

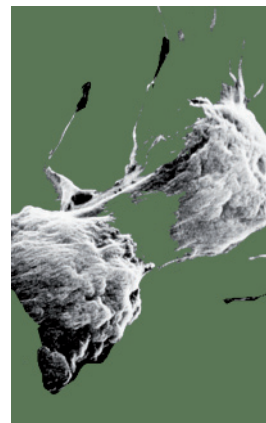
> La traduction est le processus permettant la synthèse des protéines lors de la lecture par les ribosomes de l'information contenue dans les ARN messagers. Le changement du cadre de lecture en -1 ou décalage de phase en -1 est une anomalie de la traduction qui est utilisée par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 pour synthétiser ses enzymes lors de la traduction de l'un de ses ARN messagers. Le signal stimulateur, une structure particulière dans cet ARN, contrôle l'incidence de cette anomalie; quant à cette structure, elle vient d'être élucidée par des études de résonance magnétique nucléaire. Ce signal stimulateur est une tige-boucle irrégulière où une boucle interne faite de purines sépare la tige en deux portions hélicoïdales. Ce signal pourrait favoriser le décalage de phase en interagissant spécifiquement avec le ribosome ou bien avec un facteur protéique hypothétique. La caractérisation de la structure du signal stimulateur définit une nouvelle cible permettant la conception rationnelle de molécules qui, en se liant à cette cible, pourraient perturber le décalage de phase et, en conséquence, bloquer la réplication virale. <

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) cause le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), une pandémie qui a déjà tué 25 millions de personnes et en a infecté 40 millions dans le monde. Malgré les succès remportés dans le traitement du SIDA avec les agents utilisés actuellement en clinique (inhibiteurs d'enzymes du virus comme la protéase ou la transcriptase inverse, inhibiteurs de l'entrée du virus), l'émergence grandissante de variants viraux résistants à ces agents limite leur utilisation [1, 2]. Il faut donc trouver de nouvelles cibles parmi les étapes qui conduisent à la réplication du virus. Le changement du cadre de lecture en -1 ou décalage de phase en -1 (*frameshift* ribosomique en -1) est

Article reçu le 25 novembre 2005, accepté le 27 mars 2006.

Quand une structure particulière de l'ARN du VIH-1 conduit à un décalage de phase Perspectives pour le traitement de l'infection par le VIH

Dominic Dulude, Léa Brakier-Gingras



Département de Biochimie,
 Université de Montréal,
 2900, boulevard Édouard-
 Montpetit, Montréal (Québec)
 H3T 1J4, Canada.
lea.brakier.gingras@umontreal.ca

un recodage, c'est-à-dire une anomalie de la traduction des ARN messagers en protéines, qui est utilisée par de nombreux virus pour produire les enzymes nécessaires à leur réplication. Le VIH-1 est l'un des exemples les plus connus de virus utilisant ce recodage. Un décalage de phase en -1 est en effet requis pour synthétiser Gag-Pol, le précurseur des enzymes du VIH-1, c'est-à-dire la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase, lors de la traduction de l'un des ARN messagers du virus [3, 4]. La traduction du même ARN suivant les règles classiques conduit à la synthèse de Gag, le précurseur des protéines structurales du virus qui sont la matrice, la nucléocapside, la capsid et la protéine p6. Seul un petit nombre de ribosomes effectuent le décalage de phase, et l'utilisation de cette stratégie permet d'obtenir une quantité de Gag-Pol par rapport à Gag qui répond aux besoins du virus. L'équipe de Telenti et la nôtre ont montré qu'une faible diminution (environ de deux fois) de l'efficacité du décalage de phase suffit pour handicaper sévèrement la réplication du VIH-1 [5, 6]. Le décalage de phase en -1 du VIH-1 constitue donc une cible de choix pour de nouveaux composés anti-viraux.

Le décalage de phase en -1 se produit au sein d'une séquence, dite glissante, d'un ARN messager viral. Il s'agit d'un heptanucléotide de type X XXY YYZ (où X peut être A, G, U ou C, Y est A ou U, et Z est A, U ou C et où les espaces indiquent les codons dans le cadre de lecture initial). La description traditionnelle du décalage de phase peut se résumer comme suit : tout se passe comme si, lorsqu'un ribosome effectuant la traduction atteint la séquence glissante, l'ARN de transfert occupant le site ribosomique A (c'est-à-dire l'aminocyl-ARNt qui apporte un acide aminé pour allonger la chaîne protéique en croissance) et l'ARN de transfert occupant le site ribosomique P (c'est-à-dire le peptidyl-ARNt chargé de cette chaîne protéique) pouvaient se désappairer de l'ARN messager, à la suite d'une rupture des interactions entre les codons du messenger et les anticodons des ARN de transfert. Les deux ARN de transfert pourraient ensuite se déplacer en direction 5' et se réappairer au messenger dans le cadre de lecture -1 par rapport au cadre de lecture initial. La séquence glissante est telle qu'elle permet ce réappariement, en tenant compte de la flexibilité des appariements mettant en jeu la troisième base des codons. La séquence glissante est suivie d'un motif structural particulier qui agit comme signal stimulateur du décalage de phase. Ce motif est le plus souvent un pseudo-nœud, c'est-à-dire une structure complexe où la boucle d'une tige-boucle participe à la formation d'une seconde tige, en s'appariant à une région complémentaire en aval du messenger. La présence d'une telle structure augmente la probabilité qu'un décalage de phase se produise. Le mécanisme d'action des signaux stimulateurs de décalage de phase en -1 demeure encore peu connu. L'analyse de la structure de pseudo-nœuds stimulant le décalage de phase en -1 chez divers virus [7-11] a montré que des interactions spécifiques entre les boucles et les hélices de ces pseudo-nœuds stabilisent ces structures. Cette stabilisation forcerait le ribosome à s'arrêter car, bien qu'il possède une activité hélicase lui permettant en général de dérouler des structures comme des tiges-boucles et des pseudo-nœuds [12], il aurait de la difficulté à dérouler un pseudo-nœud stabilisé. Le messenger qui est soumis à deux tendances contradictoires, la tendance du ribosome

à le dérouler pour continuer sa progression et la résistance opposée par le pseudo-nœud stabilisé, subirait une tension qui peut être relâchée lorsqu'il glisse en direction 3' [13]. Le décalage de phase serait donc en réalité un glissement du messenger en direction 3' et non un déplacement des ARN de transfert (Figure 1). Pour le VIH-1, le signal stimulateur du décalage de phase avait été défini comme une tige de 11 paires de bases, coiffée d'une tétraboucle, localisée à une courte distance en aval d'une séquence glissante (Figure 2A). Il avait été établi que la présence de ce signal, dénommé signal classique, augmentait d'environ dix fois l'efficacité du décalage de phase par rapport à la situation observée lorsque seule la séquence glissante est présente [14, 15]. En 2002, notre équipe et celle de Jonathan Dinman et Tariq Rana ont montré que le signal stimulateur du VIH-1 était plus complexe et que la séquence en aval de la tige-boucle classique participait au phénomène du décalage de phase, augmentant son efficacité d'un facteur deux. Toutefois, les deux équipes ont proposé des structures différentes pour ce signal. L'équipe de Dinman et Rana a proposé que le signal stimulateur est un pseudo-nœud stabilisé par une hélice triple formée par une interaction entre la tige classique et une portion de l'ARN messager viral [16] (Figure 2B), tandis que nous avons proposé que ce signal stimulateur est une tige-boucle allongée où une boucle asymétrique de trois purines sépare la portion supérieure, la tige-boucle classique, de la portion inférieure, une courte hélice de sept paires de bases [17] (Figure 2C). Récemment, le groupe de Samuel Butcher et celui de Dominique Fourmy ont caractérisé indépendamment la structure du signal stimulateur du VIH-1 par résonance magnétique nucléaire (RMN) [18, 19] et ont établi que cette structure est une tige-boucle allongée (Figure 2D), en accord avec nos résultats. L'analyse par RMN a par ailleurs permis une

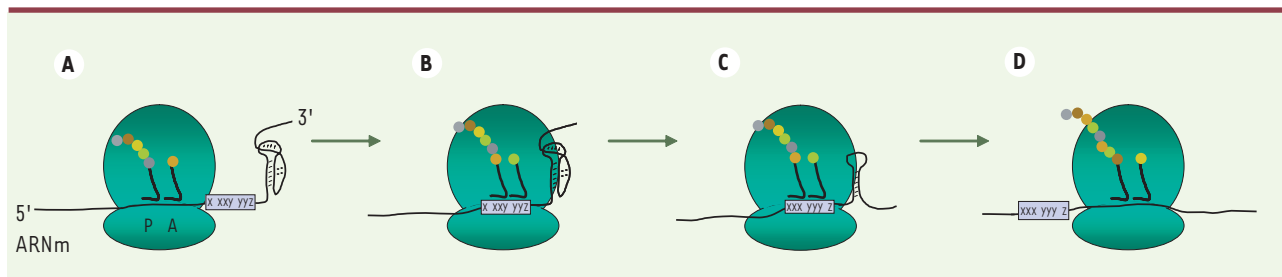


Figure 1. Modèle simplifié du mécanisme de décalage de phase en -1. Un ribosome traduisant un ARN messager (ARNm) viral (A) avance jusqu'à ce qu'il rencontre un signal stimulateur en pseudo-nœud (B). Des interactions particulières à l'intérieur du pseudo-nœud stabilisent cette structure et perturberaient l'activité hélicase du ribosome [12], forçant ainsi le ribosome à s'arrêter au niveau de la séquence glissante (X XXY YYZ). C. Le ribosome voudrait dérouler le pseudo-nœud qui oppose une résistance à ce déroulement. L'ARNm viral subirait une tension qui peut être relâchée lorsqu'il glisse en direction 3'. D. Une fraction des ribosomes ayant effectué le décalage de phase poursuit ensuite la traduction dans le nouveau cadre de lecture -1. L'ARN de transfert amenant un acide aminé et l'ARN de transfert chargé de la chaîne protéique en croissance, qui occupent respectivement les sites ribosomiques A et P, sont indiqués dans la figure.

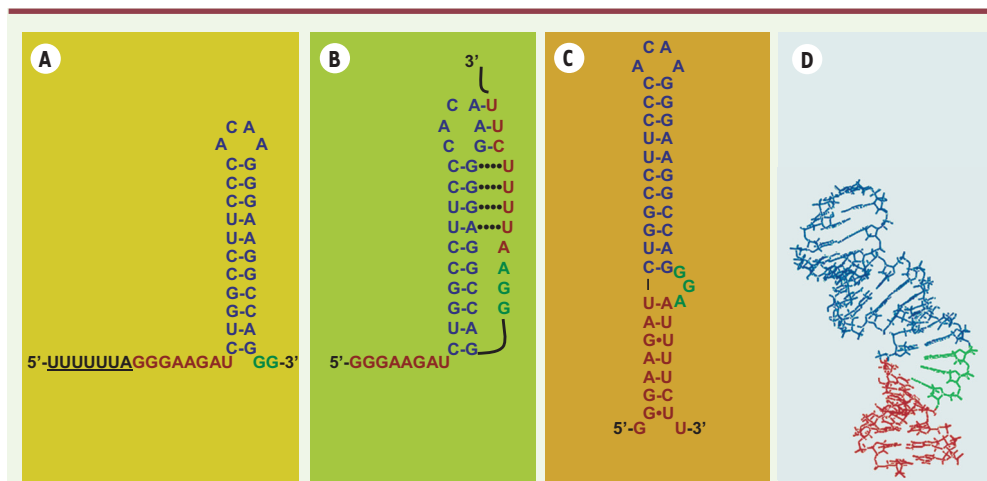


Figure 2. Structure du signal stimulateur du décalage de phase en -1 du VIH-1. **A.** Tige de 11 paires de bases, coiffée d'une tétraboucle, initialement proposée par Jacks et al. [14]. La séquence soulignée en amont du signal correspond à la séquence glissante (elle n'est pas indiquée en **B** et **C**). **B.** Structure proposée par Dinman et al. [16] correspondant à un pseudo-nœud stabilisé par une hélice triple impliquant la tige classique

(interaction indiquée en pointillé). **C.** Structure en tige-boucle allongée proposée par Dulude et al. [17] où la tige-boucle supérieure (en bleu), qui correspond à la tige-boucle classique (**A**), est séparée de la tige inférieure (en rouge) par une boucle asymétrique de trois purines (en vert). **D.** Structure à haute résolution du signal stimulateur, obtenue par RMN (adaptée de [18]), qui confirme la structure proposée par Dulude et al. (le code des couleurs est le même qu'en **C**).

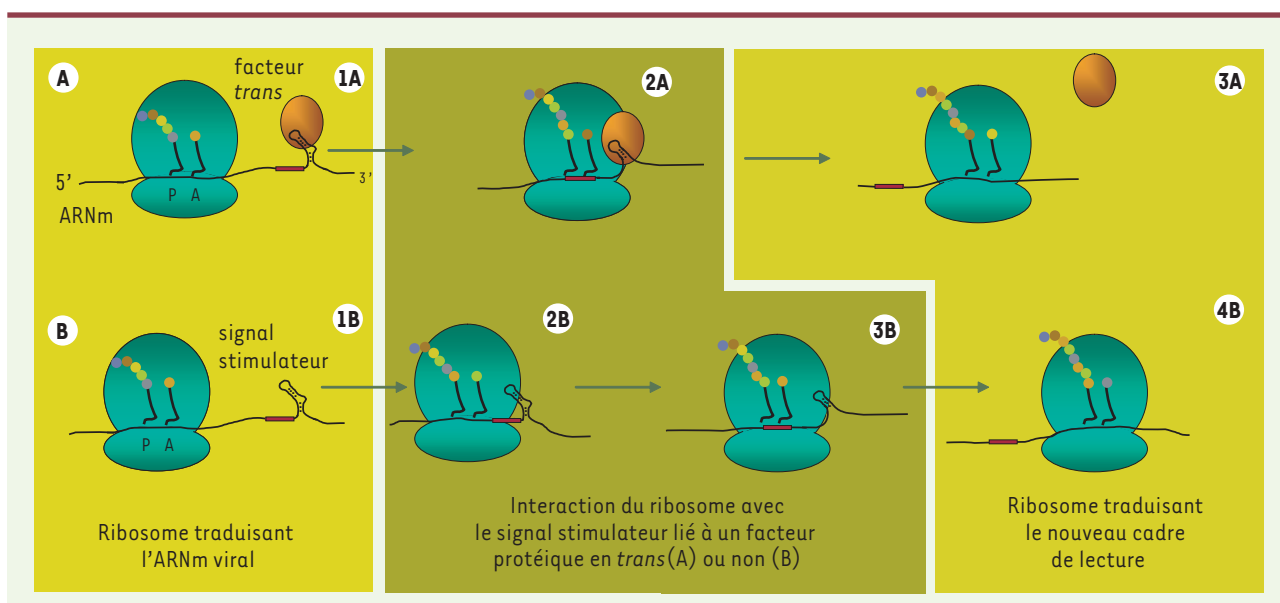


Figure 3. Modèles hypothétiques du fonctionnement du signal stimulateur du décalage de phase en -1 lors de la traduction d'un ARNm du VIH-1. **A.** Modèle suggérant l'existence d'un facteur protéique en *trans* qui se lie au signal stimulateur du VIH-1. **1A.** Un facteur protéique *trans* (ballon orange) interagirait spécifiquement avec le signal stimulateur. Cette interaction impliquerait la tige-boucle supérieure et serait favorisée par la présence de la tige inférieure. **2A.** Un ribosome qui traduit l'ARNm du VIH-1 déroulerait aisément la portion inférieure du signal. Toutefois, la liaison du facteur *trans*, qui stabiliserait la portion supérieure du signal et perturberait l'activité hélicase du ribosome, bloquerait celui-ci alors que la séquence glissante (encadré rouge) atteint les sites ribosomiques A et P. L'ARNm serait soumis à une tension qui peut être relâchée lorsqu'il glisse du côté 3'. **3A.** Un ribosome ayant effectué un décalage de phase traduit ensuite le nouveau cadre de lecture -1. **B.** Modèle suggérant une interaction spécifique entre le signal stimulateur du VIH-1 et le ribosome. Un ribosome qui traduit l'ARNm du virus (**1B**) rencontrerait le signal avant que la séquence glissante atteigne les sites ribosomiques A et P (**2B**). Cette interaction engagerait la portion supérieure du signal et contribuerait à stabiliser cette structure. Le rôle de la tige inférieure serait de favoriser une interaction adéquate entre la tige supérieure et le ribosome. **3B.** Il y aurait ensuite déroulement de la portion inférieure du signal permettant au ribosome de progresser sur l'ARNm jusqu'à ce que la séquence glissante atteigne les sites ribosomiques A et P. L'interaction entre le ribosome et la portion supérieure du signal stimulateur favoriserait alors le décalage de phase en -1 en s'opposant à la progression du ribosome. **4B.** Un ribosome ayant effectué un décalage de phase traduit le nouveau cadre de lecture -1.

caractérisation approfondie du signal, montrant notamment que les tiges inférieure et supérieure ne sont pas coaxiales mais présentent un angle de 60° entre elles. Un tel angle, en imposant une orientation précise entre les deux portions hélicoïdales du signal stimulateur, pourrait favoriser une interaction spécifique avec un autre partenaire.

Quelles informations pouvons-nous obtenir à partir de la caractérisation de la structure du signal stimulateur du décalage de phase en -1 du VIH-1 ? Ce signal stimulateur, même s'il est plus complexe que la courte tige-boucle définie auparavant, ne devrait pas présenter un obstacle important au cheminement du ribosome et semble facile à dérouler. Pour expliquer qu'un tel signal puisse favoriser un décalage de phase, nous pouvons proposer que ce signal lie spécifiquement un facteur protéique en *trans* qui le stabilise et qui s'oppose à l'activité hélicase du ribosome (Figure 3A). Ce facteur *trans* hypothétique pourrait interagir avec la portion supérieure du signal, la région qui joue un rôle prépondérant dans la stimulation du décalage de phase. L'orientation de la tige supérieure imposée par la portion inférieure du signal contribuerait à favoriser l'interaction avec le facteur *trans*. Une autre explication pour le fonctionnement du signal stimulateur du VIH-1 serait qu'il interagisse exclusivement avec le ribosome (Figure 3B). Cette interaction engagerait la portion supérieure du signal et contribuerait à stabiliser cette structure. Le rôle de la tige inférieure serait de promouvoir une interaction adéquate entre le ribosome et la tige supérieure en orientant favorablement cette dernière. Les deux modèles présentés sont toutefois spéculatifs et la compréhension du mécanisme de décalage de phase en -1 et du rôle du signal stimulateur du VIH-1 exige davantage de travaux. L'obtention de la structure à haute résolution du signal stimulateur du VIH-1 permet maintenant la conception rationnelle de médicaments antiviraux. Ces médicaments pourraient être de petites molécules, comme, par exemple, de courts peptides, qui, en se liant au signal stimulateur, l'empêcheraient d'interagir soit avec le ribosome soit avec le facteur protéique dont nous avons suggéré l'existence. Le signal stimulateur serait alors incapable de provoquer le décalage de phase et, donc, la synthèse des enzymes du virus. Le virus ne pourrait plus se répliquer. ♦

REMERCIEMENTS

Nous remercions Michel Bouvier et Nikolaus Heveker pour leurs conseils judicieux et stimulants.

SUMMARY

The structure of the frameshift stimulatory signal in HIV-1 RNA: a potential target for the treatment of patients infected with HIV

Ribosomal frameshift is used by HIV-1 to synthesize the precursor of its enzymes. The frameshift stimulator is a peculiar structure in the viral messenger RNA coding for this precursor, which increases the probability that this frameshift occurs. It was proposed to be either a triplex structure or an irregular stem-loop. Recently, two NMR groups independently showed that the frameshift stimulatory signal of HIV-1 is an extended stem-loop, with an internal three-purine bulge separating two helical regions. However, it remains unclear how such a structure promotes frameshifting. It is proposed that frameshifting results from

a specific interaction between the stimulatory signal and either a hypothetical protein factor or the ribosome. The characterization of the structure of the frameshift stimulatory signal paves the way to the rational design of novel antiviral drugs, which, by binding to this signal, could interfere with frameshifting and viral replication. ♦

RÉFÉRENCES

1. Wensing AM, Boucher CA. Worldwide transmission of drug-resistant HIV. *AIDS Rev* 2003 ; 5 : 140-55.
2. Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: 2005. *Top HIV Med* 2005 ; 13 : 51-7.
3. Stahl G, Rousset JP. Les surprises du décodage de l'information génétique. *Med Sci (Paris)* 1999 ; 15 : 1118-25.
4. Brierley I, Pennell S. Structure and function of the stimulatory RNAs involved in programmed eukaryotic-1 ribosomal frameshifting. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2001 ; 66 : 233-48.
5. 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.
6. 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.
7. Pallan PS, Marshall WS, Harp J, et al. Crystal structure of a luteoviral RNA pseudoknot and model for a minimal ribosomal frameshifting motif. *Biochemistry* 2005 ; 44 : 11315-22.
8. Cornish PV, Hennig M, Giedroc DP. A loop 2 cytidine-stem 1 minor groove interaction as a positive determinant for pseudoknot-stimulated -1 ribosomal frameshifting. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 12694-9.
9. Chen X, Kang H, Shen LX, et al. A characteristic bent conformation of RNA pseudoknots promotes -1 frameshifting during translation of retroviral RNA. *J Mol Biol* 1996 ; 260 : 479-83.
10. Michiels PJ, Versleijen AA, Verlaan PW, et al. Solution structure of the pseudoknot of SRV-1 RNA, involved in ribosomal frameshifting. *J Mol Biol* 2001 ; 310 : 1109-23.
11. Su L, Chen L, Egli M, et al. Minor groove RNA triplex in the crystal structure of a ribosomal frameshifting viral pseudoknot. *Nat Struct Biol* 1999 ; 6 : 285-92.
12. Takyar S, Hickerson RP, Noller HF. mRNA helicase activity of the ribosome. *Cell* 2005 ; 120 : 49-58.
13. Plant EP, Dinman JD. Torsional restraint: a new twist on frameshifting pseudoknots. *Nucleic Acids Res* 2005 ; 33 : 1825-33.
14. Jacks T, Power MD, Masiazk FR, et al. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 1988 ; 331 : 280-3.
15. Kang H. Direct structural evidence for formation of a stem-loop structure involved in ribosomal frameshifting in human immunodeficiency virus type 1. *Biochim Biophys Acta* 1998 ; 1397 : 73-8.
16. Dinman JD, Richter S, Plant EP, et al. The frameshift signal of HIV-1 involves a potential intramolecular triplex RNA structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 5331-6.
17. 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.
18. 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.
19. Staple DW, Butcher SE. Solution structure and thermodynamic investigation of the HIV-1 frameshift inducing element. *J Mol Biol* 2005 ; 349 : 1011-23.

TIRÉS À PART

D. Dulude