderz D, Dohmen RJ. 2011. Polyamine sensing by nascent ornithine decarboxylase antizyme stimulates decoding of its mRNA. *Nature* 477: 490-494.

Leger M, Dulude D, Steinberg SV, Brakier-Gingras L. 2007. The three transfer RNAs occupying the A, P and E sites on the ribosome are involved in viral programmed -1 ribosomal frameshift. *Nucleic Acids Res* 35: 5581-5592.

Liao PY, Choi YS, Dinman JD, Lee KH. 2011. The many paths to frameshifting: kinetic modelling and analysis of the effects of different elongation steps on programmed -1 ribosomal frameshifting. *Nucleic Acids Res* 39: 300-312.

Liu J, Henao-Mejia J, Liu H, Zhao Y, He JJ. 2011. Translational regulation of HIV-1 replication by HIV-1 Rev cellular cofactors Sam68, eIF5A, hRIP, and DDX3. *J Neuroimmune Pharmacol* 6: 308-321.

Lopez-Lastra M, Rivas A, Barria MI. 2005. Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol Res* 38: 121-146.

Luo Y, Peterlin BM. 1993. Juxtaposition between activation and basic domains of human immunodeficiency virus type 1 Tat is required for optimal interactions between Tat and TAR. *J Virol* 67: 3441-3445.

Miele G, Moulard A, Harrison GP, Cohen E, Lever AM. 1996. The human immunodeficiency virus type 1 5' packaging signal structure affects translation but does not function as an internal ribosome entry site structure. *J Virol* 70: 944-951.

Miyauchi K, Komano J, Myint L, Futahashi Y, Urano E, Matsuda Z, Chiba T, Miura H, Sugiura W, Yamamoto N. 2006. Rapid propagation of low-fitness drug-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 by a streptococcal metabolite sparsomycin. *Antivir Chem Chemother* 17: 167-174.

Namy O, Moran SJ, Stuart DI, Gilbert RJ, Brierley I. 2006. A mechanical explanation of RNA pseudoknot function in programmed ribosomal frameshifting. *Nature* 441: 244-247.

Pacheco A, Martinez-Salas E. 2010. Insights into the biology of IRES elements through riboproteomic approaches. *J Biomed Biotechnol* 2010: 458927.

Parkin NT, Cohen EA, Darveau A, Rosen C, Haseltine W, Sonenberg N. 1988. Mutational analysis of the 5' non-coding region of human immunodeficiency virus type 1: effects of secondary structure on translation. *EMBO J* 7: 2831-2837.

Peden K, Emerman M, Montagnier L. 1991. Changes in growth properties on passage in tissue culture of viruses derived from infectious molecular clones of HIV-1LAI, HIV-1MAL, and HIV-1ELI. *Virology* 185: 661-672.

Pestova TV, Lorsh JR, Hellen CUT. 2007. The Mechanism of Translation Initiation in Eukaryotes. In *Translational Control in Biology and Medicine*, (ed. MB Mathews, N Sonenberg, JWB Hershey), pp. 87-128. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.

Pugliese A, Vidotto V, Beltramo T, Petrini S, Torre D. 2005. A review of HIV-1 Tat protein biological effects. *Cell Biochem Funct* 23: 223-227.

Ricci EP, Soto Rifo R, Herbreteau CH, Decimo D, Ohlmann T. 2008. Lentiviral RNAs can use different mechanisms for translation initiation. *Biochem Soc Trans* 36: 690-693.

Romani B, Engelbrecht S, Glashoff RH. 2009. Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* 91: 1-12.

SenGupta DN, Berkhout B, Gatignol A, Zhou AM, Silverman RH. 1990. Direct evidence for translational regulation by leader RNA and Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7492-7496.

Shehu-Xhilaga M, Crowe SM, Mak J. 2001. Maintenance of the Gag/Gag-Pol ratio is important for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization and viral infectivity. *J Virol* 75: 1834-1841.

Sonenberg N, Hinnebusch AG. 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136: 731-745.

Staple DW, Butcher SE. 2005. Solution structure and thermodynamic investigation of the HIV-1 frameshift inducing element. *J Mol Biol* 349: 1011-1023.

Stauber RH, Pavlakis GN. 1998. Intracellular trafficking and interactions of the HIV-1 Tat protein. *Virology* 252: 126-136.

Svitkin YV, Pause A, Sonenberg N. 1994. La autoantigen alleviates translational repression by the 5' leader sequence of the human immunodeficiency virus type 1 mRNA. *J Virol* 68: 7001-7007.

Takyar S, Hickerson RP, Noller HF. 2005. mRNA helicase activity of the ribosome. *Cell* 120: 49-58.

Telenti A, Martinez R, Munoz M, Bleiber G, Greub G, Sanglard D, Peters S. 2002. Analysis of natural variants of the human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshift stem-loop structure. *J Virol* 76: 7868-7873.

Vallejos M, Deforges J, Plank TD, Letelier A, Ramdohr P, Abraham CG, Valiente-Echeverria F, Kieft JS, Sargueil B, Lopez-Lastra M. 2011. Activity of the human immunodeficiency virus type 1 cell cycle-dependent internal ribosomal entry site is modulated by IRES trans-acting factors. *Nucleic Acids Res* 39: 6186-6200.

Van Duyne R, Kehn-Hall K, Carpio L, Kashanchi F. 2009. Cell-type-specific proteome and interactome: using HIV-1 Tat as a test case. *Expert Rev Proteomics* 6: 515-526.

Wei P, Garber ME, Fang SM, Fischer WH, Jones KA. 1998. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* 92: 451-462.

Wilkinson KA, Gorelick RJ, Vasa SM, Guex N, Rein A, Mathews DH, Giddings MC, Weeks KM. 2008. High-throughput SHAPE analysis reveals structures in HIV-1 genomic RNA strongly conserved across distinct biological states. *PLoS Biol* 6: e96.

Yedavalli VS, Neuveut C, Chi YH, Kleiman L, Jeang KT. 2004. Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell* 119: 381-392.

Yilmaz A, Bolinger C, Boris-Lawrie K. 2006. Retrovirus translation initiation: Issues and hypotheses derived from study of HIV-1. *Curr HIV Res* 4: 131-139.

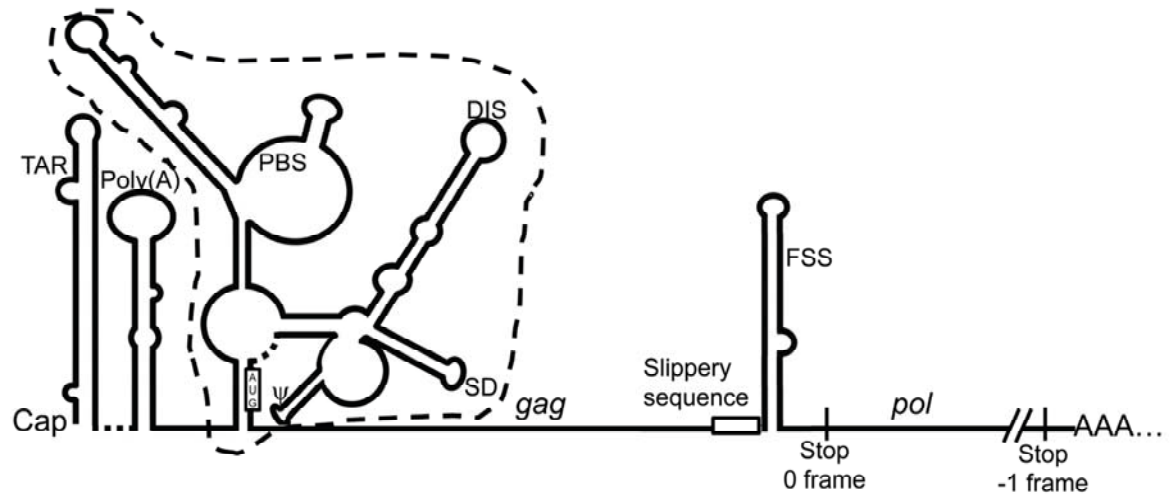
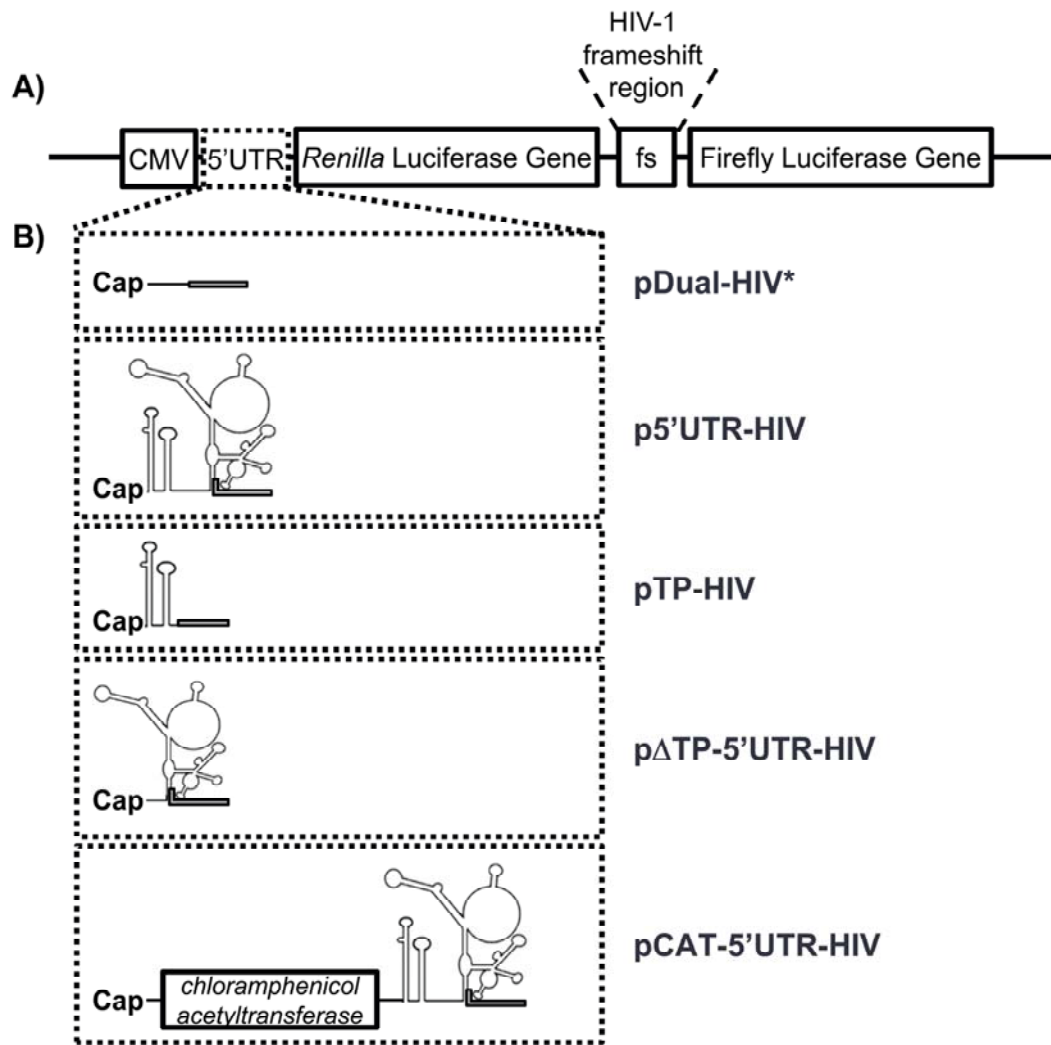


Figure 3-1 : Schematic representation of the 5'UTR and frameshifting region of HIV-1 full-length mRNA. This mRNA is capped and polyadenylated. Its 5'UTR is shown under the Weeks conformation, as adapted from Wilkinson et al. (2008). The regulatory motifs present in this region are indicated: the TAR stem-loop, the Poly(A) stem-loop containing the polyadenylation signal, the primer binding site (PBS), the dimerization initiation site (DIS), the major splice donor site (SD) and the packaging signal (ψ). The IRES encompasses the region delineated by the dashed line. The AUG initiator codon of *gag* is boxed. The rest of the mRNA is represented by a thin line except for HIV-1 frameshift region. The slippery sequence, UUUUUUA, where the frameshift takes place, is indicated, followed by the frameshift stimulatory signal (FSS). The *gag* coding region is delineated by the AUG initiator codon and the stop codon in the zero frame. The *pol* coding sequence is delineated by the slippery sequence and the stop codon in the -1 frame.

Figure 3-2 : Scheme of the vectors used to assess HIV-1 frameshift efficiency. (A) Representation of a dual-luciferase reporter. All the reporters used in this study are derivatives of this dual-luciferase reporter, which differ in their 5'UTR. They contain the *Renilla* (Rluc) and the firefly luciferase (Fluc) coding sequences, under control of a CMV promoter, and separated by the HIV-1 frameshift region (nt 1608 to 1685 in pLAI). Rluc is synthesized by all the ribosomes translating the mRNA whereas Fluc is synthesized, as a fusion to Rluc, only by ribosomes that make a -1 frameshift in the frameshift region. (B) Details on the 5'UTR of the different reporter mRNAs used in this study. Plasmid pDual-HIV* has a short and unstructured 5'UTR. Plasmid p5'UTR-HIV contains the complete 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA (nt 1 to 335 in pLAI). Plasmid pTP-HIV contains the beginning of the 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA encompassing the TAR and Poly(A) structures (nt 1 to 106 in pLAI). Plasmid pΔTP-5'UTR-HIV contains a part of HIV-1 full-length mRNA 5'UTR (nt 95 to 335 in pLAI), which encompasses HIV-1 IRES but not TAR and Poly(A). Finally, plasmid pCAT-5'UTR-HIV was designed such that translation of the CAT sequence results from a cap-dependent initiation whereas the production of the luciferases, preceded by the 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA, results from an IRES-dependent initiation. In pDual-HIV* and pTP-HIV, only the cap-dependent initiation is available. In pΔTP-5'UTR-HIV and p5'UTR-HIV, both cap- and IRES-dependent initiations could be possible. In all the plasmids, the AUG initiator codon for Rluc is followed by the first 30 nt from the *gag* coding region. Also, an oligonucleotide coding for a peptide linker was inserted between the nt from *gag* and the beginning of the Rluc coding sequence. The AUG codon, the 30 nt from *gag* plus the linker are represented by an open box.



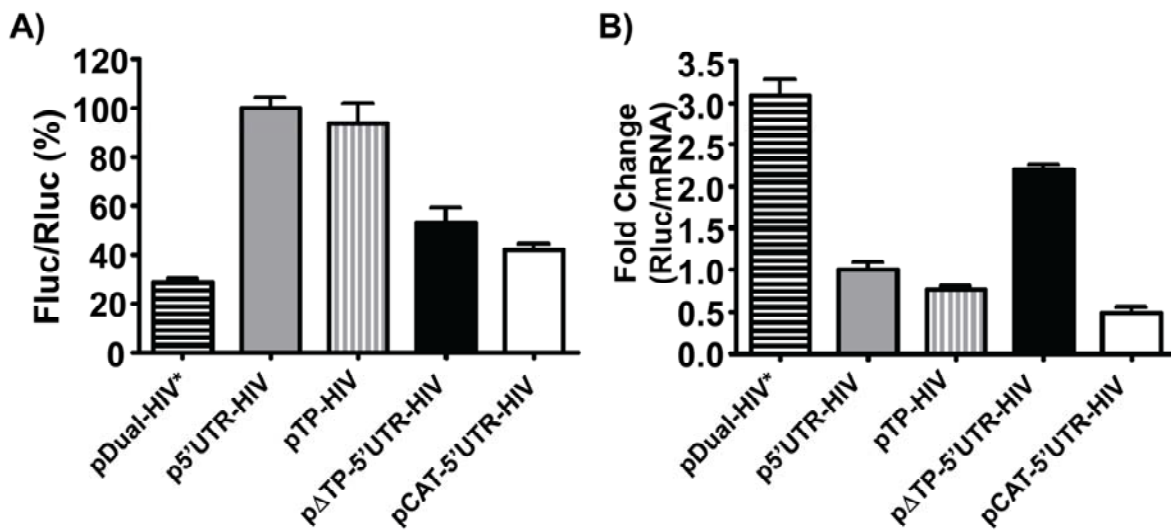


Figure 3-3 : Influence of the 5'UTR of the reporter mRNA on frameshift efficiency with a dual-luciferase system in Jurkat T cells. (A) The Fluc/Rluc ratio represents the relative frameshift efficiency corresponding to the different 5'UTRs inserted upstream of the dual-luciferase coding sequences. The Fluc/Rluc ratios are presented relative to the p5'UTR-HIV construct, with the complete 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA, which is arbitrarily set at 100%. Each value represents the mean \pm SEM of at least three independent triplicate experiments. (B) Effect of the 5'UTR on translation efficiency. The Rluc activities were divided by the corresponding mRNA levels which were quantified by qPCR. The Rluc/mRNA ratios are presented relative to the p5'UTR-HIV construct, which is arbitrarily set at 1. Rluc/mRNA ratios were measured in triplicate and one representative experiment is shown.

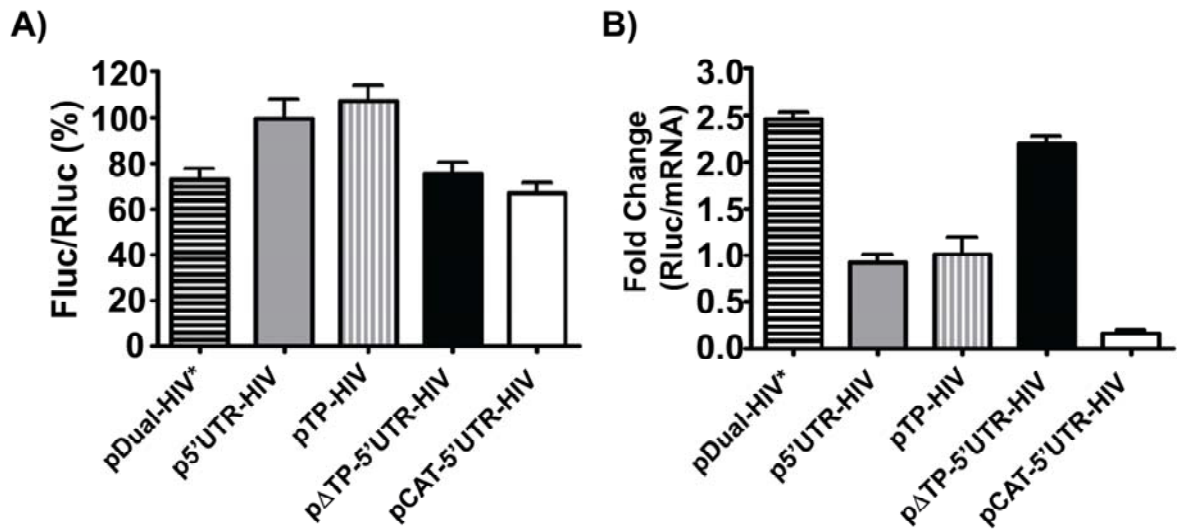


Figure 3-4 : HIV-1 frameshifting relative to the type of 5'UTR of the dual-luciferase reporter mRNA in HEK 293T cells. (A) The Fluc/Rluc ratio represents the relative frameshift efficiency, which was arbitrarily set at 100% for p5'UTR-HIV. Each value represents the mean \pm SEM of at least three independent triplicate experiments. (B) The Rluc activities were divided by the level of mRNA quantified by qPCR. The Rluc/mRNA ratio is shown relative to the p5'UTR-HIV, which was arbitrarily set at 1. Rluc/mRNA ratios were measured in triplicate and one representative experiment is shown.

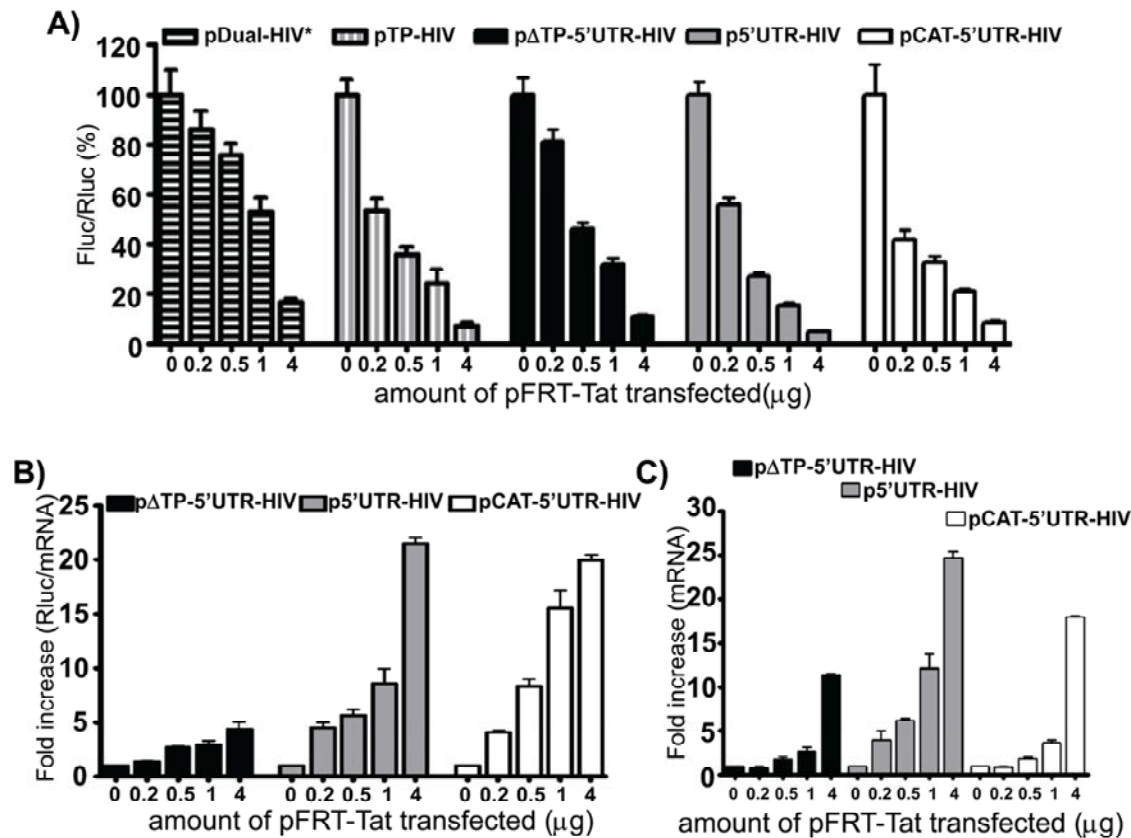


Figure 3-5 : Tat decreases HIV-1 frameshift efficiency in a dose-dependent manner. (A) The Fluc/Rluc ratio was assessed in lysates from Jurkat T cells co-transfected with pFRT-Tat and pDual-HIV*, pTP-HIV, pΔTP-5'UTR-HIV, p5'UTR-HIV or pCAT-5'UTR-HIV. The Fluc/Rluc ratio is presented relative to its value in absence of Tat, which is set at 100% for each construct. Results are the mean \pm SEM of at least three independent triplicate experiments. (B and C) Co-transfection with pFRT-Tat and pΔTP-5'UTR-HIV, p5'UTR-HIV or pCAT-5'UTR-HIV. (B) Impact of Tat on translation efficiency. The Rluc activity was divided by the level of Rluc mRNA quantified by qPCR. The Rluc/mRNA ratio is presented relatively to the value in absence of Tat, which is set arbitrarily at 1. Rluc/mRNA ratios were measured in triplicate and one representative experiment is shown. (C) Relative expression of the dual-luciferase mRNA in presence of Tat. The value in absence of Tat was arbitrarily set at 1. The mRNA levels were quantified in cell lysates by qPCR. The analysis was performed in triplicate and one representative experiment is shown.

Chapitre 4

Discussion

Le fonctionnement du déphasage ribosomique programmé -1 du VIH-1 se précise suite à de nombreuses études sur sa caractérisation. Ce déphasage est responsable de la synthèse du précurseur des enzymes virales, Gag-Pol, lors de la traduction de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1. Une minorité de ribosomes effectuent ce déphasage, alors que la majorité des ribosomes traduisent cet ARNm de manière conventionnelle, ce qui permet la production du précurseur des protéines de structure, Gag. La région de déphasage de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 comprend la séquence glissante, qui est telle que les anticodons des ARNt portés par le ribosome peuvent se réappairier aux codons de l'ARNm dans le cadre de lecture -1. Cette région comprend aussi le signal stimulateur de déphasage (SSF) en aval de la séquence glissante. Le SSF du VIH-1 est une tige-boucle irrégulière qui contrôle l'efficacité de ce déphasage et dont la présence est indispensable pour que le déphasage ait lieu. Un mécanisme a été proposé sur la base des données expérimentales, selon lequel le déphasage résulte d'une translocation incomplète. Cependant, les recherches sur le déphasage se basent généralement sur l'utilisation de rapporteurs contenant la région de déphasage du VIH-1 insérée entre deux cistrons, en dehors du contexte de l'ARNm pleine-longueur dont elle provient. Afin d'approfondir notre compréhension du mécanisme de déphasage chez le VIH-1, nous avons voulu déterminer si d'autres régions de l'ARNm pleine-longueur viral influencent l'efficacité de déphasage. Nous avons décidé d'étudier l'influence de la région 5' non traduite (5'UTR) de cet ARNm et l'avons introduite en 5' de notre ARNm rapporteur. Nous avons aussi étudié l'influence de la protéine virale Tat qui a plusieurs effets dans les cellules infectées, autant au niveau de la répllication virale qu'au niveau de la vie cellulaire. Cependant, dans un premier temps, bien que le déphasage se produise durant l'étape d'élongation de la traduction, nous avons examiné si des variations du taux d'initiation de la traduction influencent l'efficacité de déphasage. En effet, l'étape

d'initiation est l'étape limitante de la traduction et il est donc possible qu'elle affecte un événement se produisant dans les étapes subséquentes (Mathews et al. 2007).

Afin de déterminer l'efficacité de déphasage, nous avons utilisé un rapporteur dual-luciférase standard, codant pour les luciférases de la *Renilla* (Rluc) et de la luciole (Fluc). Les séquences codant pour ces deux rapporteurs sont séparées par la région de déphasage du VIH-1. La Rluc est produite par tous les ribosomes traduisant l'ARNm rapporteur, alors que la Fluc est produite uniquement par les ribosomes changeant de cadre de lecture, en reculant d'une base, au niveau de la séquence glissante de la région de déphasage du VIH-1. Ce rapporteur est nommé rapporteur -1. Un second rapporteur, le rapporteur 0, dans lequel la Fluc est dans le même cadre de lecture que la Rluc et, qui est donc exprimée par traduction conventionnelle, est utilisé pour évaluer l'efficacité de déphasage. Des cellules Jurkat-T et des cellules HEK 293T ont été transfectées avec ces rapporteurs. Nous avons mesuré une efficacité de déphasage de 11 % dans les deux articles présentés dans cette thèse pour les cellules HEK 293T. En ce qui concerne les Jurkat-T, nous avons obtenu une efficacité de déphasage de 6 % dans le premier article et de 9 % dans le deuxième article. Cette différence entre les efficacités de déphasage peut s'expliquer par l'utilisation d'une méthode de transfection plus efficace et moins nocive pour les cellules dans le second article. Il faut remarquer que les valeurs absolues des mesures d'efficacité de déphasage fournissent une information intéressante. Elles nous montrent notamment qu'il y a une différence entre les HEK 293T et les Jurkat-T. Mais il faut prendre ces valeurs absolues avec un grain de sel, car, dans un même système cellulaire, elles peuvent varier si l'on change de rapporteurs. Par contre, les différences entre la situation dans les Jurkat-T et les HEK 293T sont toujours observées et, de même, les conditions expérimentales qui font varier l'efficacité de déphasage avec un rapporteur dual-luciférase donnent les mêmes résultats si l'on utilise un autre type de rapporteur bicistronique (nos observations non publiées).

Dans le premier volet de notre recherche, nous avons déterminé l'effet d'inhibiteurs de l'initiation de la traduction sur l'efficacité de déphasage du VIH-1. Des cellules Jurkat-T ont été traitées avec différents inhibiteurs de l'initiation de la traduction suite à une

transfection avec les rapporteurs dual-luciférase standards. Notons que, comme la traduction de la majorité des ARNm cellulaires, la traduction de l'ARNm rapporteur est coiffe-dépendante. Nous avons observé que la présence des inhibiteurs entraîne une augmentation de l'efficacité de déphasage d'environ deux fois comparativement à l'efficacité obtenue en leur absence. Nous avons ensuite utilisé la tige-boucle TAR, qui est située à l'extrémité 5' de tous les ARNm du VIH-1. TAR peut affecter le taux d'initiation de la traduction via deux mécanismes : elle bloque la liaison de la petite sous-unité du ribosome, la 40S, à l'ARNm et module l'activité de la kinase PKR. Dans ce premier volet de notre recherche, nous nous sommes placés dans des conditions où le seul effet de TAR sur la traduction est via PKR. Pour ce faire, TAR a été utilisée en *trans* de l'ARNm ou en *cis*, mais placée à distance de l'extrémité 5' de l'ARNm rapporteur, ce qui ne lui permet pas de bloquer la liaison de la 40S à l'ARNm. Nous avons observé que la présence d'une faible quantité de TAR peut entraîner une augmentation allant jusqu'à 1,5 fois de l'efficacité de déphasage alors que la présence d'une grande quantité de TAR peut entraîner une diminution allant jusqu'à 0,65 fois de l'efficacité de déphasage comparativement à l'efficacité de déphasage en absence de TAR. Nous avons vérifié que cet effet de TAR sur la traduction provient de son effet sur PKR, en bloquant l'expression de PKR par la technique d'interférence à l'ARN.

Dans le deuxième volet de notre recherche, nous avons étudié l'effet de la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 sur l'efficacité de déphasage. La 5'UTR peut réduire l'initiation de la traduction coiffe-dépendante, car elle est très structurée. Tel que mentionné précédemment, la tige-boucle TAR, située à l'extrémité 5' de l'ARNm et stabilisée par la présence de la tige-boucle Poly(A), interfère avec la liaison de la petite sous-unité du ribosome. Nous avons remplacé la 5'UTR de notre rapporteur dual-luciférase standard, qui est courte et non structurée, par celle de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1. Nous avons alors observé une augmentation de quatre fois de l'efficacité de déphasage, en comparaison avec l'efficacité obtenue avec le rapporteur dual-luciférase standard. Cet effet est dû à la présence de la région TAR-Poly(A) à l'extrémité 5' de l'ARNm rapporteur et non au reste de la région 5'UTR. Par ailleurs, cette 5'UTR contient également un IRES, ce qui pourrait permettre une initiation IRES-dépendante de l'ARNm. Cependant, nos résultats

suggèrent que, lorsque l'initiation coiffe-dépendante est disponible, dans des conditions physiologiques normales, elle est utilisée de préférence au mode IRES-dépendant.

Dans chacun des deux volets de notre étude, nous avons aussi déterminé l'impact de la protéine Tat du VIH-1 sur l'efficacité de déphasage. Tat stimule l'initiation de la traduction en général, et a, de plus, un effet stimulateur spécifique sur la traduction des ARNm ayant une structure TAR à leur extrémité 5'. Nous avons observé ces effets stimulateurs sur l'initiation de la traduction de nos rapporteurs en présence de Tat. Nous avons aussi utilisé un rapporteur à deux luciférases particulier où les ribosomes sont forcés d'utiliser l'IRES du VIH-1 pour exprimer les luciférases et avons trouvé que Tat augmente aussi le taux d'initiation IRES-dépendante. Dans tous les cas, l'augmentation du taux d'initiation entraîne une diminution de l'efficacité de déphasage et cet effet est dépendant de la quantité de Tat utilisée.

Nous présentons des modèles expliquant comment l'initiation de la traduction et la présence de Tat affectent l'efficacité de déphasage. Nos résultats suggèrent aussi que la réplication du VIH-1 est compatible avec une fenêtre d'efficacités de déphasage plutôt qu'avec une efficacité fixée et invariable. Il sera alors important de prendre cette observation en considération lors de recherches sur des agents anti-VIH-1 ciblant le déphasage -1.

4.1 Effet de l'initiation de la traduction sur l'efficacité de déphasage du VIH-1

Les études sur le déphasage du VIH-1 ont jusqu'à présent été effectuées avec des rapporteurs contenant uniquement la région de déphasage du VIH-1. La région de déphasage est, de ce fait, placée hors de son contexte. Cependant, d'autres régions de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 pourraient jouer un rôle dans l'efficacité de déphasage du virus. Nous avons décidé d'examiner l'effet de la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 sur l'efficacité de déphasage. Cette région très structurée interfère avec l'initiation de la traduction, une étape importante et limitante pour le processus de traduction.

Nous avons premièrement examiné si l'inhibition de l'étape d'initiation de la traduction affecte l'efficacité de déphasage. Nous avons transfecté des cellules Jurkat-T avec un rapporteur dual-luciférase standard. Ce type de cellules a été choisi parce que les cellules T sont une des cibles du VIH-1. Les cellules transfectées ont ensuite été traitées avec différents inhibiteurs de l'initiation de la traduction : l'hippuristanol, la rapamycine et la thapsigargine. Chacun de ces inhibiteurs affecte un facteur différent de l'initiation de la traduction, soit l'hélicase eIF4A qui déroule les structures secondaires de l'ARNm, le facteur eIF4E qui lie la coiffe et le facteur eIF2 qui apporte l'ARNt initiateur à la 40S, respectivement (voir section 1.4.5.2 pour le rôle de ces facteurs). En comparant les efficacités de déphasage obtenues en présence et en absence de ces inhibiteurs, nous avons observé une augmentation de l'efficacité de déphasage d'environ deux fois. Ayant ainsi démontré un lien entre l'efficacité de déphasage et l'initiation de la traduction, nous avons ensuite étudié l'effet de TAR et de Tat sur l'efficacité de déphasage, puisqu'on sait que cette structure et cette protéine affectent le taux d'initiation de la traduction.

4.1.1 Effet de la région 5'UTR sur le taux d'initiation de la traduction et sur l'efficacité de déphasage

Nous avons vu que la tige-boucle TAR est importante pour la réplication du VIH-1 (section 1.2.1.1). Elle se trouve aux extrémités 5' et 3' de tous les ARNm du VIH-1. TAR se trouve aussi sous forme libre dans le cytoplasme des cellules infectées, suite à la production de courts transcrits d'ARN lors de la transcription. En plus de son implication dans la transactivation de la transcription dans le noyau, TAR affecte le taux d'initiation de la traduction. En effet, elle module l'activité de PKR et bloque la liaison de la petite sous-unité du ribosome à l'extrémité 5' de l'ARNm. Puisque nous avons déterminé que l'inhibition de l'initiation de la traduction par différents agents affecte l'efficacité de déphasage, nous avons étudié l'impact de la présence de TAR sur l'initiation de la traduction ainsi que sur l'efficacité de déphasage.

Nous avons examiné l'effet de TAR sur le déphasage via son effet sur PKR. Pour ce faire, TAR a été placée à 40 nt de l'extrémité 5' de l'ARNm. Cette distance a été choisie afin que

TAR n'empêche pas la sous-unité 40S de se lier à l'extrémité 5' de l'ARNm. Nous avons aussi vérifié qu'une distance plus longue (90 nt) ne modifiait pas les résultats. TAR a un $\Delta G \approx -25$ kcal/mol et on sait qu'une structure stable ($\Delta G \approx -25$ à -30 kcal/mol) d'ARNm diminue l'initiation de la traduction, mais seulement lorsqu'elle se trouve à une distance de 12 nt ou moins de l'extrémité 5' (Babendure et al. 2006). Nous avons aussi examiné l'effet de TAR lorsqu'elle est ajoutée en *trans* de l'ARNm rapporteur, ce qui, évidemment, n'inhibait pas la liaison de la sous-unité 40S à l'ARNm. Nos résultats montrent que la présence d'une faible quantité de TAR entraîne une augmentation de l'efficacité de déphasage pouvant atteindre environ 150 % en comparaison avec l'efficacité de déphasage obtenu en absence de TAR. Par contre, la présence d'une grande quantité de TAR entraîne une diminution de l'efficacité de déphasage pouvant atteindre environ 65 % de l'efficacité de déphasage obtenue en absence de TAR. Nos résultats peuvent s'expliquer par l'effet de TAR sur l'initiation de la traduction via PKR : la présence d'une faible quantité de TAR active PKR, ce qui cause la phosphorylation du facteur d'initiation eIF2 et l'inhibition de la traduction. Par contre, la présence d'une grande quantité de TAR a l'effet inverse, inhibant PKR et stimulant l'initiation de la traduction (voir section 1.4.5.1). Il est à noter que la notion de faibles et grandes quantités de TAR se base surtout sur la comparaison des effets de TAR en fonction de la quantité du plasmide qui l'exprime. Par ailleurs, nous n'avons pas noté de changement dans la phosphorylation d'eIF2. Nous suggérons que ces changements sont modestes, car nous n'avons pas observé de changements drastiques dans la synthèse protéique globale. Les cellules que nous utilisons (Jurkat-T et HEK 293T) sont stressées et eIF2 y est déjà phosphorylé. La technique d'immunobuvardage de type Western utilisée classiquement pour détecter la phosphorylation d'eIF2 pourrait ne pas être suffisamment sensible pour détecter des variations dans nos conditions d'étude. Nous avons confirmé que l'effet de TAR sur l'efficacité de déphasage du VIH-1 résulte bien de son effet sur PKR en montrant que l'utilisation d'une méthode d'interférence à l'ARN, qui inhibe l'expression de PKR, élimine aussi l'effet de TAR. Mais il est aussi possible que l'effet de PKR activée ou inhibée sur la traduction s'exercerait par la phosphorylation d'un autre substrat que eIF2. Il pourrait s'agir, par exemple, de l'hélicase RHA qui aide à dérouler les portions structurées

des régions 5'UTR des ARNm, stimulant ainsi l'initiation de la traduction, et dont l'activité diminue lorsqu'elle est phosphorylée par PKR (Sadler et al. 2009).

Nous avons suggéré, à partir de nos résultats, qu'une modulation du taux d'initiation de la traduction influence l'efficacité de déphasage en modifiant l'espace séparant les ribosomes parcourant l'ARNm. Le modèle que nous proposons sera discuté plus loin (voir section 4.1.3).

Nous avons ensuite déterminé l'effet de la 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 sur l'efficacité de déphasage. Cette région interfère avec la liaison de la petite sous-unité du ribosome à l'extrémité 5' de l'ARNm. Cet effet est dû à la présence de TAR, à l'extrémité 5', suivie de la tige-boucle Poly(A) dont la présence augmente la stabilité de TAR (Parkin et al. 1988). La 5'UTR du rapporteur dual-luciférase standard, qui est courte et peu structurée, a été remplacée par celle de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 ou par une partie de cette dernière, contenant cette 5'UTR sans TAR-Poly(A) (contenant l'IRES) ou uniquement par la région TAR-Poly(A). Nous sommes conscients que l'élimination de la région TAR-Poly(A) pourrait influencer la structure du reste de la région 5'UTR. Toutefois, Brasey et al. (2003) ont montré que la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 (nt 1 à 335) contient un IRES dont l'activité ne varie pas lorsque la région 1 à 103, incluant les structures TAR-Poly(A), est éliminée. Ce résultat suggère donc que l'élimination de ces structures n'influence pas significativement la conformation de l'IRES. Dans nos constructions, TAR est située à 7 nt de l'extrémité 5' de l'ARNm rapporteur, mais nous avons aussi vérifié que nous obtenions les mêmes résultats avec TAR située complètement à l'extrémité 5'. Avec le rapporteur contenant la 5'UTR complète de l'ARNm du VIH-1, dans des cellules Jurkat-T, nous avons observé une diminution d'environ quatre fois du taux d'initiation de la traduction et, en parallèle, une augmentation d'environ quatre fois de l'efficacité de déphasage en comparaison des résultats obtenus en utilisant le rapporteur standard. La région TAR-Poly(A) est responsable de cet effet, car l'utilisation de cette région comme 5'UTR du rapporteur dual-luciférase entraîne les mêmes effets sur le taux d'initiation de la traduction et l'efficacité de déphasage que la région 5'UTR complète de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1.

Les résultats présentés ci-dessus ont été obtenus dans des cellules Jurkat-T. Comme nous venons de le dire, ce type de cellules a été choisi parce que les cellules T sont une des cibles du VIH-1. Toutefois, les études de déphasage sont souvent faites dans d'autres types cellulaires. Nous avons voulu savoir si les résultats obtenus dans des cellules HEK 293T sont semblables à ceux obtenus dans les Jurkat-T. Nous avons trouvé que les variations du taux d'initiation de la traduction et de l'efficacité de déphasage sont semblables dans les deux types cellulaires, bien qu'elles soient moins prononcées dans les cellules HEK 293T. Nous avons observé, dans les cellules Jurkat-T, une diminution d'environ quatre fois du taux d'initiation de la traduction en présence de TAR à l'extrémité 5' comparativement au taux d'initiation observé en absence de TAR. Dans les cellules HEK 293T, nous avons observé une diminution d'environ 2,5 fois. La littérature présente plusieurs exemples de variations du taux d'inhibition de l'initiation de la traduction coiffe-dépendante due à la présence de TAR à l'extrémité 5' d'ARNm. Cette inhibition est plus importante *in vitro*, dans un lysat de réticulocytes de lapin (RRL) (inhibition de 200 fois) (Parkin et al. 1988) que dans les cellules en culture où elle varie d'environ 1,5 à quatre fois, dépendant du type de cellules utilisées (Dugre-Brisson et al. 2005; Soto-Rifo et al. 2011; Charbonneau et al. 2012). Cette variation de l'effet de TAR sur l'initiation de la traduction pourrait être due à une différence dans la concentration de facteurs cellulaires agissant sur la structure de TAR dans les différents types cellulaires.

L'effet sur le taux d'initiation de la traduction et l'efficacité de déphasage en présence de la 5'UTR complète de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 est le même qu'en présence de la région TAR-Poly(A) uniquement. Nous avons aussi examiné l'effet sur ces événements de la région 5'UTR sans TAR-poly(A), qui contient plusieurs structures importantes pour la réplication du VIH-1 ainsi qu'un IRES. Cette 5'UTR longue et structurée entraîne une diminution d'environ 1,5 fois du taux d'initiation de la traduction et une augmentation de l'efficacité de déphasage d'environ deux fois dans les cellules Jurkat-T. L'effet observé peut s'expliquer par une activation de PKR par les structures d'ARN en double-brin de cette portion de la 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 et à un ralentissement du balayage de cette région par les sous-unités ribosomiques 40S, qui doivent défaire les structures d'ARN. Cet effet est cependant négligeable en présence de

TAR-Poly(A) à l'extrémité 5', puisque la 5'UTR complète a le même effet sur l'initiation de la traduction que la région TAR-Poly(A) seule.

Les résultats présentés ci-dessus montrent que des variations du taux d'initiation de la traduction affectent l'efficacité de déphasage de façon inversement proportionnelle. Nous présentons plus loin un modèle résumant la situation (voir section 4.1.3). Nos résultats impliquent qu'une région de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 située à distance de la région de déphasage peut affecter cet événement. D'autres études ont montré, dans d'autres cas, l'influence de régions éloignées de la région de déphasage sur l'efficacité de déphasage. Le groupe de Miller (Barry and Miller 2002) a étudié le déphasage -1 qui se produit lors de la traduction de l'ARN du virus du nanisme jaune de l'orge (*Barley yellow dwarf virus*; BYDV). Ils ont démontré que le signal stimulateur de ce déphasage, une tige-boucle irrégulière avec une excroissance (*bulge*), est stabilisé par l'interaction de cette excroissance avec une boucle contenant une région complémentaire située à 4 kb en aval. Cette interaction est essentielle pour que le déphasage ait lieu, car des mutations empêchant cette interaction entraînent une diminution de l'efficacité de déphasage d'environ 10 fois. Cette interaction permettrait probablement la stabilisation du signal stimulateur, ce qui le rendrait plus difficile à défaire par l'hélicase du ribosome. De leur côté, Kurian et al. (2011) ont étudié le déphasage +1 nécessaire à la synthèse de l'antizyme de l'ornithine décarboxylase (ODC) chez *Saccharomyces cerevisiae*. Ils ont démontré que la région N-terminale de l'antizyme permet que la synthèse de la protéine soit complétée ou non, dépendamment de la concentration en polyamines du milieu. Ceci indique que la partie de l'ARNm codant pour cette région est indirectement responsable du contrôle de cette synthèse.

4.1.2 La présence de la protéine Tat du VIH-1 augmente le taux d'initiation de la traduction

La protéine Tat du VIH-1 est souvent étudiée pour son rôle dans la transactivation de la transcription. Elle assure cependant plusieurs autres fonctions, telles que mentionnées à la section 1.3.4.1. Dans le premier article de cette thèse, nous avons étudié l'effet de Tat

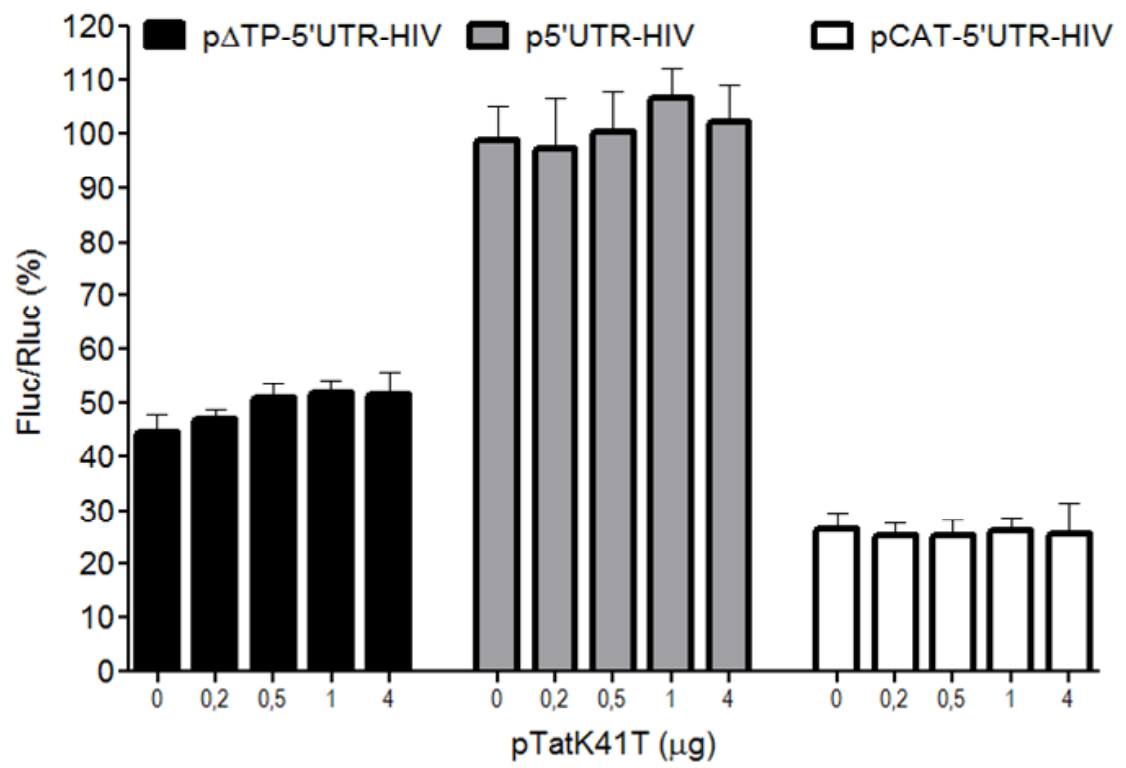
sur la traduction en utilisant un mutant, TatC30,31A, où les deux résidus cystéine aux positions 30 et 31 sont mutés en alanine. Ce mutant peut lier TAR et influencer l'activité de PKR, mais ne peut pas agir sur la transcription, ce qui évite ainsi des variations des quantités d'ARNm dans les cellules en culture dues à la présence de Tat. Suite à des expériences de cotransfection du plasmide exprimant cette Tat mutante avec le rapporteur dual-luciférase standard, nous avons montré que Tat diminue l'efficacité de déphasage, en accord avec le fait qu'elle inhibe PKR, stimulant ainsi l'initiation de la traduction. Afin de confirmer l'implication de PKR dans l'effet de Tat* sur l'efficacité du déphasage, nous pourrions vérifier que cet effet disparaît en présence d'ARNsi inhibant l'expression de PKR..

Dans notre second article, nous avons déterminé l'effet de Tat sur l'initiation de la traduction avec les rapporteurs dual-luciférase où TAR est positionnée à l'extrémité 5' de l'ARNm. La littérature contient des informations contradictoires au sujet de l'effet de Tat : certaines études montrent que Tat peut contrecarrer l'interférence de TAR avec l'initiation de la traduction dans différents systèmes, dont les cellules en culture, alors que d'autres études n'observent pas cet effet (voir section 1.3.4.1). Nous avons choisi de travailler cette fois avec la Tat sauvage puisque nous voulions nous rapprocher de la situation rencontrée par le virus lors de la traduction de ses ARNm. Des cellules Jurkat-T ont été cotransfectées avec un plasmide exprimant Tat sauvage et un rapporteur dual-luciférase. La 5'UTR du rapporteur correspond soit à celle de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1, à la portion de cette région dépourvue de TAR-Poly(A) ou à la région TAR-Poly(A) seule. Les résultats obtenus montrent que la présence de Tat stimule la traduction, contrecarrant l'effet de blocage stérique occasionné par TAR sur l'initiation de la traduction et son effet subséquent sur l'efficacité de déphasage. En effet, le déphasage, qui était fortement augmenté en présence de TAR, diminue en fonction de la quantité de Tat présente jusqu'à atteindre une valeur proche de sa valeur en absence de TAR. Par ailleurs, en absence de TAR, Tat entraîne aussi une augmentation du taux d'initiation, mais son effet se limite probablement à l'inhibition de PKR. L'augmentation de l'initiation de la traduction entraîne encore une fois une diminution de l'efficacité de déphasage. Il faut remarquer que comme nous avons utilisé Tat sauvage, elle augmente aussi la transcription des ARNm rapporteurs. Cela

pourrait conduire à une diminution du nombre de ribosomes par ARNm, antagonisant en quelque sorte l'effet de Tat sur la traduction, qui pourrait être plus importante en l'absence d'une stimulation de la transcription.

Le mécanisme par lequel Tat contrecarre le blocage stérique imposé par TAR n'est pas encore élucidé. Tat contient un signal de localisation nucléaire et est majoritairement située au noyau. Elle a cependant des fonctions cytoplasmiques comme l'inhibition de PKR. Nous avons mentionné dans notre premier article que l'effet de Tat sur PKR provient à la fois de sa liaison à PKR et de sa liaison à TAR, qui empêchent cette dernière d'interagir avec PKR, car il est généralement admis que Tat se lie aussi à TAR dans le cytoplasme. Après une étude approfondie de la question, nous pensons maintenant qu'il est peu probable que Tat interagisse directement avec TAR dans le cytoplasme. En effet, Tat a peu d'affinité pour TAR en absence de la cycline T1 et cette dernière ne se trouve qu'au noyau des cellules (Luo and Peterlin 1993; Stauber and Pavlakis 1998; Wei et al. 1998). De plus, SenGupta et al. (1990) ont montré que des mutations de TAR empêchant la liaison de Tat n'éliminent pas les effets TAR-dépendant et PKR-dépendant de Tat sur la traduction. Par ailleurs, nous avons aussi étudié l'effet d'un mutant de Tat, TatK41T, sur la traduction de nos différents rapporteurs dual-luciférase et sur l'efficacité de déphasage. Tout comme le mutant C30,31A que nous avons utilisé dans notre premier article, le mutant TatK41T ne transactive pas la transcription des ARNm. La lysine 41 de Tat est conservée et il a été montré qu'elle maintient l'intégrité structurale de Tat complexée au facteur d'élongation de la transcription P-TEFb, grâce à la formation de trois liens hydrogènes intramoléculaires avec les résidus 23, 25 et 30 (Tahirov et al. 2010). De plus, la mutation est localisée dans une région importante (acides aminés 30-58) pour l'interaction de Tat avec différentes protéines cellulaires, dont PKR qui interagit avec Tat au niveau de ses acides aminés 40-58 (Cai et al. 2000; Bres et al. 2002; Brady and Kashanchi 2005), et cette mutation affecte aussi la liaison des facteurs de transcription Bcl2 et BRG1 à Tat (Agbottah et al. 2006). Cette Tat mutante est exprimée de façon similaire à la Tat sauvage dans les cellules, mais son expression n'affecte pas l'efficacité de déphasage (Figure 4-1). Nos résultats suggèrent que l'interaction de Tat avec des protéines cellulaires est essentielle pour qu'elle affecte l'initiation de la traduction.

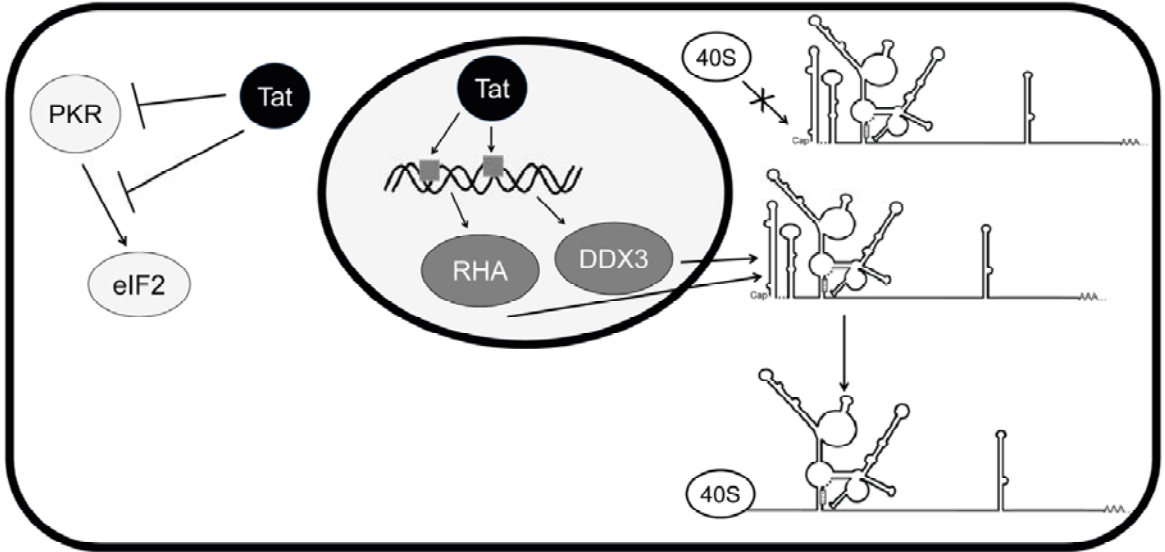
Figure 4-1 : La présence d'un mutant de Tat, TatK41T, n'affecte pas l'efficacité de déphasage dans des cellules Jurkat-T. Ces cellules ont été cotransfectées par pFRT-TatK41T (exprimant TatK41T) et un des rapporteurs dual-luciférase suivants : p Δ TP-5'UTR-HIV (rapporteur ayant une 5'UTR correspondant à la 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 dépourvue de TAR-Poly(A)), p5'UTR-HIV (rapporteur dont la 5'UTR correspond à la 5'UTR complète de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1) ou pCAT-5'UTR-HIV (rapporteur contenant la région codant pour CAT suivie de trois codons de terminaison en amont de la 5'UTR complète de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1, elle-même en amont du rapporteur dual-luciférase). Les rapporteurs p Δ TP-5'UTR-HIV et p5'UTR-HIV possèdent les structures permettant en principe une initiation coiffe-dépendante ou IRES-dépendante alors que la traduction des luciférases est obligatoirement initiée par un mode IRES-dépendant pour pCAT-5'UTR-HIV (voir section 4.2.1 pour l'analyse des résultats avec ce rapporteur). Une valeur de 100 % a été arbitrairement attribuée au déphasage exprimé par le rapport Fluc/Rluc du rapporteur p5'UTR-HIV en absence de Tat. Les résultats sont la moyenne \pm écart-type d'au moins trois expériences indépendantes.



Nous proposons un modèle dans lequel Tat entraîne indirectement la déstabilisation de la tige-boucle TAR (Figure 4-2). Nous savons que Tat stimule l'expression de certaines protéines (voir section 1.3.4.1). Notre modèle propose que, dans le noyau, Tat stimule l'expression d'hélicases à ARN, comme RHA et DDX3, en se liant à certains facteurs de transcription. Des études ont montré que ces hélicases stimulent la traduction des ARNm du VIH-1 (Bolinger et al. 2010; Liu et al. 2011). Une fois exprimées, ces hélicases peuvent migrer vers le cytoplasme de la cellule où elles peuvent contrer l'effet de TAR à l'extrémité 5' des ARNm en déroulant cette tige-boucle. Cet effet de Tat serait absent avec le mutant TatK41T, qui est muté dans une région importante pour la liaison de plusieurs protéines et qui serait alors incapable de lier des facteurs de transcription. Nous ne pouvons pas expliquer pourquoi l'effet de Tat sur la traduction n'a pas toujours été observé dans les cellules en culture. Que cet effet ne soit pas observé dans un lysat de réticulocytes ou dans les oocytes de *Xenopus* est en accord avec notre modèle, puisque ces systèmes sont inappropriés pour observer l'augmentation de l'expression de ces hélicases. On pourrait cependant se demander pourquoi cet effet est parfois observé dans les lysats de réticulocytes ou dans les oocytes de *Xenopus*. Une explication possible est que, dépendant du lysat ou des oocytes sélectionnés, il peut parfois y avoir des facteurs cellulaires qui, après une interaction avec Tat, peuvent adopter une conformation qui leur permettent d'agir sur TAR.

Quelle est la quantité de Tat présente dans une cellule infectée par le VIH-1? Cette question est importante puisque l'effet de Tat sur le déphasage varie en fonction de la quantité présente. La question demeure pourtant sans réponse. Plusieurs études démontrent des effets de Tat même lorsqu'une quantité très faible de plasmides est transfectée dans les cellules (Gonzalez et al. 2001; Charnay et al. 2009). Il faut toutefois noter que la quantité de Tat présente dans les cellules infectées varie au cours du cycle de réplication virale (Weinberger et al. 2005; Karn 2011) et que Gag et Gag-Pol sont plutôt produits dans les phases tardives du cycle, lorsque Tat est abondante.

Figure 4-2 : Modèle de la régulation de la traduction des ARNm du VIH-1 par la protéine Tat. Dans le cytoplasme, Tat inhibe l'activité de PKR en interagissant directement avec cette kinase ou en compétitionnant avec eIF2- α pour être phosphorylée par PKR. Dans le noyau, Tat stimule la transcription de gènes cellulaires en activant des facteurs de transcription (représentés par les boîtes grises). Ces facteurs augmentent la production d'hélicases comme DDX3 et RHA. Ces hélicases sont alors transportées dans le cytoplasme où elles déroulent les structures d'ARN à l'extrémité 5' des ARNm du VIH-1, permettant ainsi la liaison de la petite sous-unité du ribosome, la 40S, qui peut alors balayer l'ARNm. Noter que la structure de l'ARNm est simplifiée et que seules les structures de la 5'UTR et du SSF sont représentées.



4.1.3 La distance entre les ribosomes traduisant l'ARNm influence l'efficacité de déphasage

Comment l'initiation de la traduction peut-elle affecter un événement qui se produit lors de l'élongation de la traduction à un site éloigné de l'extrémité 5'? Le modèle que nous proposons prend en considération le fait qu'un ribosome doit rencontrer le SSF structuré afin d'effectuer un déphasage, ce qui fait que la distance entre les ribosomes influence l'efficacité de déphasage. Rappelons qu'un ribosome doit absolument rencontrer le SSF pour effectuer un déphasage, mais que cela ne signifie pas qu'un déphasage se produit chaque fois qu'un ribosome rencontre ce SSF. Lorsqu'un ribosome rencontre le SSF, il effectue une pause et a besoin d'un certain temps avant de réussir à défaire la structure de ce signal. Pendant ce temps, les ribosomes qui le suivent continuent leur déplacement le long de l'ARNm. Une fois que le signal est déroulé, ce premier ribosome poursuit la traduction. Bien que le SSF ait besoin de peu de temps pour se reformer, si le ribosome suivant est très près du premier ribosome, le SSF n'aura pas le temps de se reformer avant l'arrivée du ribosome suivant. Ce ribosome ne rencontre alors pas un SSF formé et ne fait pas de déphasage. Comme ce ribosome n'effectue pas de pause, la distance entre celui-ci et le suivant est plus grande que dans le cas précédent et le SSF a alors le temps de se reformer. Dans notre premier article, nous avons calculé que, lors d'une initiation coiffe-dépendante, environ un ribosome sur deux rencontre le SSF dans des conditions normales. Cela était en accord avec nos résultats montrant qu'inhiber l'initiation de la traduction augmente l'efficacité de déphasage d'environ deux fois. En effet, la réduction du taux d'initiation de la traduction augmente la distance entre les ribosomes. On pouvait alors supposer que tous les ribosomes rencontraient alors le SSF formé. Inversement, l'augmentation du taux d'initiation diminue l'espace entre les ribosomes par rapport à la situation normale et, en conséquence, réduit la probabilité qu'ils rencontrent un SSF formé.

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons déterminé que l'efficacité de déphasage augmente jusqu'à quatre fois avec un rapporteur où la 5'UTR correspond à la 5'UTR complète de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 ou à la région TAR-poly(A) seule, par rapport à l'efficacité observée avec un rapporteur contrôle. Nous proposons maintenant qu'en moyenne un ribosome sur quatre rencontre le SSF dans les conditions normales. Les calculs provenant de notre premier article sont trop simplifiés et postulent que l'initiation se fait de façon régulière, avec une initiation toutes les 6,5 secondes en conditions normales. L'initiation de la traduction étant fonction des facteurs disponibles, elle ne se fait probablement pas de manière aussi régulière (Figure 4-3A).

La méthode de profilage de ribosomes développée récemment par Ingolia et al. (2009) pourrait permettre de quantifier l'occupation des séquences de déphasage de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 par les ribosomes. Cette technique permet de localiser les ribosomes en traduction sur un ARNm avec une très grande précision et elle a déjà été appliquée avec succès pour caractériser l'occupation de la région de déphasage de l'ARNm de l'antizyme par les ribosomes (Michel et al. 2012). Elle permettrait de tester expérimentalement la validité de notre modèle.

4.2 L'efficacité de déphasage du VIH-1

Dinman et Wickner (1992) ont suggéré que l'efficacité de déphasage est fixée à un niveau optimal pour la réplication des virus qui utilisent un déphasage (voir section 1.6.4.3). Plusieurs autres études ont appuyé cette idée en montrant qu'une diminution de moitié ou une augmentation de quatre fois de l'efficacité de déphasage affecte la réplication du VIH-1 (Shehu-Xhilaga et al. 2001; Telenti et al. 2002; Dulude et al. 2006). Cependant, nous avons observé que l'efficacité de déphasage varie en fonction de la quantité de Tat présente. L'ARNm pleine-longueur est traduit à la fin du cycle de réplication virale quand Tat est présente en grande quantité et c'est donc à ce moment que le déphasage est effectué. Cependant, il est fort probable que la quantité de Tat dans les cellules soit variable. Nous avons aussi observé que le virus peut se répliquer dans différents types cellulaires où

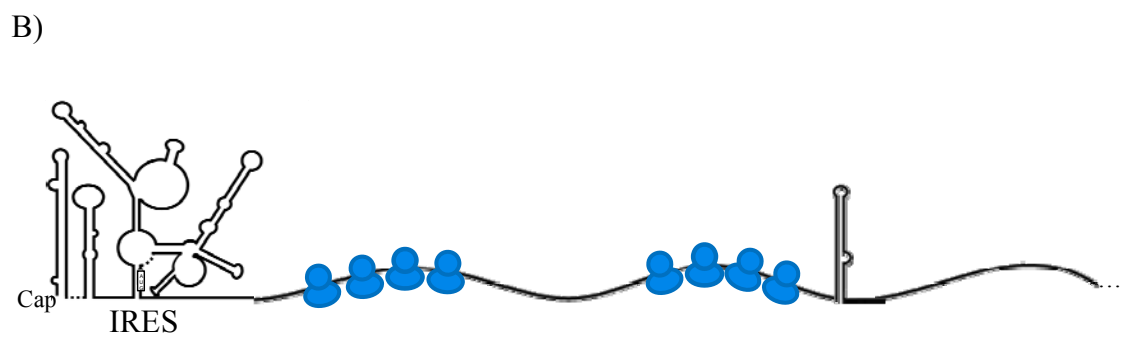
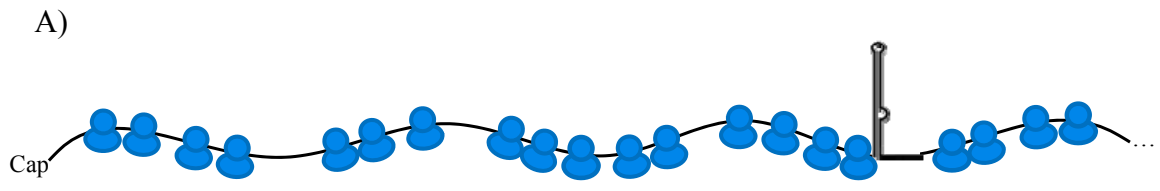
l'efficacité de déphasage est différente (données non montrées). Cela laisse supposer qu'il y a une fenêtre d'efficacité de déphasage qui permettent la réplication du virus.

L'efficacité de déphasage a une valeur minimale permettant la réplication du VIH-1 et une diminution supplémentaire de cette efficacité résulte en un rapport Gag-Pol/Gag insuffisant pour assembler des particules infectieuses. Il est cependant possible d'augmenter l'efficacité de déphasage, et donc le rapport Gag-Pol/Gag, sans affecter la réplication virale. En effet, il a été montré qu'une augmentation de deux fois de cette valeur d'efficacité de déphasage n'handicape pas la réplication du virus (Miyachi et al. 2006; Dulude et al. non publié) alors qu'une augmentation de quatre fois ou plus de ce rapport nuit à la réplication du VIH-1 (Shehu-Xhilaga et al. 2001). Shehu-Xhilaga et al. (2001) ont observé que le rapport Gag-Pol/Gag ne change pas dans les virions du VIH-1 même en présence d'un excès de Gag-Pol. Ils montrent que l'inhibition de la réplication virale dans ces conditions semble reliée à une déstabilisation des dimères d'ARN génomique, à l'intérieur des virions. Comme explication à ce fait, nous proposons qu'une protéine cellulaire pourrait être recrutée par Gag-Pol pour stabiliser ces dimères. La présence d'un excès de Gag-Pol pourrait cependant séquestrer cette protéine cellulaire à l'extérieur des virions et l'empêcher de jouer son rôle.

4.2.1 Initiation coiffe-dépendante versus IRES-dépendante

Les ARNm du VIH-1 possèdent tous une structure coiffe à leur extrémité 5' et un IRES dans leur 5'UTR (voir section 1.5.2 et 1.5.3) (Yilmaz et al. 2006). Ils peuvent ainsi utiliser deux modes pour initier la traduction. Est-ce que le virus utilise un mode coiffe-dépendant ou IRES-dépendant pour traduire son ARNm pleine-longueur? La réponse semble être les deux, mais pas nécessairement simultanément. Cela semble dépendre du stade où est rendue la réplication virale. Afin d'examiner l'effet de l'initiation IRES-dépendante sur l'efficacité de déphasage, nous avons modifié le rapporteur dual-luciférase contenant la 5'UTR complète en ajoutant la région codant pour le chloramphenicol acetyltransférase bactérien (CAT) suivi de trois codons de terminaison en

Figure 4-3 : Le taux d'initiation de la traduction affecte l'efficacité de déphasage en modulant l'espace entre les ribosomes parcourant l'ARNm. Il est important de noter qu'un ribosome doit rencontrer un SSF structuré pour qu'un déphasage puisse se produire. A) Initiation coiffe-dépendante. Notre modèle montre que l'initiation de la traduction est irrégulière et que cela affecte l'efficacité de déphasage. B) Initiation IRES-dépendante. Notre modèle montre que l'IRES doit adopter une conformation spécifique afin de permettre l'initiation. Lorsqu'il le fait, plusieurs ribosomes se lient successivement à l'IRES et se suivent de façon rapprochée. Bien que les ARN contiennent de nombreuses structures, pour des raisons de simplicité, seules les structures de la 5'UTR et du SSF sont représentées.



amont de cette 5'UTR, ce qui a généré pCAT-5'UTR-HIV. Dans ce vecteur, CAT est traduit par les ribosomes de manière coiffe-dépendante, mais les ribosomes doivent utiliser le mode d'initiation IRES-dépendant pour traduire les deux luciférases. Nous avons choisi d'introduire une région codant pour un gène préféablement à l'introduction de tiges-boucles à l'extrémité 5' afin de bloquer l'initiation coiffe-dépendante, car ces tiges-boucles auraient aussi contribué à activer PKR. Notons que dans les conditions utilisées, l'initiation coiffe-dépendante n'est pas compromise et il y a compétition entre les ribosomes pour l'initiation coiffe- et IRES-dépendante. Il serait intéressant aussi d'examiner la situation lorsque l'initiation coiffe-dépendante est compromise.

Nos résultats montrent que lorsque les deux modes d'initiation sont disponibles, le mode coiffe-dépendant est utilisé de manière prépondérante pour initier la traduction des ARNm du VIH-1. En effet, la présence de la région IRES n'affecte ni le taux d'initiation, ni l'efficacité de déphasage lorsque nous comparons les résultats obtenus avec p5'UTR-HIV (contenant la 5'UTR complète de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1, incluant l'IRES) et pTP-HIV (contenant la région TAR-Poly(A) comme 5'UTR, sans IRES). De plus, lorsque nous avons introduit des mutations connues pour activer ou diminuer l'activité de l'IRES (Gendron et al. 2011), nous n'avons vu aucune différence pour le taux d'initiation et pour l'efficacité de déphasage. Si l'initiation IRES-dépendante avait prédominé, nous aurions vu une modification du taux d'initiation de la traduction et de l'efficacité de déphasage. En effet, les résultats obtenus lorsque nous forçons les ribosomes à initier la traduction des rapporteurs luciférases via un mode IRES-dépendant montrent que le taux d'initiation et l'efficacité de déphasage diffèrent entre les modes d'initiation (comparer pTP-HIV et pCAT-5'UTR-HIV). Nos résultats sont donc en parfait accord avec ceux de Berkhout et al. (2011) qui ont introduit par mutagenèse différents AUG dans la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 et ont montré que les ribosomes initiaient la traduction à ces AUG en amont de l'AUG authentique lorsqu'ils balaient la région 5'UTR, démontrant ainsi que les ribosomes initient selon un mode coiffe-dépendant dans des conditions standards.

Nous avons montré qu'il y a une corrélation inversement proportionnelle entre la variation du taux d'initiation de la traduction coiffe-dépendante et la variation de

l'efficacité de déphasage. En d'autres termes, un faible taux d'initiation correspond à une haute efficacité de déphasage alors qu'un taux d'initiation élevé s'accompagne d'une faible efficacité de déphasage. Cette corrélation n'existe cependant pas lorsque nous utilisons le rapporteur pour lequel les ribosomes sont forcés d'employer l'initiation IRES-dépendante pour exprimer les luciférases, car alors, nous observons un faible taux d'initiation (environ la moitié du taux d'initiation observé avec le rapporteur qui utilise le mode d'initiation coiffe-dépendant (pTP-HIV)), qui s'accompagne d'une faible efficacité de déphasage (environ deux fois plus faible que celle obtenue avec pTP-HIV). Notre interprétation est que, bien que le taux d'initiation IRES-dépendant soit faible, peu de ribosomes rencontrent le SSF formé quand ce mode d'initiation est utilisé. Nous proposons que cela résulte du fait qu'un IRES doit adopter une conformation spécifique pour être utilisé. La portion de l'ARNm correspondant à l'IRES du VIH-1 adopte différentes conformations et n'adopte la conformation active qu'une fraction du temps. Toutefois, lorsque l'IRES est dans cette conformation, plusieurs ribosomes se lient successivement et se suivent alors de façon rapprochée sur l'ARNm. Le SSF n'a alors pas le temps de se reformer entre le passage de chaque ribosome et l'efficacité de déphasage est faible (Figure 4-3B).

Nous avons montré que la présence de la protéine Tat stimule, d'une manière dose-dépendante, l'initiation IRES-dépendante. Pour expliquer cette stimulation, nous proposons qu'il s'agisse d'un effet indirect de Tat qui stimulerait la production d'ITAF optimisant la conformation de l'IRES du VIH-1. Liu et al. (2011) ont récemment observé que l'augmentation de la production de l'hélicase DDX3 stimule l'activité de l'IRES de la 5'UTR du VIH-1. Une autre possibilité serait que Tat agit directement sur l'IRES, comme ITAF, afin de permettre à l'IRES d'adopter une conformation active.

Si l'IRES est peu utilisé dans des conditions normales, quand le virus utilise-t-il cet IRES? L'IRES est important pour l'initiation des ARNm viraux quand l'initiation coiffe-dépendante des ARN viraux est compromise. C'est par exemple le cas au début du cycle de réplication pour la traduction des ARN multi-épissés comme Tat. Le virus a absolument besoin de Tat pour transactiver la transcription et il a aussi besoin de Tat pour contrecarrer le blocage de la traduction de ses ARNm causés par TAR. L'utilisation de

l'IRES de l'ARNm de Tat peut résoudre ce problème (Charnay et al. 2009). Le virus a aussi besoin d'utiliser l'IRES pour produire Gag et Gag-Pol à la fin du cycle de réplication, lorsque la cellule est sous conditions de stress, comme un stress oxydatif (Gendron et al. 2011) dû à l'infection virale et que le cycle cellulaire est arrêté en mode G2/M par Vif et Vpr (voir section 1.5.2). En effet, la traduction coiffe-dépendante est alors compromise. Outre le fait que l'absence de compétition entre les modes d'initiation est bénéfique pour l'activité de l'IRES du VIH-1, cette activité est aussi stimulée par la délocalisation de certains ITAF, qui quittent le noyau pour le cytoplasme (voir Monette et al. 2009; Gendron et al. 2011).

4.3 Développement d'agents anti-VIH-1 ciblant le déphasage

Différentes approches ont été utilisées afin de trouver des agents affectant l'efficacité de déphasage du VIH-1. Il y a eu le criblage à haut débit d'une librairie constituée de plusieurs milliers de composés. Ce criblage utilisait des rapporteurs bicistroniques contenant la région de déphasage du VIH-1 entre deux cistrons. Il y a aussi eu le criblage à haut débit d'une librairie de composés chimiques, ou la synthèse et le criblage *in situ* d'une librairie combinatoire dynamique de molécules liées à une résine en vue de sélectionner des molécules liant le SSF (revue par Brakier-Gingras et al. 2012). Il est admis qu'une diminution ou une augmentation de l'efficacité de déphasage handicape la réplication virale. Nous avons vu qu'il sera cependant important, lors du développement d'agents anti-VIH-1, d'affecter suffisamment le déphasage afin que son efficacité soit située en dehors de la plage tolérée par le virus puisqu'une fenêtre d'efficacité de déphasage est compatible avec la réplication virale. On peut à ce sujet s'interroger sur la fenêtre d'efficacité tolérée par le virus *in vivo*. En l'absence de données expérimentales, *in vivo*, nous pouvons toutefois noter que la même tolérance a été observée avec des cellules dérivées des lymphocytes T en culture et des cellules primaires (macrophages) par Dominic Dulude (résultats non publiés). Nous estimons que les agents sélectionnés par criblage à haut débit pour leur capacité d'affecter le déphasage, évalué avec des rapporteurs bicistroniques, peuvent être toxiques. En effet, jusqu'à présent, il a été observé que leur cible est toujours le ribosome et que leur effet n'est pas spécifique pour le déphasage du

VIH-1, puisqu'ils affectent d'autres déphasages. Ces agents pourraient ainsi agir sur les déphasages cellulaires tels que ceux nécessaires pour la production de PEG10 et Ma3 (voir section 1.6.3.3), en plus de perturber le fonctionnement du ribosome. L'option d'utiliser des procédés qui ciblent spécifiquement le SSF du VIH-1 nous paraît la plus prometteuse (revue par Brakier-Gingras et al. 2012).

Lorsque des agents ciblant le SSF du VIH-1 sont sélectionnés, leur effet sur le déphasage est évalué en utilisant des rapporteurs bicistroniques comme le rapporteur dual-luciférase standard. Nous avons montré que la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur et la protéine Tat affectent l'efficacité de déphasage. Il serait intéressant de vérifier l'effet des agents anti-déphasage sélectionnés dans un système plus complexe que le rapporteur dual-luciférase standard et plus près de la réalité du virus. Notre système dual-luciférase contenant la 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 en présence de la protéine Tat est intéressant et pourrait être employé pour tester des composés prometteurs. Cependant, il est évident que l'expérience cruciale est de vérifier si ces composés affectent aussi le déphasage lors de la réplication du VIH-1 et s'ils affectent en parallèle cette réplication. Pour étudier l'effet des composés sur le déphasage, il faudra mesurer le rapport Gag-Pol/Gag dans les cellules où le virus se réplique. Ce rapport est évalué d'après la mesure de l'activité RT, reflétant la quantité de Gag-Pol, et de p24 (ou capsid), reflétant la quantité de Gag. Cependant, l'étude de la réplication du VIH-1 est coûteuse et nécessite des installations sécuritaires. Une alternative pratique serait d'utiliser une forme pseudotypée du VIH-1 (Aiken 1997), c'est-à-dire un virus chimérique codant pour les différentes protéines du VIH-1, dont Gag et Gag-Pol, mais ne codant pas pour Env. L'utilisation de protéines enveloppe d'un autre virus entraîne la production de virus pouvant effectuer une seule ronde d'infection.

Par ailleurs, le VIH-1 développe des résistances aux agents le combattant, c'est pourquoi il est important de trouver de nouveaux agents pour traiter les patients. Il est cependant probable que le VIH-1 développera une résistance aux agents anti-déphasage, ce qui signifie que, comme la majorité des agents, ces agents anti-déphasage devront être utilisés en combinaison avec d'autres agents. Il serait cependant déconseillé de les utiliser

en combinaison avec les inhibiteurs de protéase. En effet, les mutations du virus permettant de contourner l'effet de ces inhibiteurs de protéase sont généralement situées au niveau de la région de déphasage (Girnary et al. 2007; Nijhuis et al. 2007; Knops et al. 2011). Il y aurait alors un risque qu'une seule mutation de la séquence du virus soit suffisante pour contourner à la fois les inhibiteurs de protéase et les agents anti-déphasage. Il sera important de prendre cette observation en considération lors du développement de nouveaux agents anti-VIH-1 ciblant le déphasage.

Les travaux effectués pour sélectionner des agents anti-déphasage ont été faits avec le groupe M, sous-type B du VIH-1, le sous-type prédominant en Europe et en Amérique du Nord. Le SSF adopte une structure semblable pour tous les sous-types du groupe M, mais présente des différences dans sa séquence (Baril et al. 2003). Ceci suggère que l'expertise obtenue en étudiant les agents dirigés contre le SSF du sous-type B devrait être aisément transférable aux autres sous-types.

4.4 Conclusions et perspectives

Nous avons montré que des variations du taux d'initiation de la traduction affectent l'efficacité de déphasage -1 du VIH-1. Nous avons ensuite montré que la région 5'UTR de l'ARNm pleine-longueur du VIH-1 ainsi que la protéine virale Tat affectent le taux d'initiation de la traduction et, parallèlement, l'efficacité de déphasage.

Il serait intéressant de mieux comprendre comment le SSF fonctionne et permet un déphasage efficace. Ce SSF est indispensable pour que le déphasage ait lieu et les grandes lignes de son mécanisme d'action sont connues. Cependant, on pourrait supposer qu'outre le ribosome, des facteurs cellulaires pourraient interagir avec le SSF et pourraient ainsi influencer le déphasage. Une stratégie possible pour identifier des facteurs cellulaires, incluant les protéines ribosomiques qui interagissent avec le SSF, serait d'effectuer une étude en triple-hybride dans la levure, un système très utile pour caractériser des interactions ARN-protéines (Hook et al. 2005). Cette étude utiliserait le SSF du VIH-1 comme appât et nous pourrions cribler une banque d'ADN complémentaire provenant de cellules humaines pour identifier les protéines cellulaires se liant au SSF.

L'intervention de facteurs cellulaires pour influencer le déphasage ne se limite probablement pas à une interaction avec le SSF et nous pouvons suggérer que certains facteurs cellulaires pourraient influencer le déphasage en se liant au ribosome. Pour identifier des facteurs cellulaires affectant le déphasage, nous pourrions utiliser la technique d'interférence à l'ARN avec de courts ARN interférants (shARN). Cette technique a été utilisée par au moins trois groupes afin d'identifier les facteurs cellulaires affectant la réplication du VIH-1 (Brass et al. 2008; König et al. 2008; Zhou et al. 2008). Pour déterminer ces facteurs, nous pourrions utiliser une banque de shARN ciblant une grande partie du génome humain (environ 21 000 gènes) (Paddison et al. 2004a; Paddison et al. 2004b). Ces shARN pourront être utilisés pour infecter des cellules exprimant un rapporteur bicistronique de façon stable. Ce rapporteur bicistronique pourrait exprimer des protéines fluorescentes, avec comme premier cistron, la protéine fluorescente rouge (RFP; *red fluorescent protein*), qui est traduite de façon conventionnelle par les ribosomes traduisant l'ARNm rapporteur et, comme second cistron, la protéine fluorescente verte (GFP; *green fluorescent protein*), qui est produite uniquement par les ribosomes effectuant un déphasage -1 dans la région de déphasage du VIH-1 insérée entre les deux cistrons. L'utilisation de rapporteurs fluorescents, de préférence à un rapporteur dual-luciférase, permettra d'identifier et d'isoler les cellules présentant des variations de l'efficacité de déphasage, en comparaison à l'efficacité de déphasage obtenue en absence de shARN, grâce à la technique de cytométrie en flux (FACS; *cell sorting in flow cytometry*). À partir des cellules isolées, nous identifierons les shARN responsables des variations de déphasage, ce qui nous permettra d'identifier les facteurs cellulaires impliqués dans l'effet observé sur le déphasage.

Parmi les protéines cellulaires qui pourraient moduler l'efficacité de déphasage du VIH-1, une candidate intéressante est la protéine RACK1 (récepteur de la protéine kinase C1 activée). RACK1 se trouve dans la tête de la petite sous-unité (40S) du ribosome (Sengupta et al. 2004). Elle recrute, comme son nom l'indique, la kinase C activée et relie le ribosome à différentes voies de signalisation (Nilsson et al. 2004). Nous pouvons, par exemple, suggérer que RACK1, en conduisant à la phosphorylation de certaines protéines ribosomiques, influence l'interaction entre le SSF et le ribosome. Il serait possible d'étudier

son impact possible sur le déphasage du VIH-1 en inhibant la production de RACK1 par l'interférence à l'ARN.

Il serait également intéressant de déterminer si la région codante de Gag affecte l'efficacité de déphasage du VIH-1, qui est, nous l'avons vu, modulée par la distance entre les ribosomes traduisant l'ARNm. On peut se demander si c'est uniquement la vitesse de l'initiation qui contrôle cette distance entre les ribosomes. La présence de structures secondaires difficiles à dérouler ou de codons rares pourrait aussi influencer cette distance. Une étude récente suggère toutefois que la concentration des différents ARNt présents dans les cellules hôtes infectées change au cours du cycle de réplication virale (van Weringh et al. 2011) de manière à s'ajuster à l'usage des codons par le VIH-1. Les ARNt utilisés à la fin du cycle, lorsque Gag et Gag-Pol sont traduits, seraient différents de ceux utilisés pour la traduction des ARNm produits au début du cycle cellulaire, comme Tat et Rev. Afin de vérifier l'impact de la séquence de Gag précédant la région de déphasage sur ce déphasage, nous proposons de modifier le rapporteur dual-luciférase standard en insérant la séquence de Gag, depuis son codon d'initiation jusqu'à la région de déphasage, en amont de la séquence de la Fluc. Si nous trouvons que la séquence de Gag influence le déphasage, des études subséquentes basées sur la délétion de différentes portions de Gag permettront de préciser quelles sont les régions de Gag qui influencent le déphasage. Il faudra ensuite, en analysant les résultats, tenir compte du fait que les concentrations en ARNt dans les cellules en culture utilisées ne sont pas nécessairement les mêmes que dans les cellules infectées par le VIH-1 et raffiner notre étude en conséquence.

Les résultats de mes travaux augmentent notre compréhension du mécanisme du déphasage -1 du VIH-1 et ouvrent de nouvelles perspectives pour l'étude de cet événement. Une meilleure compréhension du mécanisme de déphasage et des interactions qui le contrôlent fournit des outils supplémentaires dans la lutte contre la pandémie causée par le VIH-1. Ces nouvelles connaissances pourront apporter une contribution très utile lors du ciblage du déphasage -1 pour le développement d'agents anti-VIH-1.

Bibliographie

Abbink TE, Berkhout B. 2008. RNA structure modulates splicing efficiency at the human immunodeficiency virus type 1 major splice donor. *J Virol* 82: 3090-3098.

Agbottah E, Deng L, Dannenberg LO, Pumfery A, Kashanchi F. 2006. Effect of SWI/SNF chromatin remodeling complex on HIV-1 Tat activated transcription. *Retrovirology* 3: 48.

Aiken C. 1997. Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A. *J Virol* 71: 5871-5877.

Alam SL, Wills NM, Ingram JA, Atkins JF, Gesteland RF. 1999. Structural studies of the RNA pseudoknot required for readthrough of the gag-termination codon of murine leukemia virus. *J Mol Biol* 288: 837-852.

Alkalaeva EZ, Pisarev AV, Frolova LY, Kisselev LL, Pestova TV. 2006. In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. *Cell* 125: 1125-1136.

Armache JP, Jarasch A, Anger AM, Villa E, Becker T, Bhushan S, Jossinet F, Habeck M, Dindar G, Franckenberg S et al. 2010. Localization of eukaryote-specific ribosomal proteins in a 5.5-A cryo-EM map of the 80S eukaryotic ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 19754-19759.

Babendure JR, Babendure JL, Ding JH, Tsien RY. 2006. Control of mammalian translation by mRNA structure near caps. *Rna* 12: 851-861.

Baierlein C, Krebber H. 2010. Translation termination: new factors and insights. *RNA Biol* 7: 548-550.

Balvay L, Lopez Lastra M, Sargueil B, Darlix JL, Ohlmann T. 2007. Translational control of retroviruses. *Nat Rev Microbiol* 5: 128-140.

Balvay L, Soto Rifo R, Ricci EP, Decimo D, Ohlmann T. 2009. Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim Biophys Acta* 1789: 542-557.

Bannert N, Fiebig U, Hohn O. 2010. Retroviral Particles, Proteins and Genomes. In *Retroviruses*, (ed. R Kurth, N Bannert), pp. 70-106. Caister Academic Press, Norfolk, UK.

Bannwarth S, Gatignol A. 2005. HIV-1 TAR RNA: the target of molecular interactions between the virus and its host. *Curr HIV Res* 3: 61-71.

Baranov PV, Gesteland RF, Atkins JF. 2002. Release factor 2 frameshifting sites in different bacteria. *EMBO Rep* 3: 373-377.

Baranov PV, Gurvich OL, Fayet O, Prere MF, Miller WA, Gesteland RF, Atkins JF, Giddings MC. 2001. RECODE: a database of frameshifting, bypassing and codon redefinition utilized for gene expression. *Nucleic Acids Res* 29: 264-267.

Baranov PV, Henderson CM, Anderson CB, Gesteland RF, Atkins JF, Howard MT. 2005. Programmed ribosomal frameshifting in decoding the SARS-CoV genome. *Virology* 332: 498-510.

Baril M, Dulude D, Gendron K, Lemay G, Brakier-Gingras L. 2003. Efficiency of a programmed -1 ribosomal frameshift in the different subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 group M. *Rna* 9: 1246-1253.

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C et al. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.

Barry JK, Miller WA. 2002. A -1 ribosomal frameshift element that requires base pairing across four kilobases suggests a mechanism of regulating ribosome and replicase traffic on a viral RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11133-11138.

Beerens N, Berkhout B. 2002. The tRNA primer activation signal in the human immunodeficiency virus type 1 genome is important for initiation and processive elongation of reverse transcription. *J Virol* 76: 2329-2339.

Belzile JP, Duisit G, Rougeau N, Mercier J, Finzi A, Cohen EA. 2007. HIV-1 Vpr-mediated G2 arrest involves the DDB1-CUL4AVPRBP E3 ubiquitin ligase. *PLoS Pathog* 3: e85.

Ben-Shem A, Garreau de Loubresse N, Melnikov S, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M. 2011. The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* 334: 1524-1529.

Benkirane M, Neuveut C, Chun RF, Smith SM, Samuel CE, Gatignol A, Jeang KT. 1997. Oncogenic potential of TAR RNA binding protein TRBP and its regulatory interaction with RNA-dependent protein kinase PKR. *EMBO J* 16: 611-624.

Berkhout B. 1996. Structure and function of the human immunodeficiency virus leader RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 54: 1-34.

Berkhout B, Arts K, Abbink TE. 2011. Ribosomal scanning on the 5'-untranslated region of the human immunodeficiency virus RNA genome. *Nucleic Acids Res* 39: 5232-5244.

Biswas P, Jiang X, Pacchia AL, Dougherty JP, Peltz SW. 2004. The Human Immunodeficiency Virus Type 1 Ribosomal Frameshifting Site Is an Invariant Sequence Determinant and an Important Target for Antiviral Therapy. *Journal of Virology* 78: 2082-2087.

Bohne J, Krausslich HG. 2004. Mutation of the major 5' splice site renders a CMV-driven HIV-1 proviral clone Tat-dependent: connections between transcription and splicing. *FEBS Lett* 563: 113-118.

Bokov K, Steinberg SV. 2009. A hierarchical model for evolution of 23S ribosomal RNA. *Nature* 457: 977-980.

Bolinger C, Boris-Lawrie K. 2009. Mechanisms employed by retroviruses to exploit host factors for translational control of a complicated proteome. *Retrovirology* 6: 8.

Bolinger C, Sharma A, Singh D, Yu L, Boris-Lawrie K. 2010. RNA helicase A modulates translation of HIV-1 and infectivity of progeny virions. *Nucleic Acids Res* 38: 1686-1696.

Bolton DL, Lenardo MJ. 2007. Vpr cytopathicity independent of G2/M cell cycle arrest in human immunodeficiency virus type 1-infected CD4+ T cells. *J Virol* 81: 8878-8890.

Bonocora RP, Zeng Q, Abel EV, Shub DA. 2011. A homing endonuclease and the 50-nt ribosomal bypass sequence of phage T4 constitute a mobile DNA cassette. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 16351-16356.

Bordeleau ME, Mori A, Oberer M, Lindqvist L, Chard LS, Higa T, Belsham GJ, Wagner G, Tanaka J, Pelletier J. 2006. Functional characterization of IRESes by an inhibitor of the RNA helicase eIF4A. *Nat Chem Biol* 2: 213-220.

Braddock M, Powell R, Blanchard AD, Kingsman AJ, Kingsman SM. 1993. HIV-1 TAR RNA-binding proteins control TAT activation of translation in *Xenopus* oocytes. *FASEB J* 7: 214-222.

Brady J, Kashanchi F. 2005. Tat gets the "green" light on transcription initiation. *Retrovirology* 2: 69.

Brakier-Gingras L, Charbonneau J, Butcher SE. 2012. Targeting frameshifting in the human immunodeficiency virus. *Expert opinion on therapeutic targets*.

Brakier-Gingras L, Dulude D. 2010. Programmed -1 ribosomal frameshift in the human immunodeficiency virus of type 1. In *Recoding: Expansion of Decoding Rules Enriches Gene Expression*, (ed. J Atkins, R Gesteland), pp. 175-192. Springer, New York, NY.

Brand SR, Kobayashi R, Mathews MB. 1997. The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 is a substrate and inhibitor of the interferon-induced, virally activated protein kinase, PKR. *J Biol Chem* 272: 8388-8395.

Brasey A, Lopez-Lastra M, Ohlmann T, Beerens N, Berkhout B, Darlix JL, Sonenberg N. 2003. The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle. *J Virol* 77: 3939-3949.

Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, Yan N, Engelman A, Xavier RJ, Lieberman J, Elledge SJ. 2008. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319: 921-926.

Bres V, Kiernan R, Emiliani S, Benkirane M. 2002. Tat acetyl-acceptor lysines are important for human immunodeficiency virus type-1 replication. *J Biol Chem* 277: 22215-22221.

Brierley I. 1995. Ribosomal frameshifting viral RNAs. *J Gen Virol* 76 (Pt 8): 1885-1892.

Brierley I, Dos Ramos FJ. 2006. Programmed ribosomal frameshifting in HIV-1 and the SARS-CoV. *Virus research* 119: 29-42.

Brierley I, Pennell S. 2001. Structure and function of the stimulatory RNAs involved in programmed eukaryotic-1 ribosomal frameshifting. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 66: 233-248.

Brierley I, Rolley NJ, Jenner AJ, Inglis SC. 1991. Mutational analysis of the RNA pseudoknot component of a coronavirus ribosomal frameshifting signal. *J Mol Biol* 220: 889-902.

Buck CB, Shen X, Egan MA, Pierson TC, Walker CM, Siliciano RF. 2001. The human immunodeficiency virus type 1 gag gene encodes an internal ribosome entry site. *J Virol* 75: 181-191.

Budkevich T, Giesebrecht J, Altman RB, Munro JB, Mielke T, Nierhaus KH, Blanchard SC, Spahn CM. 2011. Structure and dynamics of the mammalian ribosomal pretranslocation complex. *Mol Cell* 44: 214-224.

Cai R, Carpick B, Chun RF, Jeang KT, Williams BR. 2000. HIV-I TAT inhibits PKR activity by both RNA-dependent and RNA-independent mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 373: 361-367.

Castello A, Franco D, Moral-Lopez P, Berlanga JJ, Alvarez E, Wimmer E, Carrasco L. 2009. HIV-1 protease inhibits Cap- and poly(A)-dependent translation upon eIF4GI and PABP cleavage. *PLoS One* 4: e7997.

Chang YN, Kenan DJ, Keene JD, Gatignol A, Jeang KT. 1994. Direct interactions between autoantigen La and human immunodeficiency virus leader RNA. *J Virol* 68: 7008-7020.

Charbonneau J, Gendron K, Ferbeyre G, Brakier-Gingras L. 2012. The 5' UTR of HIV-1 full-length mRNA and the Tat viral protein modulate the programmed -1 ribosomal frameshift that generates HIV-1 enzymes. *Rna*.

Charnay N, Ivanyi-Nagy R, Soto-Rifo R, Ohlmann T, López-Lastra M, Darlix J-L. 2009. Mechanism of HIV-1 Tat RNA translation and its activation by the Tat protein. *Retrovirology* 6: 74.

Checkley MA, Luttge BG, Freed EO. 2011. HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J Mol Biol* 410: 582-608.

Chen C, Stevens B, Kaur J, Smilansky Z, Cooperman BS, Goldman YE. 2011. Allosteric vs. spontaneous exit-site (E-site) tRNA dissociation early in protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 16980-16985.

Chin DJ, Selby MJ, Peterlin BM. 1991. Human immunodeficiency virus type 1 Tat does not transactivate mature trans-acting responsive region RNA species in the nucleus or cytoplasm of primate cells. *J Virol* 65: 1758-1764.

Clark MB, Janicke M, Gottesbuhren U, Kleffmann T, Legge M, Poole ES, Tate WP. 2007. Mammalian gene PEG10 expresses two reading frames by high efficiency -1 frameshifting in embryonic-associated tissues. *J Biol Chem* 282: 37359-37369.

Clemens MJ. 2005. Translational control in virus-infected cells: models for cellular stress responses. *Seminars in cell & developmental biology* 16: 13-20.

Clerzius G, Gelinas JF, Gatignol A. 2011. Multiple levels of PKR inhibition during HIV-1 replication. *Rev Med Virol* 21: 42-53.

Clever JL, Miranda D, Jr., Parslow TG. 2002. RNA structure and packaging signals in the 5' leader region of the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol* 76: 12381-12387.

Coiras M, Lopez-Huertas MR, Sanchez del Cojo M, Mateos E, Alcami J. 2010. Dual role of host cell factors in HIV-1 replication: restriction and enhancement of the viral cycle. *AIDS Rev* 12: 103-112.

Cullen BR. 1986. Trans-activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism. *Cell* 46: 973-982.

Debaisieux S, Rayne F, Yezid H, Beaumelle B. 2011. The Ins and Outs of HIV-1 Tat. *Traffic*.

Dever TE, Dar AC, Sicheri F. 2007. The eIF2 α kinases. In *Translational Control in Biology and Medicine*, (ed. MB Matthews, Sonenberg, N. and Hershey, J.W.B.), pp. 319-344. Cold Spring Harbor Laboratory Press, United States.

Dinman JD, Richter S, Plant EP, Taylor RC, Hammell AB, Rana TM. 2002. The frameshift signal of HIV-1 involves a potential intramolecular triplex RNA structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 5331-5336.

Dinman JD, Wickner RB. 1992. Ribosomal frameshifting efficiency and gag/gag-pol ratio are critical for yeast M1 double-stranded RNA virus propagation. *J Virol* 66: 3669-3676.

Dorin D, Bonnet MC, Bannwarth S, Gatignol A, Meurs EF, Vaquero C. 2003. The TAR RNA-binding protein, TRBP, stimulates the expression of TAR-containing RNAs in vitro and in vivo independently of its ability to inhibit the dsRNA-dependent kinase PKR. *J Biol Chem* 278: 4440-4448.

Doudna JA, Sarnow P. 2007. Translation Initiation by Viral Internal Ribosome Entry Sites. In *Translational control in Biology and Medicine*, (ed. MB Mathews, N Sonenberg, JWB Hershey), pp. 129-153. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Dugre-Brisson S, Elvira G, Boulay K, Chatel-Chaix L, Mouland AJ, DesGroseillers L. 2005. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res* 33: 4797-4812.

Dulude D, Baril M, Brakier-Gingras L. 2002. Characterization of the frameshift stimulatory signal controlling a programmed -1 ribosomal frameshift in the human immunodeficiency virus type 1. *Nucleic Acids Res* 30: 5094-5102.

Dulude D, Berchiche YA, Gendron K, Brakier-Gingras L, Heveker N. 2006. Decreasing the frameshift efficiency translates into an equivalent reduction of the replication of the human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 345: 127-136.

Dulude D, Guenier A-S, Duchaine J, Iannello A, Ahmad A, Lamarre D, Brakier-Gingras L, Heveker N. non publié. Screening for HIV-1 frameshift modulators: a new hydrazide compound increases frameshift efficiency and viral replication.

Dussupt V, Sette P, Bello NF, Javid MP, Nagashima K, Bouamr F. 2011. Basic residues in the nucleocapsid domain of Gag are critical for late events of HIV-1 budding. *J Virol* 85: 2304-2315.

Dutcher JP. 2004. Mammalian target of rapamycin inhibition. *Clin Cancer Res* 10: 6382S-6387S.

Ehrenberg M, Hauryliuk V, Crist CG, Nakamura Y. 2007. Translation Termination, the Prion [PSI⁺], and Ribosome Recycling. In *Translational control in Biology and Medicine*, (ed. MB Mathews, N Sonenberg, JWB Hershey), pp. 173-196. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Engelman A, Cherepanov P. 2008. The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication. *PLoS Pathog* 4: e1000046.

Ermolenko DN, Noller HF. 2011. mRNA translocation occurs during the second step of ribosomal intersubunit rotation. *Nature structural & molecular biology* 18: 457-462.

Filbin ME, Kieft JS. 2009. Toward a structural understanding of IRES RNA function. *Curr Opin Struct Biol* 19: 267-276.

Fischer N, Konevega AL, Wintermeyer W, Rodnina MV, Stark H. 2010. Ribosome dynamics and tRNA movement by time-resolved electron cryomicroscopy. *Nature* 466: 329-333.

Fitzgerald KD, Semler BL. 2009. Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus. *Biochim Biophys Acta* 1789: 518-528.

Frankel AD, Young JA. 1998. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 67: 1-25.

Freed EO. 2001. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* 26: 13-33.

Fujii R, Okamoto M, Aratani S, Oishi T, Ohshima T, Taira K, Baba M, Fukamizu A, Nakajima T. 2001. A Role of RNA Helicase A in cis-Acting Transactivation Response Element-mediated Transcriptional Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Biol Chem* 276: 5445-5451.

Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Sundquist WI. 2008. The structural biology of HIV assembly. *Curr Opin Struct Biol* 18: 203-217.

Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM et al. 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397: 436-441.

Garcia A, van Duin J, Pleij CW. 1993. Differential response to frameshift signals in eukaryotic and prokaryotic translational systems. *Nucleic Acids Res* 21: 401-406.

Gatignol A. 2007. Transcription of HIV: Tat and cellular chromatin. *Adv Pharmacol* 55: 137-159.

Gatignol A, Buckler-White A, Berkhout B, Jeang KT. 1991. Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. *Science* 251: 1597-1600.

Gatignol A, Jeang KT. 2000. Tat as a transcriptional activator and a potential therapeutic target for HIV-1. *Adv Pharmacol* 48: 209-227.

Gaudin C, Mazauric MH, Traikia M, Guittet E, Yoshizawa S, Fourmy D. 2005. Structure of the RNA signal essential for translational frameshifting in HIV-1. *J Mol Biol* 349: 1024-1035.

Gebauer F, Hentze MW. 2004. Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 827-835.

Gendron K, Charbonneau J, Dulude D, Heveker N, Ferbeyre G, Brakier-Gingras L. 2008. The presence of the TAR RNA structure alters the programmed -1 ribosomal frameshift efficiency of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by modifying the rate of translation initiation. *Nucleic Acids Res* 36: 30-40.

Gendron K, Ferbeyre G, Heveker N, Brakier-Gingras L. 2011. The activity of the HIV-1 IRES is stimulated by oxidative stress and controlled by a negative regulatory element. *Nucleic Acids Res* 39: 902-912.

Gilbert WV. 2011. Functional specialization of ribosomes? *Trends Biochem Sci* 36: 127-132.

Gilmartin GM, Fleming ES, Oetjen J, Graveley BR. 1995. CPSF recognition of an HIV-1 mRNA 3'-processing enhancer: multiple sequence contacts involved in poly(A) site definition. *Genes Dev* 9: 72-83.

Girnary R, King L, Robinson L, Elston R, Brierley I. 2007. Structure-function analysis of the ribosomal frameshifting signal of two human immunodeficiency virus type 1 isolates with increased resistance to viral protease inhibitors. *J Gen Virol* 88: 226-235.

Goff SP. 2004. Genetic reprogramming by retroviruses: enhanced suppression of translational termination. *Cell Cycle* 3: 123-125.

Goh WC, Rogel ME, Kinsey CM, Michael SF, Fultz PN, Nowak MA, Hahn BH, Emerman M. 1998. HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat Med* 4: 65-71.

Gonzalez E, Punzon C, Gonzalez M, Fresno M. 2001. HIV-1 Tat inhibits IL-2 gene transcription through qualitative and quantitative alterations of the cooperative Rel/AP1 complex bound to the CD28RE/AP1 composite element of the IL-2 promoter. *Journal of immunology* 166: 4560-4569.

Greenway AL, McPhee DA, Allen K, Johnstone R, Holloway G, Mills J, Azad A, Sankovich S, Lambert P. 2002. Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds to tumor suppressor p53 and protects cells against p53-mediated apoptosis. *J Virol* 76: 2692-2702.

Grentzmann G, Ingram JA, Kelly PJ, Gesteland RF, Atkins JF. 1998. A dual-luciferase reporter system for studying recoding signals. *RNA* 4: 479-486.

Grewe B, Uberla K. 2010. The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein: menage a trois during the early phase of the lentiviral replication cycle. *J Gen Virol* 91: 1893-1897.

Gromadski KB, Rodnina MV. 2004. Kinetic determinants of high-fidelity tRNA discrimination on the ribosome. *Mol Cell* 13: 191-200.

Gunnery S, Green SR, Mathews MB. 1992. Tat-responsive region RNA of human immunodeficiency virus type 1 stimulates protein synthesis in vivo and in vitro: relationship between structure and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 11557-11561.

Ha TT. 2011. Canadian-developed HIV vaccine approved for human testing. In *Globe and Mail*.

Harger JW, Dinman JD. 2003. An in vivo dual-luciferase assay system for studying translational recoding in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna* 9: 1019-1024.

Hellen CUT. 2009. IRES-induced conformational changes in the ribosome and the mechanism of translation initiation by internal ribosomal entry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1789: 558-570.

Hentze MW, Gebauer F, Preiss T. 2007. *cis*-Regulatory Sequences and *trans*-Acting Factors in Translational Control. In *Translational control in Biology and Medicine*, (ed.

MB Mathews, N Sonenberg, JWB Hershey), pp. 269-295. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Herbreteau CH, Weill L, Decimo D, Prevot D, Darlix JL, Sargueil B, Ohlmann T. 2005. HIV-2 genomic RNA contains a novel type of IRES located downstream of its initiation codon. *Nature structural & molecular biology* 12: 1001-1007.

Herr AJ, Nelson CC, Wills NM, Gesteland RF, Atkins JF. 2001. Analysis of the roles of tRNA structure, ribosomal protein L9, and the bacteriophage T4 gene 60 bypassing signals during ribosome slippage on mRNA. *J Mol Biol* 309: 1029-1048.

Hill MK, Shehu-Xhilaga M, Crowe SM, Mak J. 2002. Proline residues within spacer peptide p1 are important for human immunodeficiency virus type 1 infectivity, protein processing, and genomic RNA dimer stability. *J Virol* 76: 11245-11253.

Hinnebusch AG. 2011. Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 434-467, first page of table of contents.

Hirokawa G, Nijman RM, Raj VS, Kaji H, Igarashi K, Kaji A. 2005. The role of ribosome recycling factor in dissociation of 70S ribosomes into subunits. *Rna* 11: 1317-1328.

Hizi A, Henderson LE, Copeland TD, Sowder RC, Hixson CV, Oroszlan S. 1987. Characterization of mouse mammary tumor virus gag-pro gene products and the ribosomal frameshift site by protein sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 7041-7045.

Honigman A, Falk H, Mador N, Rosental T, Panet A. 1995. Translation efficiency of the human T-cell leukemia virus (HTLV-2) gag gene modulates the frequency of ribosomal frameshifting. *Virology* 208: 312-318.

Hook B, Bernstein D, Zhang B, Wickens M. 2005. RNA-protein interactions in the yeast three-hybrid system: affinity, sensitivity, and enhanced library screening. *Rna* 11: 227-233.

Houck-Loomis B, Durney MA, Salguero C, Shankar N, Nagle JM, Goff SP, D'Souza VM. 2011. An equilibrium-dependent retroviral mRNA switch regulates translational recoding. *Nature* 480: 561-564.

Hung M, Patel P, Davis S, Green SR. 1998. Importance of ribosomal frameshifting for human immunodeficiency virus type 1 particle assembly and replication. *J Virol* 72: 4819-4824.

Hunt JS, Romanelli F. 2009. Maraviroc, a CCR5 coreceptor antagonist that blocks entry of human immunodeficiency virus type 1. *Pharmacotherapy* 29: 295-304.

Hunter T, Hunt T, Jackson RJ, Robertson HD. 1975. The characteristics of inhibition of protein synthesis by double-stranded ribonucleic acid in reticulocyte lysates. *J Biol Chem* 250: 409-417.

Huthoff H, Berkhout B. 2001. Two alternating structures of the HIV-1 leader RNA. *Rna* 7: 143-157.

Hutter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Mussig A, Allers K, Schneider T, Hofmann J, Kucherer C, Blau O et al. 2009. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 360: 692-698.

Ibba M, Soll D. 2000. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu Rev Biochem* 69: 617-650.

Ivanov IP, Matsufuji S, Murakami Y, Gesteland RF, Atkins JF. 2000. Conservation of polyamine regulation by translational frameshifting from yeast to mammals. *EMBO J* 19: 1907-1917.

Izumi T, Io K, Matsui M, Shirakawa K, Shinohara M, Nagai Y, Kawahara M, Kobayashi M, Kondoh H, Misawa N et al. 2010. HIV-1 viral infectivity factor interacts with TP53 to induce G2 cell cycle arrest and positively regulate viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 20798-20803.

Jacks T, Madhani HD, Masiarz FR, Varmus HE. 1988a. Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus gag-pol region. *Cell* 55: 447-458.

Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, Varmus HE. 1988b. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 331: 280-283.

Jacks T, Varmus HE. 1985. Expression of the Rous sarcoma virus pol gene by ribosomal frameshifting. *Science* 230: 1237-1242.

Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. 2012. Termination and post-termination events in eukaryotic translation. *Advances in protein chemistry and structural biology* 86: 45-93.

Jeang KT, Xiao H, Rich EA. 1999. Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J Biol Chem* 274: 28837-28840.

Jenner LB, Demeshkina N, Yusupova G, Yusupov M. 2010. Structural aspects of messenger RNA reading frame maintenance by the ribosome. *Nature structural & molecular biology* 17: 555-560.

Johri MK, Mishra R, Chhatbar C, Unni SK, Singh SK. 2011. Tits and bits of HIV Tat protein. *Expert Opin Biol Ther* 11: 269-283.

Jones KL, Sonza S, Mak J. 2008. Primary T-lymphocytes rescue the replication of HIV-1 DIS RNA mutants in part by facilitating reverse transcription. *Nucleic Acids Res* 36: 1578-1588.

Jorgensen F, Kurland CG. 1990. Processivity errors of gene expression in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 215: 511-521.

Jouvenet N, Neil SJ, Bess C, Johnson MC, Virgen CA, Simon SM, Bieniasz PD. 2006. Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. *PLoS Biol* 4: e435.

Karacostas V, Wolffe EJ, Nagashima K, Gonda MA, 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.

Karn J. 2011. The molecular biology of HIV latency: breaking and restoring the Tat-dependent transcriptional circuit. *Current opinion in HIV and AIDS* 6: 4-11.

Karn J, Stoltzfus CM. 2012. Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2: a006916.

Kaufman RJ. 2000. Double-stranded RNA-activated Protein Kinase PKR. In *Translational Control of Gene Expression*, (ed. N Sonenberg, JWB Hershey, MB Mathews), pp. 503-527. CSHL Press, Cold Spring Harbor.

Kessler M, Mathews MB. 1992. Premature termination and processing of human immunodeficiency virus type 1-promoted transcripts. *J Virol* 66: 4488-4496.

Kim I, Liu CW, Puglisi JD. 2006. Specific recognition of HIV TAR RNA by the dsRNA binding domains (dsRBD1-dsRBD2) of PKR. *J Mol Biol* 358: 430-442.

Klinge S, Voigts-Hoffmann F, Leibundgut M, Arpagaus S, Ban N. 2011. Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6. *Science* 334: 941-948.

Knops E, Brakier-Gingras L, Schuler E, Pfister H, Kaiser R, Verheyen J. 2011. Mutational patterns in the frameshift-regulating site of HIV-1 selected by protease inhibitors. *Medical microbiology and immunology*.

Konig R, Zhou Y, Elleder D, Diamond TL, Bonamy GM, Irelan JT, Chiang CY, Tu BP, De Jesus PD, Lilley CE et al. 2008. Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell* 135: 49-60.

Kontos H, Naphine S, Brierley I. 2001. Ribosomal pausing at a frameshifter RNA pseudoknot is sensitive to reading phase but shows little correlation with frameshift efficiency. *Mol Cell Biol* 21: 8657-8670.

Korostelev AA. 2011. Structural aspects of translation termination on the ribosome. *Rna* 17: 1409-1421.

Kozak M. 1989. Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Mol Cell Biol* 9: 5134-5142.

Kozak M. 2002. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* 299: 1-34.

Krishnan V, Zeichner SL. 2004. Alterations in the expression of DEAD-box and other RNA binding proteins during HIV-1 replication. *Retrovirology* 1: 42.

Kurian L, Palanimurugan R, Godderz D, Dohmen RJ. 2011. Polyamine sensing by nascent ornithine decarboxylase antizyme stimulates decoding of its mRNA. *Nature* 477: 490-494.

Laguette N, Bregnard C, Benichou S, Basmaciogullari S. 2010. Human immunodeficiency virus (HIV) type-1, HIV-2 and simian immunodeficiency virus Nef proteins. *Mol Aspects Med* 31: 418-433.

Larsen B, Gesteland RF, Atkins JF. 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.

Le Rouzic E, Benichou S. 2005. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology* 2: 11.

Léger M, Dulude D, Steinberg SV, Brakier-Gingras L. 2007. The three transfer RNAs occupying the A, P and E sites on the ribosome are involved in viral programmed -1 ribosomal frameshift. *Nucleic Acids Research* 35: 5581-5592.

Lemaire PA, Lary J, Cole JL. 2005. Mechanism of PKR activation: dimerization and kinase activation in the absence of double-stranded RNA. *J Mol Biol* 345: 81-90.

Lenasi T, Contreras X, Peterlin BM. 2010. Transcription, Splicing and Transport of Retroviral RNA. In *Retroviruses*, (ed. R Kurth, N Bannert), pp. 161-185. Caister Academic Press, Norfolk, UK.

Leung EK, Suslov N, Tuttle N, Sengupta R, Piccirilli JA. 2011. The mechanism of peptidyl transfer catalysis by the ribosome. *Annu Rev Biochem* 80: 527-555.

Lindqvist L, Oberer M, Reibarkh M, Cencic R, Bordeleau ME, Vogt E, Marintchev A, Tanaka J, Fagotto F, Altmann M et al. 2008. Selective pharmacological targeting of a DEAD box RNA helicase. *PLoS One* 3: e1583.

Liu J, Henao-Mejia J, Liu H, Zhao Y, He JJ. 2011. Translational regulation of HIV-1 replication by HIV-1 Rev cellular cofactors Sam68, eIF5A, hRIP, and DDX3. *J Neuroimmune Pharmacol* 6: 308-321.

Locker N, Chamond N, Sargueil B. 2011. A conserved structure within the HIV gag open reading frame that controls translation initiation directly recruits the 40S subunit and eIF3. *Nucleic Acids Res* 39: 2367-2377.

Lopez-Huertas MR, Callejas S, Abia D, Mateos E, Dopazo A, Alcamí J, Coiras M. 2010. Modifications in host cell cytoskeleton structure and function mediated by intracellular HIV-1 Tat protein are greatly dependent on the second coding exon. *Nucleic Acids Res* 38: 3287-3307.

Lopez-Lastra M, Rivas A, Barria MI. 2005. Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol Res* 38: 121-146.

Lopinski JD, Dinman JD, Bruenn JA. 2000. Kinetics of ribosomal pausing during programmed -1 translational frameshifting. *Mol Cell Biol* 20: 1095-1103.

Lu K, Heng X, Summers MF. 2011. Structural determinants and mechanism of HIV-1 genome packaging. *J Mol Biol* 410: 609-633.

Luo Y, Peterlin BM. 1993. Juxtaposition between activation and basic domains of human immunodeficiency virus type 1 Tat is required for optimal interactions between Tat and TAR. *J Virol* 67: 3441-3445.

Lutz H, Hunsmann G, Schüpbach J. 2010. Transmission and Epidemiology. In *Retroviruses*, (ed. R Kurth, N Bannert), pp. 217-236. Caister Academic Press, Norfolk, UK.

Lux H, Flammann H, Hafner M, Lux A. 2010. Genetic and molecular analyses of PEG10 reveal new aspects of genomic organization, transcription and translation. *PLoS One* 5: e8686.

Malys N, McCarthy JE. 2011. Translation initiation: variations in the mechanism can be anticipated. *Cell Mol Life Sci* 68: 991-1003.

Mangold U. 2005. The antizyme family: polyamines and beyond. *IUBMB Life* 57: 671-676.

Marcello A, Zoppe M, Giacca M. 2001. Multiple modes of transcriptional regulation by the HIV-1 Tat transactivator. *IUBMB Life* 51: 175-181.

Marcheschi RJ, Mouzakis KD, Butcher SE. 2009. Selection and characterization of small molecules that bind the HIV-1 frameshift site RNA. *ACS Chem Biol* 4: 844-854.

Marcheschi RJ, Staple DW, Butcher SE. 2007. Programmed ribosomal frameshifting in SIV is induced by a highly structured RNA stem-loop. *J Mol Biol* 373: 652-663.

Mathews MB, Sonenberg N, Hershey JWB. 2007. Origins and Principles of Translational Control. In *Translational Control in Biology and Medicine*, (ed. MB Mathews, N Sonenberg, JWB Hershey), pp. 1-40. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Meredith LW, Sivakumaran H, Major L, Suhrbier A, Harrich D. 2009. Potent inhibition of HIV-1 replication by a Tat mutant. *PLoS One* 4: e7769.

Michel AM, Roy Choudhury K, Firth AE, Ingolia NT, Atkins JF, Baranov PV. 2012. Observation of dually decoded regions of the human genome using ribosome profiling data. *Genome Res*.

Miyauchi K, Komano J, Myint L, Futahashi Y, Urano E, Matsuda Z, Chiba T, Miura H, Sugiura W, Yamamoto N. 2006. Rapid propagation of low-fitness drug-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 by a streptococcal metabolite sparsomycin. *Antivir Chem Chemother* 17: 167-174.

Mohr IJ, Pe'ery T, Mathews MB. 2007. Protein Synthesis and Translational Control during Viral Infection. In *Translational Control in Biology and Medicine*, (ed. MB

Mathews, N Sonenberg, JWB Hershey), pp. 545-599. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Monette A, Ajamian L, Lopez-Lastra M, Mouland AJ. 2009. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) induces the cytoplasmic retention of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by disrupting nuclear import: implications for HIV-1 gene expression. *J Biol Chem* 284: 31350-31362.

Moore MD, Fu W, Nikolaitchik O, Chen J, Ptak RG, Hu WS. 2007. Dimer initiation signal of human immunodeficiency virus type 1: its role in partner selection during RNA copackaging and its effects on recombination. *J Virol* 81: 4002-4011.

Moore MD, Hu WS. 2009. HIV-1 RNA dimerization: It takes two to tango. *AIDS Rev* 11: 91-102.

Moore PB. 1999. Ribosomes and the RNA world. In *The RNA World*, (ed. RF Gesteland, TR Cech, JF Atkins), pp. 381-401. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Morikawa S, Bishop DH. 1992. Identification and analysis of the gag-pol ribosomal frameshift site of feline immunodeficiency virus. *Virology* 186: 389-397.

Morrison DJ, Pendergrast PS, Stavropoulos P, Colmenares SU, Kobayashi R, Hernandez N. 1999. FBI-1, a factor that binds to the HIV-1 inducer of short transcripts (IST), is a POZ domain protein. *Nucleic Acids Res* 27: 1251-1262.

Mothes W, Uchil PD. 2010. Retroviral Entry and Uncoating. In *Retroviruses*, (ed. R Kurth, N Bannert), pp. 107-128. Caister Academic Press, Norfolk, UK.

Namy O, Moran SJ, Stuart DI, Gilbert RJ, Brierley I. 2006. A mechanical explanation of RNA pseudoknot function in programmed ribosomal frameshifting. *Nature* 441: 244-247.

Nawrocki ST, Carew JS, Pino MS, Highshaw RA, Dunner K, Jr., Huang P, Abbruzzese JL, McConkey DJ. 2005. Bortezomib sensitizes pancreatic cancer cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Cancer Res* 65: 11658-11666.

Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451: 425-430.

NIAID. 2011. HIV Replication Cycle. In *Biology of HIV*, NIH.

Nicholson MG, Barber SA, Clements JE. 2007. The SIVmac239 Pr55Gag isoform, SIV p43, suppresses proteolytic cleavage of Pr55Gag. *Virology* 360: 84-91.

Nierhaus KH. 2006. Decoding errors and the involvement of the E-site. *Biochimie* 88: 1013-1019.

Nijhuis M, van Maarseveen NM, Lastere S, Schipper P, Coakley E, Glass B, Rovenska M, de Jong D, Chappay C, Goedegebuure IW et al. 2007. A novel substrate-based HIV-1 protease inhibitor drug resistance mechanism. *PLoS medicine* 4: e36.

Nilsson J, Sengupta J, Frank J, Nissen P. 2004. Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Rep* 5: 1137-1141.

Noble CG, Song H. 2008. Structural studies of elongation and release factors. *Cell Mol Life Sci* 65: 1335-1346.

Ogle JM, Ramakrishnan V. 2005. Structural Insights into Translational Fidelity. *Annual Review of Biochemistry* 74: 129-177.

Ohlmann T, Lopez-Lastra M, Darlix JL. 2000. An internal ribosome entry segment promotes translation of the simian immunodeficiency virus genomic RNA. *J Biol Chem* 275: 11899-11906.

Ong CL, Thorpe JC, Gorry PR, Bannwarth S, Jaworowski A, Howard JL, Chung S, Campbell S, Christensen HS, Clerzius G et al. 2005. Low TRBP levels support an innate human immunodeficiency virus type 1 resistance in astrocytes by enhancing the PKR antiviral response. *J Virol* 79: 12763-12772.

Ooms M, Cupac D, Abbink TE, Huthoff H, Berkhout B. 2007. The availability of the primer activation signal (PAS) affects the efficiency of HIV-1 reverse transcription initiation. *Nucleic Acids Res* 35: 1649-1659.

Ott DE. 2008. Cellular proteins detected in HIV-1. *Rev Med Virol* 18: 159-175.

Pacheco A, Martinez-Salas E. 2010. Insights into the biology of IRES elements through riboproteomic approaches. *J Biomed Biotechnol* 2010: 458927.

Paddison PJ, Cleary M, Silva JM, Chang K, Sheth N, Sachidanandam R, Hannon GJ. 2004a. Cloning of short hairpin RNAs for gene knockdown in mammalian cells. *Nature methods* 1: 163-167.

Paddison PJ, Silva JM, Conklin DS, Schlabach M, Li M, Aruleba S, Baliya V, O'Shaughnessy A, Gnoj L, Scobie K et al. 2004b. A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. *Nature* 428: 427-431.

Palmer S, Josefsson L, Coffin JM. 2011. HIV reservoirs and the possibility of a cure for HIV infection. *J Intern Med* 270: 550-560.

Park J, Morrow CD. 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.

Parkin NT, Cohen EA, Darveau A, Rosen C, Haseltine W, Sonenberg N. 1988. Mutational analysis of the 5' non-coding region of human immunodeficiency virus type 1: effects of secondary structure on translation. *EMBO J* 7: 2831-2837.

Parsyan A, Svitkin Y, Shahbazian D, Gkogkas C, Lasko P, Merrick WC, Sonenberg N. 2011. mRNA helicases: the tacticians of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 235-245.

Paul CP, Barry JK, Dinesh-Kumar SP, Brault V, Miller WA. 2001. A sequence required for -1 ribosomal frameshifting located four kilobases downstream of the frameshift site. *J Mol Biol* 310: 987-999.

Pestova TV, Lorsh JR, Hellen CUT. 2007. The Mechanism of Translation Initiation in Eukaryotes. In *Translational control in Biology and Medicine*, (ed. MB Mathews, N Sonenberg, JWB Hershey), pp. 87-128. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Petrov A, Kornberg G, O'Leary S, Tsai A, Uemura S, Puglisi JD. 2011. Dynamics of the translational machinery. *Curr Opin Struct Biol* 21: 137-145.

Pflugheber J, Fredericksen B, Sumpter R, Jr., Wang C, Ware F, Sodora DL, Gale M, Jr. 2002. Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4650-4655.

Pisareva VP, Pisarev AV, Komar AA, Hellen CU, Pestova TV. 2008. Translation initiation on mammalian mRNAs with structured 5'UTRs requires DExH-box protein DHX29. *Cell* 135: 1237-1250.

Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V, Damond F, Robertson DL, Simon F. 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 15: 871-872.

Poole ES, Brown CM, Tate WP. 1995. The identity of the base following the stop codon determines the efficiency of in vivo translational termination in *Escherichia coli*. *EMBO J* 14: 151-158.

Poulin F, Sonenberg N. 2003. Mechanism of translation initiation in eukaryotes. In *Translational Mechanisms*, (ed. J Lapointe, L Brakier-Gingras), pp. 380-297. Landes Bioscience/Eurekah.com/Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Pugliese A, Vidotto V, Beltramo T, Petrini S, Torre D. 2005. A review of HIV-1 Tat protein biological effects. *Cell Biochem Funct* 23: 223-227.

Pyronnet S, Dostie J, Sonenberg N. 2001. Suppression of cap-dependent translation in mitosis. *Genes Dev* 15: 2083-2093.

Qu X, Wen JD, Lancaster L, Noller HF, Bustamante C, Tinoco I, Jr. 2011. The ribosome uses two active mechanisms to unwind messenger RNA during translation. *Nature* 475: 118-121.

Ramakrishnan V. 2009. The ribosome: some hard facts about its structure and hot air about its evolution. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 74: 25-33.

Raught B, Gingras A-C. 2007. Signaling to Translation Initiation. In *Translational control in Biology and Medicine*, (ed. MB Mathews, N Sonenberg, JWB Hershey), pp. 369-400. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Raven JF, Koromilas AE. 2008. PERK and PKR: old kinases learn new tricks. *Cell Cycle* 7: 1146-1150.

Rein A, Datta SA, Jones CP, Musier-Forsyth K. 2011. Diverse interactions of retroviral Gag proteins with RNAs. *Trends Biochem Sci* 36: 373-380.

Reitz MS, Gallo RC. 2010. HTLV and HIV. In *Retroviruses*, (ed. R Kurth, N Bannert), pp. 417-443. Caister Academic Press, Norfolk, UK.

Ricci EP, Soto Rifo R, Herbreteau CH, Decimo D, Ohlmann T. 2008. Lentiviral RNAs can use different mechanisms for translation initiation. *Biochem Soc Trans* 36: 690-693.

Rivas-Aravena A, Ramdohr P, Vallejos M, Valiente-Echeverria F, Dormoy-Raclet V, Rodriguez F, Pino K, Holzmann C, Huidobro-Toro JP, Gallouzi IE et al. 2009. The Elav-like protein HuR exerts translational control of viral internal ribosome entry sites. *Virology* 392: 178-185.

Romani B, Engelbrecht S, Glashoff RH. 2009. Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology* 91: 1-12.

Ron D, Harding P. 2007. eIF2 α Phosphorylation in Cellular Stress Responses and Disease. In *Translational control in Biology and Medicine*, (ed. MB Mathews, N Sonenberg, JWB Hershey), pp. 345-368. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sadler AJ, Latchoumanin O, Hawkes D, Mak J, Williams BR. 2009. An antiviral response directed by PKR phosphorylation of the RNA helicase A. *PLoS Pathog* 5: e1000311.

Sanders CL, Curran JF. 2007. Genetic analysis of the E site during RF2 programmed frameshifting. *Rna* 13: 1483-1491.

Sanghvi VR, Steel LF. 2011. The cellular TAR RNA binding protein, TRBP, promotes HIV-1 replication primarily by inhibiting the activation of PKR. *J Virol*.

Scarлата S, Carter C. 2003. Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly. *Biochim Biophys Acta* 1614: 62-72.

SenGupta DN, Berkhout B, Gatignol A, Zhou AM, Silverman RH. 1990. Direct evidence for translational regulation by leader RNA and Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7492-7496.

Sengupta J, Nilsson J, Gursky R, Spahn CM, Nissen P, Frank J. 2004. Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nature structural & molecular biology* 11: 957-962.

Shehu-Xhilaga M, Crowe SM, Mak J. 2001. Maintenance of the Gag/Gag-Pol ratio is important for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization and viral infectivity. *J Virol* 75: 1834-1841.

Shoji S, Walker SE, Fredrick K. 2009. Ribosomal translocation: one step closer to the molecular mechanism. *ACS Chem Biol* 4: 93-107.

Skabkin MA, Skabkina OV, Dhote V, Komar AA, Hellen CUT, Pestova TV. 2010. Activities of Ligatin and MCT-1/DENR in eukaryotic translation initiation and ribosomal recycling. *Genes & Development* 24: 1787-1801.

Somogyi P, Jenner AJ, Brierley I, Inglis SC. 1993. Ribosomal pausing during translation of an RNA pseudoknot. *Mol Cell Biol* 13: 6931-6940.

Sonenberg N, Hinnebusch AG. 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136: 731-745.

Soto-Rifo R, Limousin T, Rubilar PS, Ricci EP, Decimo D, Moncorge O, Traub MA, Andre P, Cimarelli A, Ohlmann T. 2011. Different effects of the TAR structure on HIV-1 and HIV-2 genomic RNA translation. *Nucleic Acids Res*.

Staple DW, Butcher SE. 2005. Solution structure and thermodynamic investigation of the HIV-1 frameshift inducing element. *J Mol Biol* 349: 1011-1023.

Stauber RH, Pavlakis GN. 1998. Intracellular trafficking and interactions of the HIV-1 Tat protein. *Virology* 252: 126-136.

Steitz TA. 2008. A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 242-253.

Steitz TA, Moore PB. 2003. RNA, the first macromolecular catalyst: the ribosome is a ribozyme. *Trends Biochem Sci* 28: 411-418.

Svitkin YV, Pause A, Sonenberg N. 1994. La autoantigen alleviates translational repression by the 5' leader sequence of the human immunodeficiency virus type 1 mRNA. *J Virol* 68: 7001-7007.

Tahirov TH, Babayeva ND, Varzavand K, Cooper JJ, Sedore SC, Price DH. 2010. Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb. *Nature* 465: 747-751.

Takyar S, Hickerson RP, Noller HF. 2005. mRNA Helicase Activity of the Ribosome. *Cell* 120: 49-58.

Taylor DJ, Nilsson J, Merrill AR, Andersen GR, Nissen P, Frank J. 2007. Structures of modified eEF2 80S ribosome complexes reveal the role of GTP hydrolysis in translocation. *EMBO J* 26: 2421-2431.

Telenti A, Martinez R, Munoz M, Bleiber G, Greub G, Sanglard D, Peters S. 2002. Analysis of natural variants of the human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshift stem-loop structure. *J Virol* 76: 7868-7873.

Terenin IM, Dmitriev SE, Andreev DE, Shatsky IN. 2008. Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2. *Nature structural & molecular biology* 15: 836-841.

Thakor N, Holcik M. 2012. IRES-mediated translation of cellular messenger RNA operates in eIF2 α - independent manner during stress. *Nucleic Acids Res* 40: 541-552.

Tsuchihashi Z, Brown PO. 1992. Sequence requirements for efficient translational frameshifting in the Escherichia coli dnaX gene and the role of an unstable interaction between tRNA(Lys) and an AAG lysine codon. *Genes Dev* 6: 511-519.

Tu C, Tzeng TH, Bruenn JA. 1992. Ribosomal movement impeded at a pseudoknot required for frameshifting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8636-8640.

Uemura S, Aitken CE, Korlach J, Flusberg BA, Turner SW, Puglisi JD. 2010. Real-time tRNA transit on single translating ribosomes at codon resolution. *Nature* 464: 1012-1017.

UNAIDS. 2010. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2010. United Nations Program on HIV/AIDS (UNAIDS), Genève.

Vallejos M, Deforges J, Plank TD, Letelier A, Ramdohr P, Abraham CG, Valiente-Echeverria F, Kieft JS, Sargueil B, Lopez-Lastra M. 2011. Activity of the human immunodeficiency virus type 1 cell cycle-dependent internal ribosomal entry site is modulated by IRES trans-acting factors. *Nucleic Acids Res* 39: 6186-6200.

van den Beucken T, Koritzinsky M, Wouters BG. 2006. Translational control of gene expression during hypoxia. *Cancer biology & therapy* 5: 749-755.

Van Duyne R, Kehn-Hall K, Carpio L, Kashanchi F. 2009. Cell-type-specific proteome and interactome: using HIV-1 Tat as a test case. *Expert Rev Proteomics* 6: 515-526.

Van Eden ME, Byrd MP, Sherrill KW, Lloyd RE. 2004. Demonstrating internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNAs using stringent RNA test procedures. *Rna* 10: 720-730.

van Weringh A, Ragonnet-Cronin M, Pranckeviciene E, Pavon-Eternod M, Kleiman L, Xia X. 2011. HIV-1 modulates the tRNA pool to improve translation efficiency. *Molecular biology and evolution* 28: 1827-1834.

Verhoef K, Tijms M, Berkhout B. 1997. Optimal Tat-mediated activation of the HIV-1 LTR promoter requires a full-length TAR RNA hairpin. *Nucleic Acids Res* 25: 496-502.

Vrolijk MM, Harwig A, Berkhout B, Das AT. 2009. Destabilization of the TAR hairpin leads to extension of the polyA hairpin and inhibition of HIV-1 polyadenylation. *Retrovirology* 6: 13.

Vrolijk MM, Ooms M, Harwig A, Das AT, Berkhout B. 2008. Destabilization of the TAR hairpin affects the structure and function of the HIV-1 leader RNA. *Nucleic Acids Research* 36: 4352-4363.

Waheed AA, Freed EO. 2011. HIV Type 1 Gag as a Target for Antiviral Therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*.

Wang J, Reuschel EL, Shackelford JM, Jeang L, Shivers DK, Diehl JA, Yu XF, Finkel TH. 2011. HIV-1 Vif promotes the G- to S-phase cell-cycle transition. *Blood* 117: 1260-1269.

Watts JM, Dang KK, Gorelick RJ, Leonard CW, Bess Jr JW, Swanstrom R, Burch CL, Weeks KM. 2009. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature* 460: 711-716.

Wei P, Garber ME, Fang SM, Fischer WH, Jones KA. 1998. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* 92: 451-462.

Weinberger LS, Burnett JC, Toettcher JE, Arkin AP, Schaffer DV. 2005. Stochastic gene expression in a lentiviral positive-feedback loop: HIV-1 Tat fluctuations drive phenotypic diversity. *Cell* 122: 169-182.

Wilkinson KA, Gorelick RJ, Vasa SM, Guex N, Rein A, Mathews DH, Giddings MC, Weeks KM. 2008. High-throughput SHAPE analysis reveals structures in HIV-1 genomic RNA strongly conserved across distinct biological states. *PLoS Biol* 6: e96.

Williams BR. 1999. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* 18: 6112-6120.

Wills NM, Moore B, Hammer A, Gesteland RF, Atkins JF. 2006. A functional -1 ribosomal frameshift signal in the human paraneoplastic Ma3 gene. *J Biol Chem* 281: 7082-7088.

Wills NM, O'Connor M, Nelson CC, Rettberg CC, Huang WM, Gesteland RF, Atkins JF. 2008. Translational bypassing without peptidyl-tRNA anticodon scanning of coding gap mRNA. *EMBO J* 27: 2533-2544.

Wohlgemuth I, Pohl C, Mittelstaet J, Konevega AL, Rodnina MV. 2011. Evolutionary optimization of speed and accuracy of decoding on the ribosome. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 366: 2979-2986.

Wolin SL, Walter P. 1988. Ribosome pausing and stacking during translation of a eukaryotic mRNA. *EMBO J* 7: 3559-3569.

Yedavalli VS, Jeang KT. 2010. Trimethylguanosine capping selectively promotes expression of Rev-dependent HIV-1 RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 14787-14792.

Yedavalli VS, Neuveut C, Chi YH, Kleiman L, Jeang KT. 2004. Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell* 119: 381-392.

Yilmaz A, Bolinger C, Boris-Lawrie K. 2006. Retrovirus translation initiation: Issues and hypotheses derived from study of HIV-1. *Curr HIV Res* 4: 131-139.

Yokoyama T, Shaikh TR, Iwakura N, Kaji H, Kaji A, Agrawal RK. 2012. Structural insights into initial and intermediate steps of the ribosome-recycling process. *EMBO J*.

Yusupov MM, Yusupova GZ, Baucom A, Lieberman K, Earnest TN, Cate JH, Noller HF. 2001. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 292: 883-896.

Zhou H, Xu M, Huang Q, Gates AT, Zhang XD, Castle JC, Stec E, Ferrer M, Strulovici B, Hazuda DJ et al. 2008. Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell host & microbe* 4: 495-504.

Annexe I

Targeting frameshifting in the human immunodeficiency virus

Léa Brakier-Gingras^{1*}, Johanie Charbonneau¹ and Samuel E. Butcher²

¹ Département de biochimie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3T 1J4

² Department of Biochemistry, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin
53706, United States

Expert Opinion on Therapeutic Targets, March 2012, Vol.16, p.249-258.

*Corresponding author:

Léa Brakier-Gingras,

Département de biochimie, Université de Montréal,

2900 boul. Édouard-Montpetit,

Montréal, Québec, Canada, H3T 1J4,

fax: 514-343-2210,

phone: 514-343-6316

Introduction

HIV-1 uses a programmed -1 ribosomal frameshift to generate Gag-Pol, the precursor of its enzymes, when its full-length mRNA is translated by the ribosomes of the infected cells. This change in the reading frame occurs at a so-called slippery sequence that is followed by a specific secondary structure, the frameshift stimulatory signal. This signal controls the frameshift efficiency. The synthesis of HIV-1 enzymes is critical for the virus replication and, therefore, the -1 ribosomal frameshift could be the target of novel antiviral drugs.

Areas covered

This review examines various approaches used to select drugs interfering with the -1 frameshift of HIV-1, such as the selection and modification of chemical compounds that specifically bind to the frameshift stimulatory signal, the use of antisense oligonucleotides targeting this signal and the selection of compounds that modulate HIV-1 frameshift by using bicistronic reporters where the expression of the second cistron depends upon HIV-1 frameshift.

Expert opinion

The most promising approach is the selection and modification of compounds specifically targeting HIV-1 frameshift stimulatory signal. The use of antisense oligonucleotides binding to the frameshift stimulatory signal is still questionable. The use of bicistronic reporters preferentially selects compounds that modulate the frameshift by targeting the ribosomes, which is less promising.

Keywords: -1 ribosomal frameshift; antiframe-shift agents; Gag-Pol/Gag ratio; HIV-1

Content

1. The programmed -1 ribosomal frameshift in HIV-1
2. Do programmed -1 ribosomal frameshifts occur during translation of cellular genes?
3. The frameshift as a target
4. Approaches that target HIV-1 frameshift
5. Conclusion
6. Expert opinion

Article highlights

- The programmed -1 frameshift that occurs upon translation of the full-length messenger RNA of HIV-1 generates the precursor of the viral enzymes.
- This frameshift occurs at a specific sequence on the viral mRNA, the slippery sequence, which is followed by an irregular stem-loop, the frameshift stimulatory signal. This signal controls the efficiency of the frameshift, which is critical for the virus replication.
- Altering the stability of the frameshift stimulatory signal can change the frameshift efficiency.
- Small chemical compounds were found to bind to the frameshift stimulatory signal and to modulate the frameshift efficiency.
- An absolute requirement is to increase the specificity of binding of these compounds. Those that satisfy this requirement will constitute promising novel anti-HIV-1 drugs.

1. The programmed -1 ribosomal frameshift in HIV-1

The human immunodeficiency virus of type 1 (HIV-1) is a retrovirus, which causes the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), a major health concern, and continues its deadly spread in spite of great progress in the current antiretroviral therapy. This situation makes it urgent to develop novel drugs against HIV-1 and to characterize novel targets in this virus. One such target is a ribosomal frameshift, a change in the reading frame that occurs during the translation of one of the messenger RNAs (mRNAs) produced by the virus. Once the genome of HIV-1 is integrated into the DNA of the infected host, it generates, by transcription and splicing, a variety of mRNAs. Among them is the so-called full-length viral mRNA, which is unspliced and corresponds to the whole viral genome [1]. Translation of the HIV-1 full-length mRNA generates Gag, the precursor of the viral structural proteins and, via a programmed -1 frameshift, Gag-Pol, the precursor of the viral enzymes. This frameshift consists of a shift of the translational reading frame by one nucleotide in the 5' direction (-1 frameshift), and is programmed since it is not random but occurs when ribosomes reach a specific sequence on the mRNA (Figure 1). This programmed change in the reading frame was discovered more than two decades ago [2] and, since that time, enormous progress has been made in the elucidation of the mechanism accounting for this frameshift.

The sequence where the shift occurs on the viral mRNA is the so-called slippery sequence, U-UUU-UUA (with codons presented in the zero frame). Nucleotides upstream of the heptanucleotide can also contribute to the frameshift efficiency (see below). The slippery sequence is followed by the frameshift stimulatory signal, which is an irregular helix made of a lower and an upper stems separated by a purine bulge. The structure of the frameshift stimulatory signal was first proposed from site-directed mutagenesis studies [3] and solved by NMR [4, 5] (Figure 2). These structural studies and the other studies reported in this review correspond to the HIV-1 group M subtype B, the group and subtype that prevail in the Western World. It is known that the group M of HIV-1 is responsible for the pandemic of AIDS [6]. The slippery sequence is conserved in all the subtypes of group M, but there are differences in the sequence of the frameshift stimulatory signal although this

sequence is highly conserved within each subtype as shown by the Los Alamos HIV Sequence Database (<http://hiv-web.lanl.gov>). However, in all subtypes, the signal maintains the same bulged helix secondary structure [7].

The lower stem of the frameshift stimulatory signal is unstable [4, 5] and easily unwound by ribosomes translating the viral mRNA. On the other hand, the upper stem is extraordinarily stable [4, 5], interferes with the movement of the ribosomes and constitutes the effective frameshift stimulatory signal [8]. After peptide bond formation, normal translocation during translation elongation allows the deacylated tRNA and the peptidyl-tRNA to move from the P and A sites to the E and P sites, respectively, dragging the mRNA by three nucleotides in the process [9, 10] (Figure 3A). A current attractive model for programmed -1 ribosomal frameshifts is that the frameshift is triggered by an incomplete translocation of two nucleotides instead of three, due to the resistance of the upper stem of the frameshift stimulatory signal to unwinding. This incomplete translocation, which occurs in the elongation cycle prior to the occupancy of the P and A sites by the slippery sequence, prevents the deacylated tRNA and peptidyl-tRNA from occupying the standard E and P sites. As a result, the two tRNAs occupy intermediate sites, displaced by only two nucleotides from their initial position. Note that this incomplete movement occurs only for a small proportion of ribosomes, as the frameshift efficiency in cultured human cells is approximately 10% [11]. Therefore, the majority of ribosomes succeed in unwinding the upper stem and continue translation in the zero frame. Because of the incomplete movement of the two tRNAs, the last codon of the slippery sequence, UUA is positioned in an intermediate entry site that will be occupied by the incoming aminoacyl-tRNA^{Leu}. After the arrival of this tRNA, the three tRNAs unpair from the mRNA and move sequentially by one nucleotide in the 5' direction and re-pair to the mRNA in the -1 frame (Figure 3B). The movement of these tRNAs into the -1 frame is presumably driven by the many favourable contacts between the tRNAs and the standard ribosomal A, P and E sites [12, 13]. The ribosomes then unfold the upper stem and translation continues in the -1 reading frame. Also, it is possible that ribosomes use more than one mechanism for changing the reading frame [reviewed in 13, 14]. For example, an incomplete two-base translocation that triggers a -1 frameshift could occur for a small proportion of ribosomes in

the following elongation cycle, when the slippery sequence occupies the P and A sites [15]. One still unsolved question concerns the fact that only a small proportion of the ribosomes make a -1 frameshift. There are two basic hypotheses that could explain this phenomenon. The first is based on the idea that translating ribosomes are processive Brownian motors [16]. This model posits that translating ribosomes experience stochastic thermal fluctuations that produce a Boltzmann distribution of energetic states, with some ribosomes in a more stable state and others in a less stable state. If frameshifting involves overcoming an energetic barrier, then only the small fraction of ribosomes that are in a favourable energetic state may shift into the -1 frame. A second, alternative hypothesis is that a small population of ribosomes are specialized to frameshift with high efficiency. An example of such specialized ribosomes would be those that lack a ribosomal protein or differ in posttranscriptional or posttranslational modifications from the majority of the ribosome population [17]. This latter hypothesis suggests that frameshifting may be modulated by cellular conditions, which could explain why reported measurements of HIV-1 frameshift efficiencies vary widely depending upon the source of translating ribosomes [18]. Recently, a novel mechanism was proposed for a murine leukaemia virus -1 recoding by readthrough of a stop codon, suggesting that an equilibrium-dependent switch between two conformations of the readthrough stimulatory signal controls the readthrough efficiency. However, this switch does not appear to exist for HIV-1 frameshift stimulatory signal [19].

The frameshift efficiency depends upon the kinetics of translation elongation [14]. Also, since the frameshift stimulatory signal is unwound after the passage of a ribosome, whether the next ribosome is close or at a distance will provide less or more time for the signal to refold before encountering this ribosome. This influences the probability of frameshifting, since no frameshift occurs in the absence of the frameshift stimulatory signal. Therefore, although the frameshift occurs during the elongation phase of translation, it has been shown that translation initiation can modulate the frameshift efficiency by influencing the distance between translating ribosomes [20, 21]. Cellular factors could also affect the frameshift. An example found so far is the release factor eRF1 [22]. Depletion of this factor was shown to enhance HIV-1 frameshifting about two-fold but the mechanism accounting for this effect is unknown. In the same trend, it can be hypothesized that some

cellular kinases and phosphatases could also affect the frameshift efficiency by modulating the activity of various factors involved in translation.

2. Do programmed -1 ribosomal frameshifts occur during translation of cellular genes?

So far, two genes of retroviral origin that use a programmed -1 ribosomal frameshift have been found in humans: PEG10 [23], which is highly expressed during development and is also expressed in a limited number of adult tissues, and could play a role in cancer [24], and the human paraneoplastic antigen Ma3 gene, whose ectopic expression in tumor cells is associated with serious neurological phenotypes [25]. The tumor suppressor APC, a regulator of intestinal stem cell proliferation, is also proposed to use a programmed -1 frameshift in humans [26]. In yeast, it has been shown that operational -1 frameshifts destabilize mRNAs, thus controlling their abundance [27, 28], and it is suggested that this type of regulation could be found in all eukaryote genomes. (Note that these frameshifts are not called programmed because they do not generate a distinct protein. However, they share the characteristics of programmed -1 frameshifts i.e. a slippery sequence and a downstream frameshift stimulatory signal.) Also, it is known that ribosomal frameshifts can contribute to epitopes for an expanded repertoire of cytotoxic CD8 T-cells, but the mechanisms accounting for these frameshifts are not known [29]. The occurrence of programmed translational frameshift events in humans has consequences for the development of novel retroviral drugs.

3. The frameshift as a target

The frameshift efficiency in HIV-1 controls the Gag-Pol/Gag ratio that appears critical for virus assembly and maturation. It is commonly assumed that a deviation of this ratio, whether a decrease or an increase, would handicap viral replication. This notion originated from assays using a double-stranded RNA virus in yeast whose replication requires a programmed -1 frameshift [30]. However, this virus can use a range of frameshift efficiencies from 1.3 to 3.5% for its replication, showing that doubling a basal value does

not interfere with viral replication. Subsequent studies directed at the HIV-1 frameshift site supported the idea that a decrease or, depending upon its extent, an increase in frameshift efficiency inhibits viral replication (see below).

A small decrease (30 to 60%) of HIV-1 frameshift efficiency was observed in response to sequence changes in the slippery site or the frameshift stimulatory signal, either as the result of natural variations [31] or via laboratory mutations [11]. Such sequence changes indeed handicap viral replication and it has been proposed that even a small shortage of Gag-Pol can inhibit the assembly of functional virions. But what happens when there is an increase in HIV-1 frameshift efficiency, therefore an excess of Gag-Pol? Interestingly, a two-fold increase in HIV-1 frameshift efficiency, obtained with either the ribosome-targeting drug sparsomycin [32] or a hydrazide derivative [33], resulted in an increase in viral replication. This observation can be explained if the Pol proteins are limiting during viral assembly, and is in agreement with the observation mentioned above for the yeast virus, confirming that there is a window of values for HIV-1 frameshift efficiencies that are compatible with the virus replication. Shehu-Xhilaga et al. [34] co-transfected cultured 293 T cells with HIV-1 proviral DNA and an HIV-1 Gag-Pol expression vector. With this procedure, a range of Gag-Pol/Gag ratios was artificially obtained and it was found that an increase of about four-fold or more of the basal Gag-Pol/Gag ratio actually interfered with viral replication. However, no change was seen in the proportion of Gag-Pol versus Gag within the virions. The authors related the problem caused by the increased Gag-Pol/Gag ratio to a reduction of the RNA dimer stability within the virions produced under those conditions. One can also wonder what happens if the stability of the frameshift stimulatory signal is increased, thus increasing its resistance to unwinding and its interference with translocation. It had been observed that decreasing the stability of the upper stem of HIV-1 frameshift stimulatory signal decreases the frameshift efficiency, but increasing this stability also decreases this frameshift efficiency [35]. More recently, Sorensen and his colleagues investigated how artificial frameshift stimulatory signals with an increased stability influence frameshifting in bacteria. They found that, beyond a given threshold, a fraction of the ribosomes that frameshifted as well as a fraction of those that did not frameshift were stalled at the signal, preventing them from continuing

translation [36]. Thus, if this is applied to HIV-1, an increased stability of the frameshift signal would handicap HIV-1 replication by interfering with translation of Gag and Gag-Pol. Altogether, these results show that a drug targeting the -1 ribosomal frameshift of HIV-1 must bring the frameshift efficiency outside the window of efficiencies that are acceptable for the virus. Increasing the basal frameshift value presents the danger that it may be insufficient to handicap viral replication and may even stimulate it, whereas decreasing the basal frameshift value is generally able to interfere with viral replication, even if this decrease is small.

4. Approaches that target HIV-1 frameshift

The importance of the frameshift efficiency in the control of the Gag-Pol/Gag ratio encouraged the development of various approaches attempting to discover small molecules that could modulate HIV-1 frameshift efficiency. Several of these approaches took advantage of the fact that HIV-1 frameshift efficiency can be recapitulated in yeast and bacteria [37, 38]. Dinman et al. [39] first showed that drugs targeting the ribosome such as sparsomycin and anisomycin altered the efficiency of a programmed -1 frameshift when they were used at sub-lethal doses. A pioneering work was performed by Hung et al. [40], who used a reporter firefly luciferase with the frameshift region of HIV-1 inserted in the coding sequence of luciferase, such that only ribosomes that make a -1 frameshift in this region synthesize the C-terminal part of luciferase and therefore a functional protein. A control reporter was made where the two portions of luciferase were in frame and where the slippery sequence was inactivated by mutagenesis. The reporter mRNAs were translated in a rabbit reticulocyte lysate and high-throughput screening of a library of 56,000 chemical agents selected a benzene derivative, RG501, which increased HIV-1 frameshift efficiency two-fold with the frameshift reporter while having a minimal effect on the translation of the control reporter, and was found to interfere with HIV-1 replication. It was recently demonstrated by the group of Butcher that the selected compound does indeed interact with HIV-1 frameshift stimulatory signal. However, it also interacts non-specifically with other RNAs, and its structure suggests that it can bind to any RNA helix of nine base pairs or greater in length [41]. This is consistent with the data of Hung et al. [40] indicating that

RG501 modulates the efficiency of a large number of programmed -1 frameshifts. The observed lack of specificity suggests that RG501 can in fact target the ribosome, a rich source of helical RNA structures [41]. Furthermore, its interference with viral replication was observed at doses much lower than those altering the frameshift efficiency, casting a doubt on a direct relationship between this interference and the change in frameshift efficiency [42]. In order to better control for non-specific effects on translation in frameshift assays, bicistronic reporters were developed where expression of the second cistron depends upon the HIV-1 frameshift. Among these were bicistronic luciferase reporters with Renilla luciferase as the first cistron and firefly luciferase as the second cistron [43, 44]. Fluorescent bicistronic reporters (with the Red Fluorescent Protein and Green Fluorescent Protein) were also developed (see Figure 4), which have been utilized in bacteria [45], in cultured mammalian cells [46] and in yeast [47]. The bacterial system [45] was used to screen a library of arginine-rich peptides and successfully selected a small number of peptides that decreased HIV-1 frameshift efficiency about two-fold. Two out of ten peptides were shown to decrease HIV-1 frameshift efficiency by about 40% when coexpressed with an appropriate dual-luciferase reporter in cultured mammalian cells, but these peptides have not yet been tested for their effect on HIV-1 replication. Also, the peptides were not specific for the HIV-1 frameshift and modulated other programmed -1 frameshifts, suggesting that their target is the ribosome, as in the study of Hung et al. Recently, Dulude et al. [33] screened a library of 80,000 chemical compounds using a dual-luciferase reporter expressed in cultured mammalian cells. They selected a hydrazide derivative that increased HIV-1 frameshift efficiency about two-fold. However, this derivative did not interfere with HIV-1 replication but stimulated it, as mentioned above. This stresses the fact that a window of frameshift values is compatible with HIV-1 replication. The selected compound was not specific for the HIV-1 programmed -1 frameshift, also suggesting that its target was the ribosome.

Two independent research groups, the group of Butcher and that of Miller focused on the selection by high-throughput screening of drugs interacting with HIV-1 frameshift stimulatory signal and on the synthesis of modified drugs susceptible to interact specifically with that structure. Butcher and coworkers found that guanidoneomycin, obtained by

modifying neomycin [48], and doxorubicin, selected by high-throughput screening of 34,500 compounds [49], interact with HIV-1 frameshift signal. These compounds however lack specificity and bind to other targets. They obviously need to be optimized, but set the stage for the development of improved drugs that could efficiently and specifically target HIV-1 frameshift signal. As mentioned above, the Butcher group also studied the interaction between HIV-1 frameshift stimulatory signal and RG501, the compound selected by Hung et al. [40] in the first high-throughput screening attempting to target the HIV-1 frameshift event [41]. This study provides useful information for the characterization of potential modifications that may increase specificity of binding to the HIV-1 frameshift stimulatory signal.

The group of Miller synthesised and screened in situ an 11,325 member resin-bound dynamic combinatorial library, based on a core structure inspired by nucleic acid binding bis-intercalating natural products [50]. A set of disulfide-containing peptides was obtained whose stability was enhanced by incorporating an olefin bioisostere of the disulfide moiety [51]. These promising products are not toxic, have binding affinities (K_d) in the high nanomolar to low micromolar range, and display some specificity towards the HIV-1 frameshift stimulatory signal. However, they have not yet been assayed against HIV-1.

A completely different approach consists of using modified oligonucleotides that could affect ribosomal -1 frameshifting by binding to an mRNA downstream of a slippery sequence. Initially, it was shown that the binding of these oligonucleotides, in the absence of the authentic frameshift stimulatory signal, created a duplex that interferes with the movement of the ribosome along the mRNA [52-54]. Among the modified oligonucleotides used were antisense morpholino RNA oligonucleotides or nucleotides bearing locked nucleic acid (LNA) modifications that resist degradation by cellular nucleases and have a high affinity for their complementary sequence. Interestingly, Oh and coworkers recently showed that an antisense peptide-oligonucleotide complementary to a portion of the frameshift stimulatory signal decreased the frameshift efficiency of the coronavirus that causes the severe acute respiratory syndrome (SARS) [55] and interfered with the virus replication. They hypothesized that the binding of the antisense oligonucleotide altered the

structure of the frameshift stimulatory signal and increased its resistance to the movement of the ribosomes along the RNA. As discussed above, increasing the stability of the frameshift stimulatory signal can stall the ribosomes on the slippery sequence, accounting for the observed decrease in the frameshift efficiency. However, so far, no antisense oligonucleotide was found that could interfere with HIV-1 frameshifting. In one case, an oligonucleotide complementary to a portion of the frameshift region was crosslinked to its target [56]. This blocked translation of the viral messenger, but such procedure is not appropriate for the development of anti-HIV drugs. Moreover, a potential problem is that antisense oligonucleotides can induce dramatic immune modulation by binding to Toll-like receptors [57].

5. Conclusion

A large number of drugs against HIV-1 have been developed and are successfully used to target the viral enzymes or entry [58, 59]. However, the rapid emergence of drug-resistant variants underlines the necessity to envisage other targets and to continue the search for new drugs against HIV-1. The HIV-1 frameshift constitutes a target that has not been exploited so far, but is very promising for the development of novel antiretroviral drugs [see also 60].

6. Expert opinion

After a survey of the present research on targeting the HIV-1 frameshift event, it appears that the use of bicistronic reporters preferentially selects for drugs interacting with the ribosomes, which contain a very large variety of RNA structures. Our opinion is that drugs targeting the ribosomes should not be favoured, in light of the key role played by ribosomes in cellular life and the high probability that such drugs would cause a number of toxic effects. Moreover, the frameshift events that occur in human genes could be affected under these conditions, with unknown and potentially dangerous side effects. The same comment applies to drugs targeting cellular factors that could modulate programmed -1 frameshifts. As to the oligonucleotides targeting frameshift stimulatory signals, their use is

based on a simple principle and one successful case has been reported with the SARS coronavirus. Whether a similar approach can be applied with success to the HIV-1 frameshift stimulatory signal is however still questionable.

In light of the current results, our opinion is that the most promising approach is the one that selects compounds specifically targeting the frameshift stimulatory signal of HIV-1. The power of chemistry makes it possible to select, modify and improve compounds satisfying the conditions of specificity, high affinity for the target and lack of toxicity. Also, as suggested by the group of Butcher [41], the use of “RNA-focused” fragment libraries [61] could be highly beneficial for this search. Such RNA-focused libraries would contain compounds that are complementary to the chemical composition of RNA, e.g. planar aromatic groups for stacking on nucleobases, positively charged groups that can interact with phosphates, and polar, peptide-like groups that can hydrogen bond to various functional groups on the RNA [51]. There are still many hurdles in this approach but it appears to have an enormous potential. As mentioned above, there are variations in the sequence of the frameshift stimulatory signal between the subtypes of HIV-1 group M [7], suggesting that different compounds may need to be developed against the different subtypes. The expertise obtained with drugs targeting HIV-1 group M subtype B, which has been the subject of the studies targeting the ribosomal frameshift to date, should be readily transferrable to the search for drugs targeting other subtypes.

Bibliography

1. Nekhai S, Jeang KT. Transcriptional and post-transcriptional regulation of HIV-1 gene expression: role of cellular factors for Tat and Rev. *Future Microbiol* 2006;1:417-26
2. Jacks T., Power MD, Masiarz FR, et al. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 1988;331:280-3
3. Dulude D., Baril M, Brakier-Gingras L. Characterization of the frameshift stimulatory signal controlling a programmed -1 ribosomal frameshift in the human immunodeficiency virus type 1. *Nucleic Acids Res* 2002;30:5094-102

4. Gaudin C, Mazauric MH, Traikia M, et al. Structure of the RNA signal essential for translational frameshifting in HIV-1. *J Mol Biol* 2005;349:1024-35
5. Staple DW, Butcher SE. Solution structure and thermodynamic investigation of the HIV-1 frameshift inducing element. *J Mol Biol* 2005;349:1011-23
6. Yang SJ, Lopez LA, Exline CM, et al. Lack of adaptation to human tetherin in HIV-1 Group O and P. *Retrovirology* 2011;8:78
7. Baril M, Dulude D, Gendron K, et al. Efficiency of a programmed -1 ribosomal frameshift in the different subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 group M. *RNA* 2003;9:1246-53
8. Mazauric MH, Seol Y, Yoshizawa S, et al. Interaction of the HIV-1 frameshift signal with the ribosome. *Nucleic Acids Res* 2009;37:7654-64
9. Fu J, Munro JB, Blanchard SC, et al. Cryoelectron microscopy structures of the ribosome complex in intermediate states during tRNA translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:4817-21
10. Fischer N, Konevega AL, Wintermeyer W, et al., Ribosome dynamics and tRNA movement by time-resolved electron cryomicroscopy. *Nature* 2010;466:329-33
11. Dulude D, Berchiche YA, Gendron K, et al. Decreasing the frameshift efficiency translates into an equivalent reduction of the replication of the human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 2006;345:127-36
12. Léger M, Dulude D, Steinberg SV, et al. The three transfer RNAs occupying the A, P and E sites on the ribosome are involved in viral programmed -1 ribosomal frameshift. *Nucleic Acids Res* 2007;35:5581-5592

This study presents a new model accounting for the mechanism of -1 ribosomal frameshifts, according to which not only the tRNAs binding to the slippery sequence but also the tRNA binding to the codon upstream of this sequence are involved in the frameshift. A critical analysis of other models that were proposed to account for -1 frameshifts is also presented.

13. Brakier-Gingras L, Dulude D. Programmed -1 ribosomal frameshift in the human immunodeficiency virus of type 1, in *Recoding. Expansion of decoding rules enriches gene expression*, J.F. Atkins and R.F. Gesteland, Editors. 2010, Springer: New York, NY.:175-192

14. Liao PY, Choi YS, Dinman JD, et al. The many paths to frameshifting: kinetic modelling and analysis of the effects of different elongation steps on programmed -1 ribosomal frameshifting. *Nucleic Acids Res* 2011;39:300-12

An interesting analysis of the possible models accounting for HIV-1 ribosomal frameshift, based on an analysis of the kinetics of the different substeps of elongation during protein synthesis.

15. Weiss RB, Dunn DM, Shuh M, et al. E. coli ribosomes re-phase on retroviral frameshift signals at rates ranging from 2 to 50 percent. *New Biol* 1989;1:159-69

16. Frank J, Gonzalez Jr RL. Structure and dynamics of a processive Brownian motor: the translating ribosome. *Annu Rev Biochem* 2010;79:381-412

17. Gilbert WV. Functional specialization of ribosomes? *Trends Biochem Sci* 2011;36:127-32

18. Plant EP, Dinman JD. Comparative study of the effects of heptameric slippery site composition on -1 frameshifting among different eukaryotic systems. *RNA* 2006;12: 666-73

19. Houck-Loomis B, Durney MA, Salguero C, et al. An equilibrium-dependent retroviral mRNA switch regulates translational recoding. *Nature* 2011;480:561-64

20. Gendron K, Charbonneau J, Dulude D, et al. The presence of the TAR RNA structure alters the programmed -1 ribosomal frameshift efficiency of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by modifying the rate of translation initiation. *Nucleic Acids Res* 2008;36: 30-40

21. Charbonneau J, Gendron K, Ferbeyre G, et al. The 5'UTR of HIV-1 full-length mRNA and the Tat viral protein modulate the programmed -1 ribosomal frameshift that generates HIV-1 enzymes. *RNA* 2012;In press
22. Kobayashi Y, Zhuang J, Peltz S, et al. Identification of a cellular factor that modulates HIV-1 programmed ribosomal frameshifting. *J Biol Chem* 2010;285:19776-84
23. Clark MB, Janicke M, Gottesbuhren U, et al. Mammalian gene PEG10 expresses two reading frames by high efficiency -1 frameshifting in embryonic-associated tissues. *J Biol Chem* 2007;282:37359-69
24. Lux H, Flammann H, Hafner M, et al. Genetic and molecular analyses of PEG10 reveal new aspects of genomic organization, transcription and translation. *PLoS One* 2010;5:e8686
25. Wills NM, Moore B, Hammer A, et al. A functional -1 ribosomal frameshift signal in the human paraneoplastic Ma3 gene. *J Biol Chem* 2006;281:7082-8
26. Baranov PV, Wills NM, Barriscale KA, et al. Programmed ribosomal frameshifting in the expression of the regulator of intestinal stem cell proliferation, adenomatous polyposis coli (APC). *RNA Biol* 2011;8:637-647
27. Plant EP, Wang P, Jacobs JL, et al. A programmed -1 ribosomal frameshift signal can function as a cis-acting mRNA destabilizing element. *Nucleic Acids Res* 2004;32:784-90
28. Belew AT, Advani VM, Dinman JD. Endogenous ribosomal frameshift signals operate as mRNA destabilizing elements through at least two molecular pathways in yeast. *Nucleic Acids Res* 2011;39:2799-808
29. Carlson TL, Green KA, Green WR. Alternative translational reading frames as a novel source of epitopes for an expanded CD8 T-cell repertoire: use of a retroviral system to assess the translational requirements for CTL recognition and lysis. *Viral Immunol* 2010;23:577-83

30. Dinman JD, Wickner RB. Ribosomal frameshifting efficiency and gag/gag-pol ratio are critical for yeast M1 double-stranded RNA virus propagation. *J Virol* 1992;66:3669-76
31. Telenti A, Martinez R, Munoz M, et al. Analysis of natural variants of the human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshift stem-loop structure. *J Virol* 2002;76:7868-73
32. Miyauchi K, Komano J, Myint L, et al. Rapid propagation of low-fitness drug-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 by a streptococcal metabolite sparsomycin. *Antivir Chem Chemother* 2006;17:167-74
33. Dulude D, Guenier AS, Duchaine J, et al. Increase of HIV-1 frameshift efficiency by a hydrazide compound enhances HIV-1 replication. Submitted to *Plos One*.
34. Shehu-Xhilaga M, Crowe SM, Mak J. Maintenance of the Gag/Gag-Pol ratio is important for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization and viral infectivity. *J Virol* 2001;75:1834-41
35. Bidou L, Stahl G, Grima B, et al. In vivo HIV-1 frameshifting efficiency is directly related to the stability of the stem-loop stimulatory signal. *RNA* 1997;3:1153-8
36. Tholstrup J, Oddershede LB, Sorensen MA. mRNA pseudoknot structures can act as ribosomal roadblocks. *Nucleic Acids Res* 2012;40:303-13
37. Stahl G, Bidou L, Rousset J, et al. Versatile vectors to study recoding: conservation of rules between yeast and mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 1995;23:1557-60
38. Léger M, Sidani S, Brakier-Gingras L. A reassessment of the response of the bacterial ribosome to the frameshift stimulatory signal of the human immunodeficiency virus type 1. *RNA* 2004;10:1225-35
39. Dinman JD, Ruiz-Echevarria MJ, Peltz SW. Translating old drugs into new treatments: ribosomal frameshifting as a target for antiviral agents. *Trends Biotechnol* 1998;16:190-6
40. Hung M, Patel P, Davis S, et al. Importance of ribosomal frameshifting for human immunodeficiency virus type 1 particle assembly and replication. *J Virol* 1998;72:4819-24

41. Marcheschi RJ, Tonelli M, Kumar A, et al. Structure of the HIV-1 Frameshift Site RNA Bound to a Small Molecule Inhibitor of Viral Replication. *ACS Chem Biol* 2011;6:857-64
42. Brierley I, Dos Ramos FJ. Programmed ribosomal frameshifting in HIV-1 and the SARS-CoV. *Virus Res* 2006;119:29-42
43. Grentzmann G, Ingram JA, Kelly PJ, et al. A dual-luciferase reporter system for studying recoding signals. *RNA* 1998;4:479-86
44. Harger JW, Dinman JD. An in vivo dual-luciferase assay system for studying translational recoding in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 2003;9:1019-24
45. Dulude D, Theberge-Julien G, Brakier-Gingras L, et al. Selection of peptides interfering with a ribosomal frameshift in the human immunodeficiency virus type 1. *RNA* 2008;14:981-91
46. Cardno TS, Poole ES, Mathew SF, et al. A homogeneous cell-based bicistronic fluorescence assay for high-throughput identification of drugs that perturb viral gene recoding and read-through of nonsense stop codons. *RNA* 2009;15:1614-21
47. Rakauskaitė R, Liao PY, Rhodin MH, et al. A rapid, inexpensive yeast-based dual-fluorescence assay of programmed--1 ribosomal frameshifting for high-throughput screening. *Nucleic Acids Res* 2011;39:e97
48. Staple DW, Venditti V, Nicolai N, et al. Guanidinoneomycin B recognition of an HIV-1 RNA helix. *Chembiochem* 2008;9:93-102
49. Marcheschi RJ, Mouzakis KD, Butcher SE. Selection and characterization of small molecules that bind the HIV-1 frameshift site RNA. *ACS Chem Biol* 2009;4:844-54

This work illustrates the power of high-throughput screening to select small molecules that interact with HIV-1 frameshift stimulatory signal and could constitute lead compounds for the development of novel anti-HIV-1 drugs.

50. McNaughton BR, Gareiss PC, Miller BL. Identification of a selective small-molecule ligand for HIV-1 frameshift-inducing stem-loop RNA from an 11,325 member resin bound dynamic combinatorial library. *J Am Chem Soc* 2007;129:11306-7

This study describes the selection of a compound targeting HIV-1 frameshift stimulatory signal, which was obtained by synthesis and screening of a resin-bound dynamic combinatorial library. This library was based on a core structure inspired by nucleic acid binding bis-intercalating natural products. This promising lead compound paves the way to novel anti-HIV-1 drugs.

51. Palde PB, Ofori LO, Gareiss PC, et al. Strategies for recognition of stem-loop RNA structures by synthetic ligands: application to the HIV-1 frameshift stimulatory sequence. *J Med Chem* 2010;53:6018-27

52. Howard MT, Gesteland RF, Atkins JF. Efficient stimulation of site-specific ribosome frameshifting by antisense oligonucleotides. *RNA* 2004;10:1653-61

53. Olsthoorn RC, Laurs M, Sohet F, et al. Novel application of sRNA: stimulation of ribosomal frameshifting. *RNA* 2004;10:1702-3

54. Yu CH, Noteborn MH, Olsthoorn RC. Stimulation of ribosomal frameshifting by antisense LNA. *Nucleic Acids Res* 2010;38:8277-83

55. Ahn DG, Lee W, Choi JK, et al. Interference of ribosomal frameshifting by antisense peptide nucleic acids suppresses SARS coronavirus replication. *Antiviral Res* 2011;91:1-10

An antisense oligonucleotide binding to the frameshift stimulatory signal of the coronavirus that causes the severe acute respiratory syndrome interferes with the -1 ribosomal frameshift of this virus and suppresses its replication.

56. Aupeix-Scheidler K, Chabas S, Bidou L, et al. Inhibition of in vitro and ex vivo translation by a transplatin-modified oligo(2'-O-methylribonucleotide) directed against the HIV-1 gag-pol frameshift signal. *Nucleic Acids Res* 2000;28:438-45

57. Agrawal S, Kandimalla ER. Role of Toll-like receptors in antisense and siRNA [corrected]. *Nat Biotechnol* 2004;22:1533-7
58. Flexner C. HIV drug development: the next 25 years. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:959-66
59. Tsygankov AY Current developments in anti-HIV/AIDS gene therapy. *Curr Opin Investig Drugs* 2009;10:137-49
60. Gareiss PC, Miller BL. Ribosomal frameshifting: an emerging drug target for HIV. *Curr Opin Investig Drugs* 2009;10:121-8

An interesting review that heralds the importance of the frameshift event for the development of novel anti-HIV drugs.

61. Hajduk PJ, Greer J. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:211-9

Figure 1

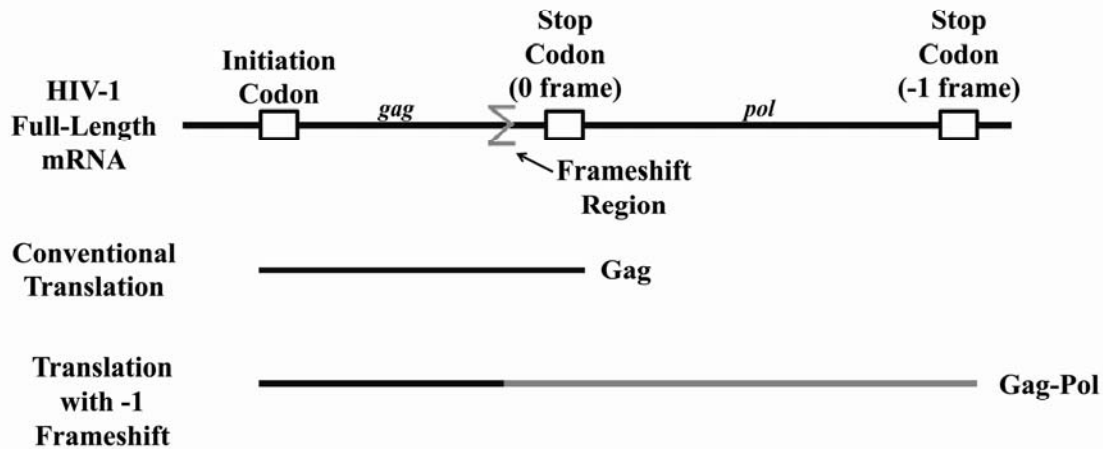


Figure 1: Translation of HIV-1 full-length messenger RNA. Conventional translation of this messenger RNA by the majority of ribosomes generates the Gag protein, the precursor of the virus structural proteins (matrix, capsid, nucleocapsid) while a minority of ribosomes make a -1 frameshift at a specific slippery sequence within the frameshift region (see the text) and generates the Gag-Pol protein. The situation can be described as if these ribosomes were reading a base doublet and not a base triplet when translating this slippery sequence. Before the shift, the sequence of Gag-Pol is identical to that of Gag but, after the shift, the ribosomes translate a complete different sequence of amino acids, the Pol part, which is the precursor of the viral enzymes (protease, reverse transcriptase, integrase). Note that the viral mRNA is highly structured but is represented as a straight line for the sake of simplicity.

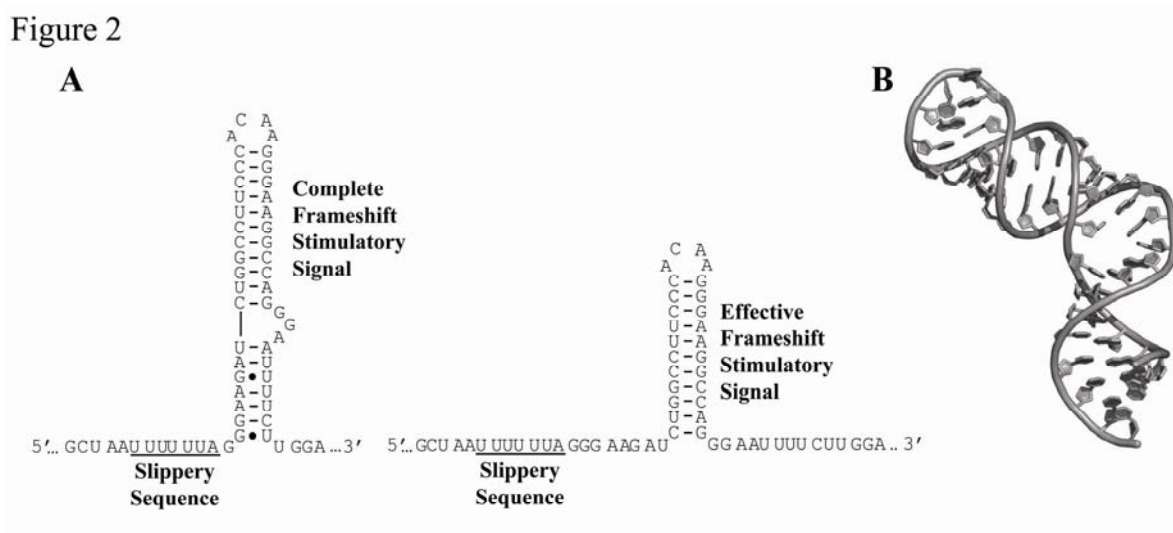


Figure 2: The HIV-1 frameshift stimulatory signal. A. The complete signal is a bulged helix whose lower part is easily unwound by the ribosomes while the upper part resists unwinding and acts as the effective signal during translation. B. Structure of the complete HIV -1 stimulatory signal as determined by NMR [5]. The Data Bank accession codes of the atomic coordinates from the RCSB Protein Data Bank are 1Z2J.

Figure 3: Normal translocation versus incomplete translocation followed by a -1 ribosomal frameshift. A. Normal translocation. After peptide bond formation, the deacylated tRNA and the peptidyl-tRNA move by three nucleotides pulling the mRNA along, so as to occupy the E and P site, respectively. This step is followed by the binding of the next aminoacyl-tRNA to the entry (A/T) site. The deacylated tRNA is ejected from the E site and the aminoacyl-tRNA then occupies the A site. B. Incomplete translocation triggering a -1 frameshift. Translocation is incomplete because of the presence of a frameshift stimulatory signal downstream of a slippery sequence. This signal (here, the upper stem-loop of HIV-1 frameshift stimulatory signal) causes a resistance to the movement of the mRNA. The deacylated tRNA and peptidyl-tRNA, which have moved by two instead of three nucleotides, occupy intermediate sites (E* and P* sites), and the incoming aminoacyl-tRNA occupies an intermediate entry (A*/T*) site. The three tRNAs move then by one nucleotide so as to occupy their standard binding sites on the ribosome. This is followed by the ejection of the deacylated tRNA and the occupancy of the A site by the aminoacyl-tRNA. Translation continues in the -1 frame.

Figure 3

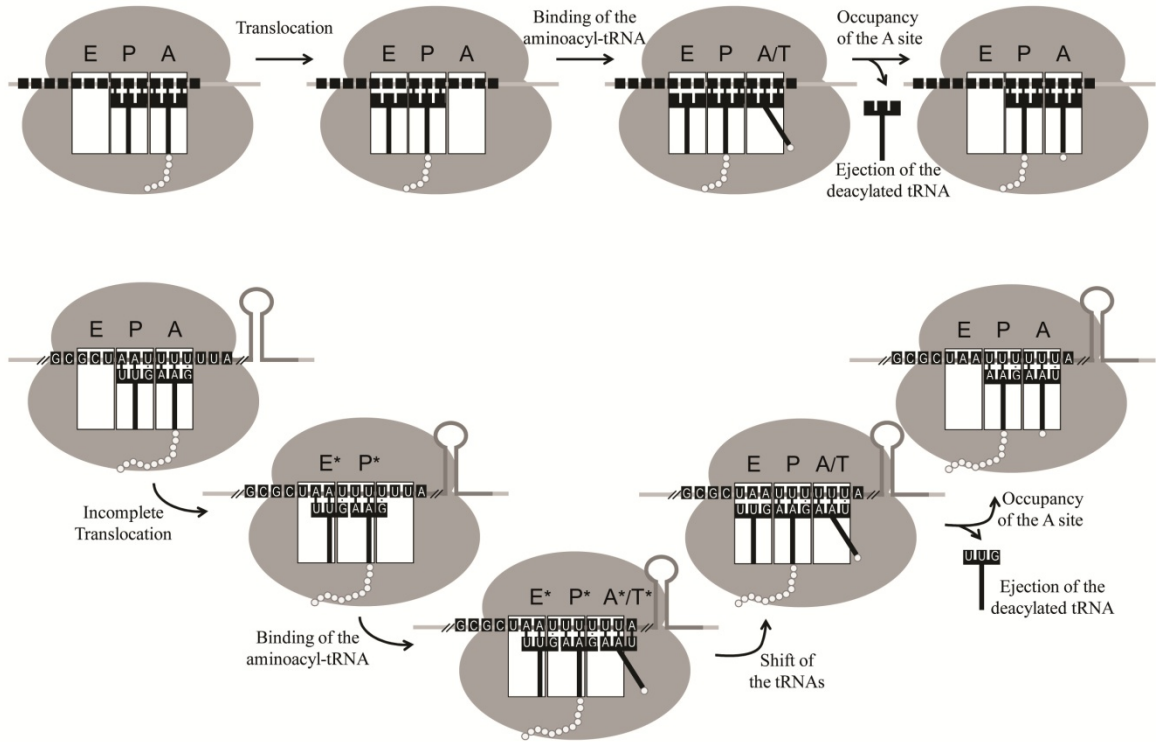


Figure 4

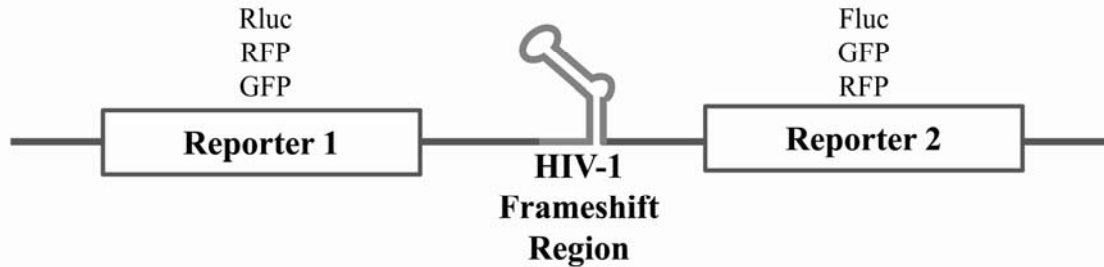


Figure 4: Scheme of bicistronic reporter mRNAs used to screen for compounds modulating HIV-1 frameshift efficiency. The two cistrons are separated by the HIV-1 frameshift region. The first cistron is translated according to conventional rules while translation of the second cistron is made only by ribosomes that make a -1 frameshift in the HIV-1 frameshift region. Rluc= Renilla luciferase, Fluc= firefly luciferase, RFP=Red Fluorescent Protein, GFP= Green Fluorescent Protein.