

La traduction eucaryote entre biologie et physique : apports de la molécule unique pour l'étude d'un processus complexe

Sommaire

1.1 La traduction eucaryote	1
1.1.1 Introduction au processus de traduction	2
1.1.2 Les principaux acteurs de la traduction	2
1.1.3 Etapes du processus	6
1.2 Évènements non canoniques et erreurs programmées	9
1.2.1 Initiation non-canonique : les structures IRES	10
1.2.2 Erreurs programmées de l'élongation : cas du décalage de la phase de lecture -1	13
1.2.3 Erreurs programmées de la terminaison : franchissement du codon stop	18
1.2.4 Évènements non canoniques : un champ de recherche ouvert	19
1.3 Molécule unique et techniques complémentaires pour l'étude de la traduction	20
1.3.1 Principe et atouts de la molécule unique	20
1.3.2 Techniques de molécule unique	21
1.3.3 Stratégies de marquage pour la molécule unique	24
1.3.4 Exemples d'études du décalage de phase en -1	26
1.3.5 Exemple d'étude de l'initiation IRES dépendante	36
1.3.6 De l'in-vitro vers l'in-vivo : de nouvelles techniques d'étude en molécule unique	43
1.4 Principe de notre mesure en molécule unique	48
1.4.1 Enjeux de la mesure	48
1.4.2 Définition du système biologique rapporteur	48
1.4.3 Principe de la mesure cinétique	50
1.5 Conclusion	52

1.1 La traduction eucaryote

Les organismes vivants peuvent être divisés en trois catégories : les organismes eucaryotes, les organismes procaryotes et les archées. Les organismes procaryotes et les archées sont des cellules

Chapitre 1. La traduction eucaryote : entre biologie et physique : apports de la molécule unique pour l'étude d'un processus complexe

sans noyau. En général ce sont des organismes unicellulaires simples communément appelées bactéries. En revanche, les cellules eucaryotes possèdent un noyau qui contient l'information génétique. Nous nous intéressons au processus de traduction chez les eucaryotes, et plus particulièrement chez les mammifères car il est plus représentatif du processus de traduction chez l'être humain. Aussi nous nous focaliserons dans ce chapitre sur le processus de traduction eucaryote et ses acteurs. Celui-ci présente de nombreuses similitudes avec le processus procaryote qui sera parfois évoqué au travers de la littérature.

1.1.1 Introduction au processus de traduction

La traduction est un processus cellulaire commun à l'ensemble des règnes du vivant, qui correspond au processus de fabrication des protéines à partir du code génétique. Dans les cellules procaryotes ou eucaryotes, l'information génétique est portée par l'acide désoxyribonucléique ou ADN. Cette macromolécule double-brin contient l'ensemble de l'information génétique, aussi appelé génome, d'un être vivant. L'ADN est composé de 4 bases nucléiques : l'adénine (A), la cytosine (C), la guanine (G) et la thymine (T). Les molécules d'ADN sont stables dans le temps, ce qui assure la pérennité du code génétique, mais elles ne peuvent être directement transformées en protéines.

Une enzyme appelée ARN polymérase va réaliser une copie d'une partie de l'ADN. Cette étape nommée transcription aboutit à la formation de l'ARN messenger (ARNm). Cette copie de l'ADN, qui se dégrade rapidement dans le temps, est une macromolécule simple brin, elle-même composée de 4 sortes de bases nucléiques : l'uracile (U), la cytosine (C), la guanine (G) et l'adénine (A). Après des étapes de maturation qui ont lieu pour les eucaryotes dans le noyau cellulaire, l'ARN messenger est exporté dans le cytoplasme pour y être traduit en protéine.

On appelle le processus de production des protéines traduction car il correspond au passage de l'alphabet de l'ARN messenger (les bases nucléiques A,U,G,C), à l'alphabet des protéines composées d'acides aminés (il en existe 22 sortes différentes). La macromolécule responsable de la traduction est le ribosome. Le ribosome lit l'ARN messenger codon par codon, un codon, groupe de trois bases nucléiques, correspondant à un acide aminé de la chaîne protéique. Il assemble au fur et à mesure la chaîne protéique et la relâche lorsqu'elle est complète. Le ribosome est capable de traduire l'ensemble des ARN messagers présents dans la cellule et constitue donc l'usine de fabrication de l'ensemble des protéines nécessaires au bon fonctionnement cellulaire. Nous détaillerons dans cette section les acteurs et les principales étapes de la traduction eucaryote.

1.1.2 Les principaux acteurs de la traduction

Le processus de traduction est réalisé par l'action conjointe et coordonnée de plusieurs acteurs qui sont :

- l'ARNm qui porte la séquence codant la protéine,
- le ribosome qui valide le décodage et synthétise la protéine,
- les ARN de transfert (ARNt) qui permettent de décoder chaque codon,
- les facteurs protéiques qui vont permettre la réalisation des différentes étapes de la traduction.

1.1. La traduction eucaryote

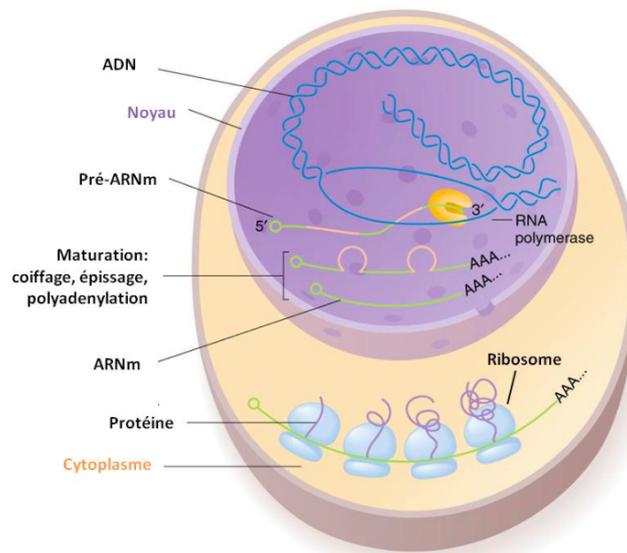


FIGURE 1.1 – Schéma illustratif d'une cellule eucaryote adapté de [Chommy 2012]. Les ARN messagers sont transcrits dans le noyau (en violet) puis maturés et enfin exportés dans le cytoplasme (en jaune) où ils seront traduits.

Avant de décrire les différents mécanismes impliqués dans la traduction, nous présenterons d'abord les 3 acteurs principaux : l'ARNm, le ribosome et les ARNt.

1.1.2.1 L'ARN messager

L'ARN messager mature qui sera traduit par le ribosome possède plusieurs éléments caractéristiques décrits sur la figure 1.2. C'est une molécule orientée qui se lit de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'.

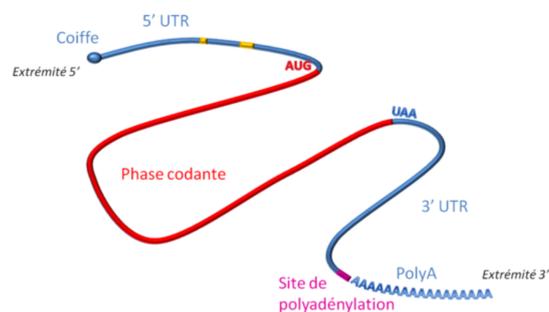


FIGURE 1.2 – Schéma illustratif des éléments constitutifs d'un ARN messager. Figure adaptée de [Chommy 2012]

A son extrémité 5' on trouve un élément nommé la coiffe. La coiffe joue un rôle de protection

Chapitre 1. La traduction eucaryote : entre biologie et physique : apports de la molécule unique pour l'étude d'un processus complexe

de l'ARNm contre des exonucléases mais également un rôle essentiel de recrutement du ribosome lors de la première phase de la traduction : l'initiation [Furuichi 2001]. On trouve à la suite de la coiffe une région non codante (5'UTR pour untranslated region) qui ne sera donc pas traduite par le ribosome. Elle joue elle aussi un rôle dans l'initiation de la traduction. Cette séquence se termine par un codon initiateur, presque exclusivement AUG chez les eucaryotes, qui indique l'endroit où la traduction doit s'initier.

À la suite de ces éléments on trouve une région codante de taille variable qui se termine par un codon particulier appelé codon stop. Il existe trois codons stop (UAA, UAG et UGA), mais ils donnent tous l'indication au ribosome d'interrompre le processus de traduction, de relâcher la protéine achevée et de se détacher de l'ARN messager. Enfin en aval du codon stop on trouve une seconde région non codante appelée 3'UTR puis un élément appelé queue polyA ou queue polyadénylée composée uniquement de bases adénines (environ 250 chez les mammifères, [Viphakone 2008]) qui joue un rôle lors de l'export de l'ARNm dans le cytoplasme ainsi qu'un rôle pour assurer sa stabilité dans le temps.

1.1.2.2 Le ribosome

Le ribosome est la machine moléculaire qui orchestre l'ensemble du processus de traduction. La structure détaillée (résolue à l'angström près grâce à la cristallographie X, cf. paragraphe 1.3) d'un ribosome eucaryote de levure n'a été élucidée qu'en 2010 par une équipe de l'Institut de génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Starsbourg [Ben-Shem 2011], quelques années après le prix Nobel accordé pour la découverte de la structure du ribosome procaryote en 2000 [Ban 2000, Schluenzen 2000, Wimberly 2000].

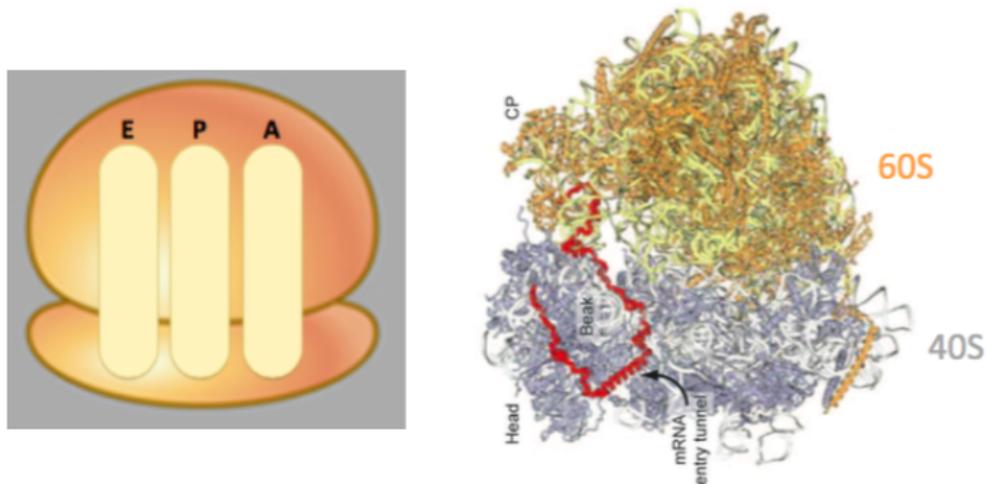


FIGURE 1.3 – Gauche : représentation schématique du ribosome avec les deux sous-unités et les trois sites A, P et E pour les ARN de transfert. Droite : structure cristallographique du ribosome 80S issue de [Ben-Shem 2011].

Le ribosome¹ est divisé en deux sous-unités (SU), la grande avec un coefficient de sédimentation

1. Schématiquement illustré sur la figure 1.3, à gauche. Cette représentation schématique du ribosome est

1.1. La traduction eucaryote

de 60 Svedberg (S) chez les eucaryotes et la petite sous-unité 40S. Les deux sous-unités sont elles même composées de protéines et d'ARN dit ribosomique (ARNr). L'ARN messager entre et ressort par un tunnel illustré en rouge sur la cartographie du ribosome de la figure 1.3, à droite². Le ribosome 80S une fois assemblé sur l'ARN messager possède trois sites où vont se fixer les ARN de transfert porteurs des acides aminés pendant la traduction : les sites A, P et E.

1.1.2.3 Les ARN de transfert

Les ARNt sont de petites molécules d'ARN de 75 à 100 nucléotides. Ils servent d'adaptateurs entre l'ARNm et les acides aminés puisque ces molécules portent chacune un acide aminé. L'ARN de transfert est très structuré, sa structure secondaire forme une structure en L.

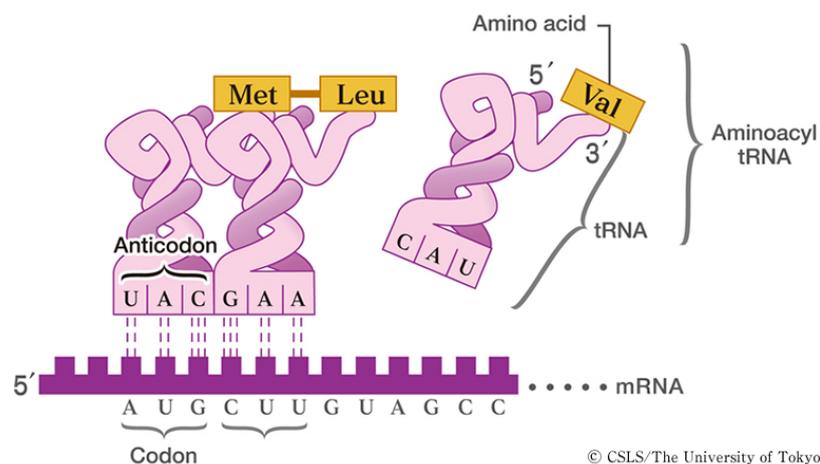


FIGURE 1.4 – Schéma illustratif de l'association des ARNt portant des acides aminés avec l'ARN messager via la liaison codon-anticodon adapté de [Asashima 2011]. On retrouve la structure en L des ARNt avec la boucle anticodon qui fait face à l'ARNm et la tige acceptrice qui porte un acide aminé (Met, Leu, Val) représenté en orange. Les ARNt et l'ARNm sont ici représentés seuls, mais en réalité le recrutement de l'ARNt, la formation de la liaison codon-anticodon et la formation de la chaîne protéique nécessitent l'intervention du ribosome et ont lieu dans les sites A, P et E de celui-ci.

La tige-boucle de l'anticodon va former la liaison codon-anticodon avec l'ARN messager lors de son passage dans les sites A, P et E du ribosome. Un anti-codon est un triplet de trois nucléotides complémentaires des nucléotides qui forment le codon de l'ARNm. Il se forme entre ces nucléotides des liaisons hydrogènes représentées par des traits pointillés sur la figure 1.4. A l'autre extrémité de l'ARNt, la tige-boucle acceptrice est liée à un acide aminé qui sera assemblé au reste de la chaîne protéique pendant la traduction.

courante et présente dans l'ensemble des schémas décrivant les étapes de la traduction qui suivront.

2. En réalité, ce qui est illustré en rouge n'est pas le tunnel mais une protéine de stress qui viens se fixer à la place de l'ARNm dans les conditions de l'expérience. Mais l'utilisation de ce procédé permet de matérialiser sur la cartographie la position du tunnel d'entrée de l'ARNm

Chapitre 1. La traduction eucaryote : entre biologie et physique : apports de la molécule unique pour l'étude d'un processus complexe

1.1.3 Etapes du processus

La traduction est un processus d'amplification où une molécule d'ARNm est à l'origine de la synthèse de plusieurs protéines. Il est important de noter que l'ARNm est traduit simultanément par plusieurs ribosomes à la suite les uns des autres, on parle alors de polysomes. Chaque ribosome accomplit un cycle de traduction qui se décompose en 4 étapes :

- L'initiation durant laquelle les sous-unités ribosomiques s'assemblent sur l'ARNm et se positionnent sur le codon d'initiation.
- l'élongation qui correspond à la lecture de l'ARNm et à la synthèse de la protéine.
- la terminaison, étape à laquelle la protéine est relâchée.
- la dissociation et le recyclage des sous-unités ribosomiques.

1.1.3.1 Initiation canonique de la traduction eucaryote

L'initiation canonique de la traduction eucaryote est une étape particulièrement complexe car elle implique un très grand nombre de facteurs d'initiation. Les différentes étapes de ce processus de traduction sont décrites sur la figure 1.5³.

1. L'initiation débute par l'activation de l'ARN messenger via le recrutement du complexe d'initiation de la traduction eIF4F composé de trois sous-unités : eIF4A, eIF4E et eIF4G. Ces éléments interagissent directement avec le facteur protéique PAPB et la coiffe de l'ARNm pour former un premier complexe prêt à recruter le sous-unité 40S, nommé ARNm activé.
2. En parallèle se forme un complexe dit de pré-initiation (PIC) de coefficient de sédimentation 43S. On a d'abord formation d'un complexe ternaire comprenant l'ARNt initiateur ARNt-Met(i), le facteur d'initiation eucaryote eIF2 et une molécule de GTP (fig. 1.5(2.a)). Puis la petite sous-unité 40S s'associe avec les facteurs d'initiation eIF3, eIF1, eIF1A, eIF5 (2.b) et le complexe ternaire eIF2-ARNt-Met(i)-GTP pour aboutir au complexe 43S (2.c).
3. Le complexe de pré-initiation est recruté sur l'ARN messenger activé.
4. Une fois ce complexe 48S formé, la sous-unité du ribosome peut alors balayer l'ARNm à la recherche du codon initiateur AUG. Les deux facteurs eIF1 et eIF1A sont importants dans ce mouvement de balayage. L'appariement des bases du codon initiateur AUG de l'ARNm et de l'anticodon de l'ARN de transfert initiateur ARNt-Met(i), lui-même positionné au site P du ribosome, permet d'aborder la phase finale de l'initiation.
5. Quand l'association codon start-anticodon est effectuée, l'hydrolyse du GTP lié à eIF2 permet l'éjection des facteurs d'initiation de la surface du complexe d'initiation 48S. La grande sous-unité ribosomique 60S peut alors s'associer par l'intermédiaire des facteurs eIF5 et eIF5B, permettant de former un ribosome 80S actif. Après une dernière étape de recyclage du facteur eIF2 sous la forme d'un complexe eIF2-GDP (qui sera recyclé pour s'associer dans un nouveau complexe ternaire), l'ensemble du système est prêt à entrer dans la phase d'élongation.

3. Pour faciliter la compréhension, les numéros de la liste ci-dessous correspondent aux encarts de la figure 1.5. Seule l'étape 1 n'est pas représentée.

1.1. La traduction eucaryote

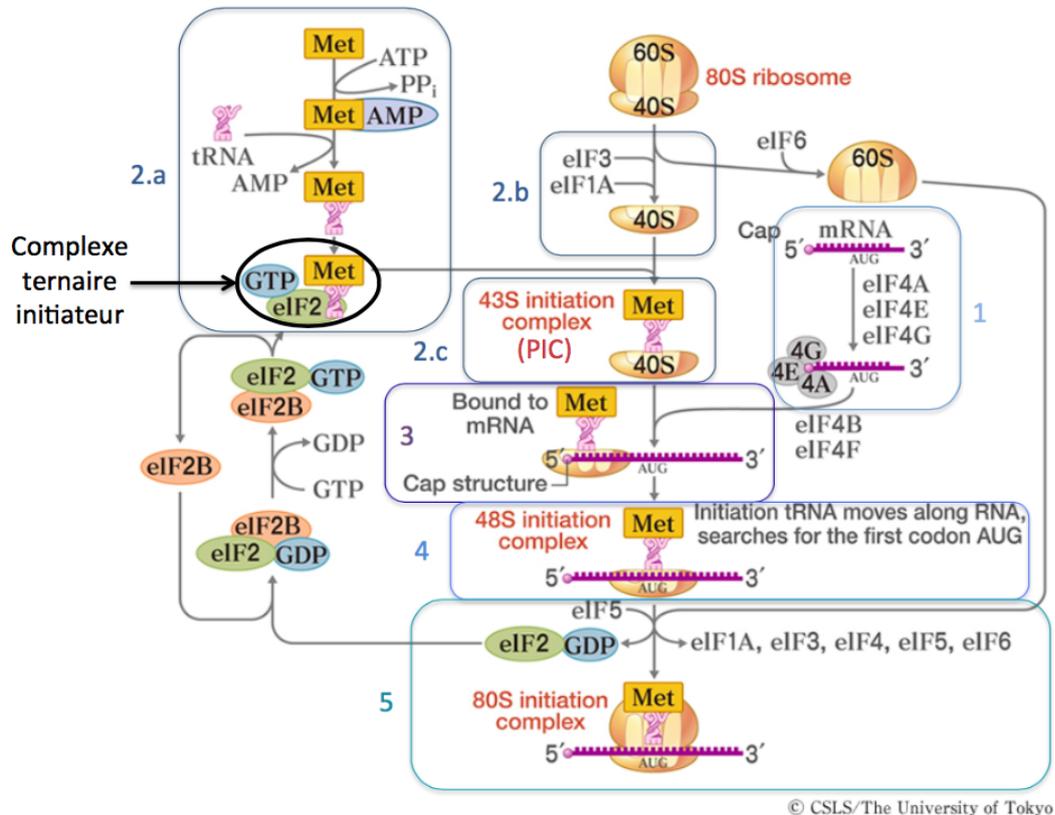


FIGURE 1.5 – Schéma illustratif des étapes de l'initiation de la traduction eucaryote adapté de [Asashima 2011].

1.1.3.2 Phase d'élongation

C'est pendant la phase d'élongation que le ribosome lit l'ARN messager et fabrique la protéine cible (cf. figure 1.6 : les numéros des étapes sur la figure correspondent à ceux de la liste ci-dessous).

1. Au début de cette phase, l'ARN de transfert initiateur est dans le site P du ribosome. Un complexe ternaire eEF1A-ARNt-aa-GTP vient se fixer dans le site A. Le ribosome vérifie à cette étape l'association codon-anticodon de l'ARNt et de l'ARNm. Il existe trois possibilités. Soit cet appariement est correct sur l'ensemble des trois lettres du codon (l'ARNt est dit cognat), soit il est partiel (l'ARNt est dit proche cognat), soit enfin il n'y a pas d'appariement possible (l'ARNt est dit non-cognat). Dans la très grande majorité des cas, seuls les ARNt cognats sont incorporés par le ribosome, les autres sont rejetés. Une fois cette phase de sélection effectuée, l'ARNt est incorporé par hydrolyse de GTP et relargage du complexe eEF1A-GDP.
2. Le ribosome catalyse ensuite le transfert du peptide situé sur l'ARNt du site P sur la fonction amine de l'acide aminé porté par l'ARNt du site A pour former une liaison

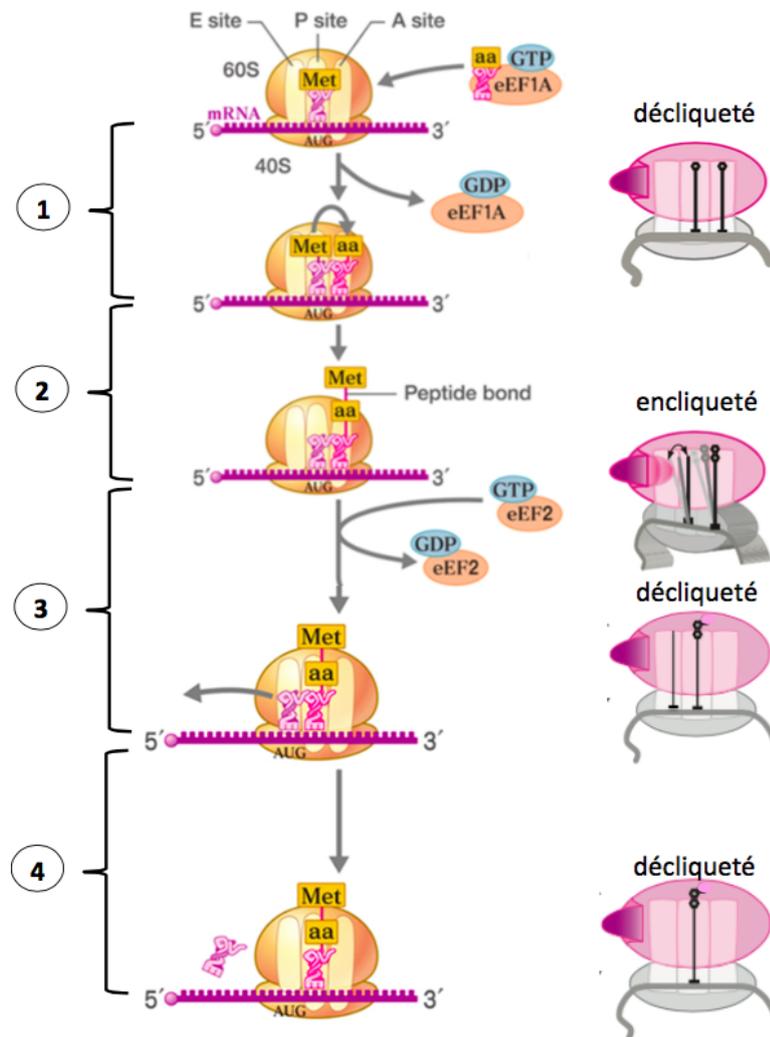


FIGURE 1.6 – Schéma illustratif des étapes de l'élongation de la traduction eucaryote adapté de [Asashima 2011].

peptidique.

3. L'étape suivante est une étape centrale de la phase d'élongation est appelée **translocation**. Elle est catalysée grâce à l'intervention du facteur d'élongation eEF2 et à l'hydrolyse d'un autre GTP. Après le transfert du peptide, l'ARNt du site P, désormais déacylé⁴ passe dans le site E et l'ARNt du site A ainsi que le peptide en cours de synthèse (Met-aa sur la figure 1.6) sont déplacés vers le site P sans qu'il y ait séparation de l'appariement codon-anticodon. Pendant la translocation, le ribosome change de conformation, ses deux sous unités effectuent un mouvement de cliquet l'une par rapport à l'autre afin de faire

4. c'est à dire non chargé par un acide aminé

1.2. Évènements non canoniques et erreurs programmées

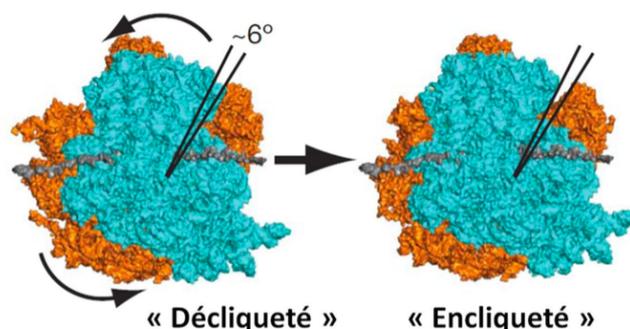


FIGURE 1.7 – Schéma illustratif du mouvement de cliquet effectué par les deux sous-unités du ribosome lors de l'étape de translocation. Les sous-unités effectuent une rotation l'une par rapport à l'autre avec un angle de 6° environ. Elles sont alors dans un état encliqueté. Lorsque la translocation est achevée, elles effectuent la rotation inverse et le ribosome retourne dans un état décliqueté.

avancer l'ensemble de la machine moléculaire de 1 codon exactement sur l'ARN messager [Julián 2008, Frank 2000, Agirrezabala 2008]. Comme illustré sur la figure 1.7, ce changement de conformation correspond en fait à la rotation des deux sous-unités l'une par rapport à l'autre avec un angle de 6° . Le mouvement de cliquet est couplé à l'évènement de translocation, lorsque celui-ci est effectué le ribosome revient dans un état décliqueté, favorable à l'incorporation d'un nouvel ARNt au site A.

- Après la translocation, le site A est alors à nouveau libre pour recevoir un nouvel ARN de transfert. L'ARNt du site E est quand à lui expulsé pour permettre à un nouveau cycle d'élongation d'avoir lieu.

1.1.3.3 Terminaison

La phase d'élongation prend fin quand le ribosome rencontre un des trois codons stop (UAA, UAG ou UGA) au niveau du site A (cf. figure 1.8). La présence de ce codon déclenche le recrutement des facteurs de terminaison eRF1 et eRF3. Le facteur eRF1 reconnaît le codon stop et simule par sa structure la présence d'un ARNt au site A. Ce facteur stimule l'activité de eRF3 et catalyse la terminaison de la traduction. La chaîne peptidique de la protéine est relâchée et les deux sous-unités du ribosome se dissocient de l'ARNm pour être réutilisées lors d'un nouveau cycle de traduction.

1.2 Évènements non canoniques et erreurs programmées

La traduction eucaryote est un processus hautement contrôlé durant l'ensemble des trois étapes décrites précédemment. Un tel contrôle est nécessaire puisqu'une simple erreur du ribosome peut entraîner la fabrication d'une protéine non fonctionnelle, voire toxique ce qui entraîne de graves conséquences sur l'ensemble du fonctionnement cellulaire. Les erreurs spontanées peuvent intervenir à toutes les étapes de la traduction de l'initiation à la terminaison mais leur taux d'occurrence sur l'ensemble du processus n'excède pas 10^{-3} - 10^{-4} par codon ([Jenner 2010]). Un autre type d'erreurs rassemblées sous le terme de recodage [Gesteland 1992] correspond à des

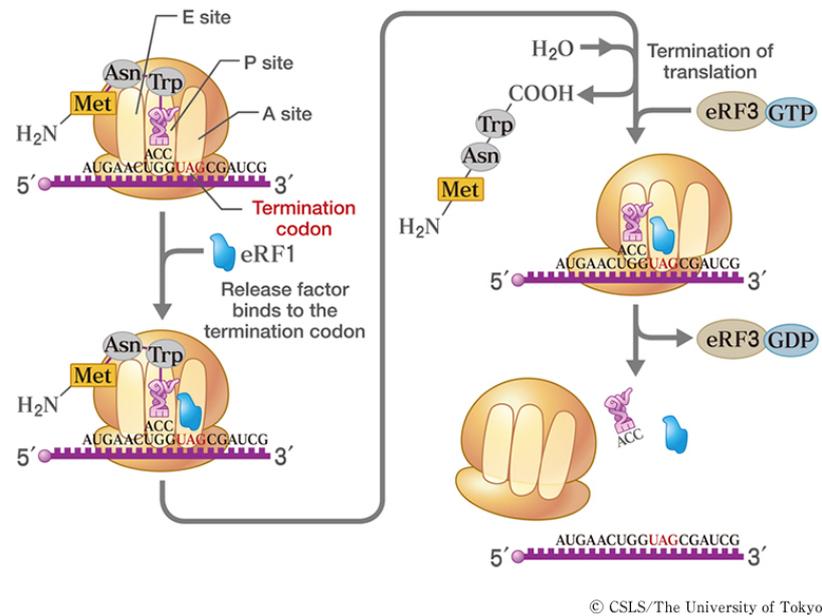


FIGURE 1.8 – Schéma illustratif des étapes de la terminaison de la traduction eucaryote adapté de [Asashima 2011].

erreurs programmées dans le code génétique qui permettent de contourner les voies classiques de traduction dans des contextes bien définis. Majoritairement les événements de recodage sont utilisés par des virus pour contourner et utiliser à leur avantage la machinerie de traduction de leur hôte. Mais on trouve aussi de tels phénomènes chez les organismes procaryotes et eucaryotes, les erreurs programmées sont alors comme leur nom l'indique, des erreurs encodées dans le génome de l'organisme en question. Lorsqu'un de ces mécanismes non-canoniques est présent, il est toujours en concurrence avec le processus de traduction canonique.

Nous présenterons dans cette partie trois processus non-canoniques associés aux trois étapes de la traduction : l'initiation IRES dépendante, le décalage de la phase de lecture en -1 et la translecture du codon stop. Les deux premiers phénomènes étant des enjeux biologiques moteurs de ce travail de thèse, nous prendrons soin de les décrire de façon plus exhaustive que le processus de translecture. Nous évoquerons dans un second temps pourquoi ces événements sont au cœur de champs de recherche très dynamiques, riches de nouvelles problématiques et en quoi la molécule unique peut apporter un éclairage sur les mécanismes de ces différents processus au travers d'études cinétiques.

1.2.1 Initiation non-canonique : les structures IRES

1.2.1.1 Qu'est ce qu'une structure IRES ?

L'initiation IRES (Internal Ribosome Entry Site) dépendante n'est pas un événement de recodage, mais il s'agit bien d'une voie détournée de l'initiation canonique coiffe-dépendante

1.2. Évènements non canoniques et erreurs programmées

décrite dans la section précédente. L'initiation IRES dépendante a été d'abord identifiée chez des virus qui sont nombreux à utiliser ce processus d'initiation pour détourner la machinerie de traduction de leur hôte. Lorsqu'il y a infection virale, des processus d'inactivation⁵ de l'activité d'initiation coiffe-dépendante sont mis en œuvre par le virus. L'initiation des ARNm cellulaires est rapidement arrêtée. En parallèle les ARNm viraux qui possèdent une structure IRES vont être en mesure de recruter le ribosome de l'hôte en s'abstrayant d'un certain nombre de facteurs d'initiation (variable selon les IRES et les virus étudiés). Ainsi la production des ARNm cellulaires de l'hôte est stoppée alors que le virus est en mesure de produire les protéines nécessaires à sa réplication. Il existe aussi des cas d'IRES identifiées sur des ARNm cellulaires [Mokrejš 2006], utilisés par l'organisme en cas de fort stress cellulaire. Nous nous sommes intéressés au cours de ma thèse uniquement à des structures d'IRES virales.

L'IRES est une séquence d'ARN très structurée en 5'. Au vu de la grande variabilité structurale et séquentielle des IRES, elles se définissent uniquement par un **critère fonctionnel : celui d'initier la traduction indépendamment de la présence de la coiffe**. La taille des IRES est très variable entre 200 et 450 nucléotides. De même, il existe une grande variété de structures mais elles ont toutes en commun une abondance de structures secondaires et tertiaires qui semblent indispensables au recrutement du ribosome. Ces structures, une fois identifiées, ont fait l'objet d'une classification selon leurs points communs et leur différences principales.

1.2.1.2 Classification des structures IRES

Une première classification a été réalisée, divisant les IRES en 3 familles distinctes présentées dans la figure 1.9.A. Ces trois familles ont été définies par rapport à la structure primaire et secondaire des IRES qui la composent. En réalité cette première classification a trouvé rapidement ses limites au fur et à mesure de la découverte de nouvelles IRES et est devenue inappropriée. Malgré l'existence de motifs conservés sur le plan structural au sein d'une même famille, elles sont très divisées en leur sein. Ainsi deux IRES appartenant toutes deux à la première famille, PV et EMCV, ont des modes de fonctionnement très différents, et il existe plus de similarités entre le fonctionnement de l'IRES EMCV avec l'IRES HCV qui appartient à une autre famille.

Les limites de ce modèle ont mené à une nouvelle classification amenée par [Kieft 2008] basée uniquement sur le nombre et la nature des facteurs d'initiation requis pour que l'initiation IRES dépendante ait lieu. Cette classification divise les IRES en quatre types : I, II, III et IV. Comme on peut le voir sur la figure 1.9.B les IRES de type I⁶ comme l'IRES CrPV⁷ ne nécessitent l'intervention d'aucun facteur d'initiation pour recruter la sous-unités 40S. Sa principale particularité réside dans la présence d'une structure appelée domaine PKI au niveau du codon initiateur qui mime la présence d'un ARN de transfert dans le site A. L'interaction

5. Ces processus peuvent varier selon la nature du virus et de l'IRES impliquée dans l'initiation non canonique. Mais ils correspondent par exemple à l'inactivation par protéolyse (grâce à des protéines virales) du facteur eIF4G qui joue un rôle essentiel dans le recrutement de la coiffe sur l'ARNm cellulaire. L'initiation canonique est de fait inhibée [Lamphear 1995].

6. Nous reprenons ici la classification évoquée dans les travaux de [Pérard 2010] dont est issue l'illustration 1.9. Il est courant de trouver dans la littérature une classification inversée où les IRES qui demandent l'intervention du moins de facteurs sont dites de type IV et celles qui en demandent le plus sont dites de type I. Il s'agit là simplement d'un choix de convention.

7. CrPV est l'acronyme de Cricket Paralysis Virus.

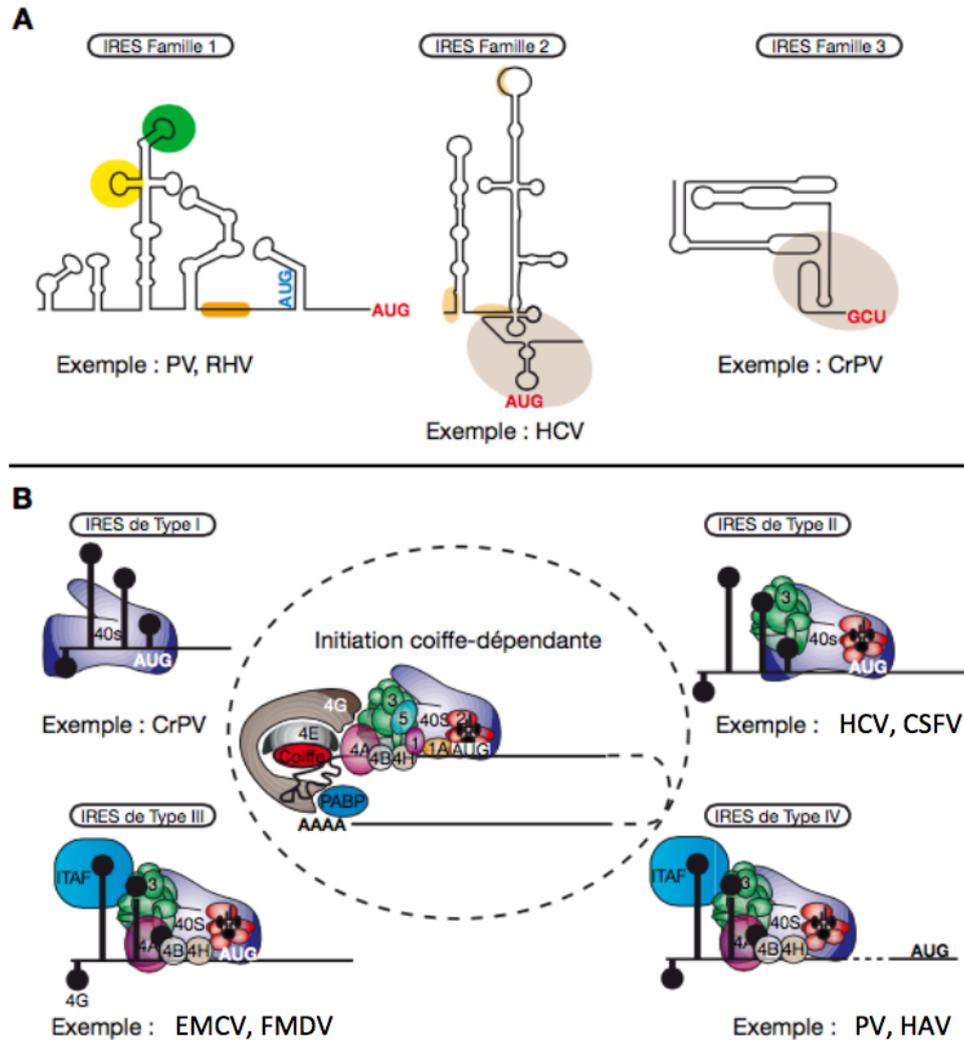


FIGURE 1.9 – Figure adaptée de [Pérard 2010]. (A) Schéma représentant les trois familles d’IRES définies par des critères de structure primaire et secondaire. (B) Schéma représentant les quatre types d’IRES définis sur le critère du nombre et de la nature des facteurs d’initiation nécessaires pour une initiation IRES dépendante efficace.

entre la sous-unité 40S et cette structure IRES est très forte et implique les sites A et P du ribosome.

Pour les types II, III et IV, l’interaction entre les IRES et la sous-unités 40S est similaire, et l’initiation requiert le recrutement d’un ARNt initiateur au site A. La différence entre ces types réside dans la quantité et la nature des facteurs recrutés pour l’initiation IRES dépendante. Les facteurs impliqués sont divisés en deux catégories : les facteurs d’initiation canoniques et les facteurs d’initiation non canoniques (facteurs ITAF en bleu sur la figure 1.9.B) aussi appelés IRES Trans-Acting Factors (ITAF). Les facteurs d’initiation canoniques sont ceux qui sont impliqués dans l’initiation canonique coiffe-dépendante. Les facteurs cellulaires non canoniques

1.2. Évènements non canoniques et erreurs programmées

sont quand à eux des facteurs propres à l'activité de l'IRES. Ils reconnaissent l'IRES et favorisent les mécanismes d'interaction entre celle-ci et le ribosome. C'est uniquement le nombre et la nature des facteurs non canoniques qui distingue les catégories d'IRES III et IV.

1.2.1.3 Problématiques d'étude des IRES

Les mécanismes d'interaction entre les IRES et le ribosome sont encore peu connus, en particulier du point de vue de la dynamique. Il s'agit d'un champ de recherche actif. On peut se demander par quel biais la petite sous-unité ribosomique est recrutée par l'IRES, et quels sont les mécanismes qui interviennent entre le recrutement du ribosome et l'achèvement de la phase d'initiation, lorsque le ribosome entre dans la phase normale d'élongation. Ce deuxième aspect pose d'autant plus question que les études de structure ont montré que certaines IRES (en particulier l'IRES CrPV) interagissent avec les sites A,P et E du ribosome. Celui-ci doit donc lors des premiers cycles d'élongation s'extraire de la structure, ce qui amène la question de l'impact de cette étape sur le déroulement des premiers cycles d'élongation. Enfin, la grande diversité des IRES laisse imaginer que cette diversité se retrouvera dans les mécanismes d'interaction entre les différentes IRES et le ribosome.

L'étude des IRES est au cœur de mon travail de thèse. Nous souhaitons mesurer l'influence de la structure IRES sur la dynamique du ribosome lors des premiers cycles d'élongation afin de mettre à jour les mécanismes d'interaction entre les différents types d'IRES et le ribosome eucaryote à cette étape. Il est essentiel en ce sens de connaître les structures et les mécanismes d'initiation des IRES que nous étudions en molécule unique. Ces connaissances nous permettront d'éclairer nos mesures cinétiques pour proposer une interprétation biologique à nos résultats.

1.2.2 Erreurs programmées de l'élongation : cas du décalage de la phase de lecture -1

Le phénomène de décalage de la phase de lecture (ou Frameshift-FS) illustre parfaitement la nature des événements de recodage. La phase de lecture correspond à la suite normale de codons définie à partir du codon initiateur (triplets de nucléotides) qui encode l'ensemble de la protéine qui doit être traduite. Le ribosome se déplace toujours dans le même sens, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'.

Considérons une séquence quelconque de 3 codons : AUG GUU GUA qui code pour la série d'acides aminés : Met-Leu-Val. Imaginons que parvenu au deuxième codon de cette séquence (GUU), le ribosome se décale d'un nucléotide en arrière. Au lieu de lire la séquence normale le ribosome va lire une nouvelle série de codons et produire en conséquence le bout de chaîne protéique suivant : Met-Arg-Thr complètement différent de celui encodé initialement. Ce phénomène est appelé décalage de la phase de lecture en -1 car le décalage du ribosome le long de l'ARNm est d'un.L nucléotide dans le sens inverse du sens de lecture. Le sens (sens de lecture, noté + et sens inverse noté -) et le nombre de lettres concernées par le décalage peuvent varier, on trouve des décalages ± 1 , ± 2 et ce jusqu'à ± 4 nucléotides, mais le décalage en -1 reste le plus fréquent et le plus étudié.

Le décalage de la phase de lecture est une erreur programmée dans le code génétique de

Chapitre 1. La traduction eucaryote : entre biologie et physique : apports de la molécule unique pour l'étude d'un processus complexe

certaines organismes, communément des virus et des bactéries [Atkins 2010]. Ces organismes possèdent des séquences d'ARNm qui induisent du décalage de la phase de lecture pour une proportion bien définie de ribosomes afin de produire deux protéines à partir d'une seule séquence d'ARNm⁸. La proportion de ribosomes affectés par le FS appelée efficacité du décalage de la phase de lecture varie selon les cas, pouvant aller jusqu'à 80% de ribosomes affectés. Généralement, cette erreur programmée reste un évènement rare et l'efficacité est souvent autour de 10% [Fayet 2010].

Comme nous l'avons évoqué, le décalage de la phase de lecture est encodé dans la séquence de l'ARN messenger. Ce mécanisme de recodage est en fait favorisé par des éléments qui correspondent à des signaux stimulateurs. Sans la présence de ces éléments qui présentent des caractéristiques séquentielles et structurales particulières, le décalage de la phase de lecture ne peut avoir lieu. La nature des éléments stimulateurs joue a priori un grand rôle dans la définition de l'efficacité de décalage, même si les mécanismes exacts qui expliquent ce phénomène posent encore de nombreuses interrogations.

1.2.2.1 Éléments de la séquence ARNm favorisant le décalage de la phase de lecture

Deux éléments ont été identifiés comme étant essentiels pour que le décalage de la phase de lecture ait lieu [Brierley 2006]. Le premier élément est une séquence glissante, soit une combinaison particulière de nucléotides et le second élément est une structure secondaire de l'ARNm du type tige-boucle ou pseudonœud. Nous décrirons les particularités de chacun de ces deux éléments.

Séquence glissante Le site appelé séquence glissante est un motif commun à tous les ARNm qui induisent du FS-1. Il s'agit d'une séquence de 7 nucléotides qui ne contient que trois lettres différentes (X,Y,Z) sous la forme : X XXY YYZ. Il est aussi possible de rencontrer des séquences X XXX XXZ. L'idée principale est que le ribosome peut se décaler d'un nucléotide en arrière en maintenant un appariement codon-anticodon correct.

Structure secondaire stimulatrice La séquence glissante n'est pas suffisante pour provoquer à elle seule le décalage du ribosome. Elle doit être suivie quelques nucléotides (5-8 nucléotides habituellement) plus loin par une structure secondaire que le ribosome va devoir ouvrir pour continuer de traduire l'ARN messenger.

Il existe deux types de structures secondaires stimulatrices du décalage : les tiges-boucles et les pseudonœud présentés dans la figure 1.10. Les tiges boucles sont constituées d'une structure double brin S1 surmontée d'une boucle simple brin L1. La longueur de la séquence de la tige boucle est très variable. Celle présentée en illustration dans la figure 1.10 est celle identifiée dans le génome du virus HIV, elle est constituée de 26 nucléotides, 22 pour la structure S1 et 4 pour la boucle L1. L'autre type de structure secondaire est appelé pseudonœud. Il s'agit d'une structure plus complexe. Sa forme majoritaire dite en H, est composée de deux structures double-brins S1 et S2 reliées par deux boucles simples brins L1 et L2. Ici aussi nous présentons un exemple

8. Il est important de noter que cette erreur programmée est aussi utilisée par certains organismes eucaryotes dans des processus de contrôle de la qualité des ARNm et de la stabilité de l'ADN.

1.2. Évènements non canoniques et erreurs programmées

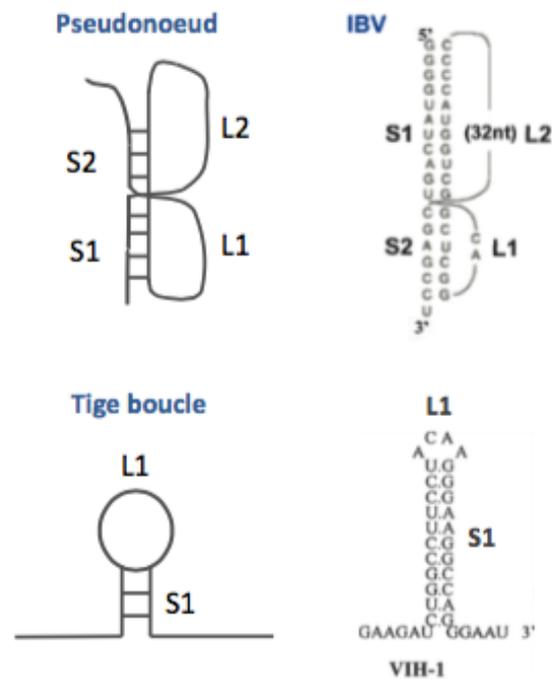


FIGURE 1.10 – Schéma représentant des structures secondaires identifiées comme inductrices de FS-1. En haut à droite, un pseudonœud que l'on retrouve dans la séquence du gène IBV et en bas à droite la tige boucle inductrice du gène dnaX de E.coli.

associé au virus de la bronchite infectieuse (IBV) qui est une structure de référence pour étudier le décalage de la phase de lecture chez les eucaryotes.

De nombreuses études basées sur des modifications de la séquence et de la structure des pseudonœuds et des tiges boucle par des mutations ponctuelles ont montré que ces structures sont nécessaires pour qu'il y ait décalage de la phase de façon efficace [Bharill 2011, Bidou 1997].

1.2.2.2 Quelques exemples fondateurs de décalage de la phase de lecture en -1

Exemple du virus HIV-1 : production de gag et gagpol Le décalage de la phase de lecture pour le virus de l'immunodéficience humaine (HIV), observé en 1988 [Jacks 1988], est historiquement l'un des premiers phénomènes de FS étudié. Le HIV est un virus qui affecte des hôtes eucaryotes. En réalité, il ne peut infecter que l'être humain ou quelques espèces de grands singes. Le virus reconnaît les cellules spécifiques de ces espèces. Le mécanisme de FS-1 joue un rôle primordial dans le processus de réplication de ce virus.

Pour se répliquer, HIV a besoin de deux protéines : gag et gagpol dans des proportions bien définies. Or ces deux protéines sont produites à partir du même ARN messager, les gènes codant pour gag et gagpol étant l'un à la suite de l'autre. C'est par un procédé de décalage de phase en -1 que le virus va assurer la production de gagpol. Deux signaux stimulateurs ont pour cela été

Chapitre 1. La traduction eucaryote : entre biologie et physique : apports de la molécule unique pour l'étude d'un processus complexe

identifiés sur l'ARNm, une séquence glissante : AAA AAA A et une tige boucle (cf. figure 1.11).

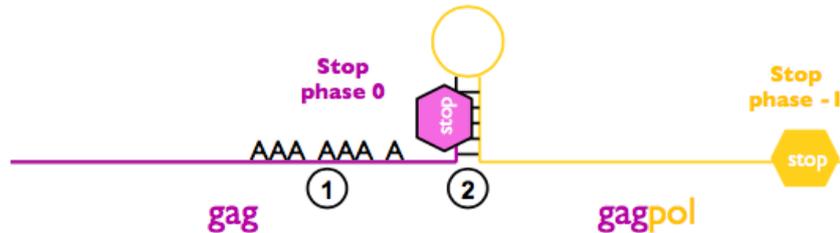


FIGURE 1.11 – Représentation schématique de la séquence inductrice de frameshift chez HIV qui permet au virus de produire les protéines gag et gagpol dans des proportions nécessaires à sa réplication.

Le ribosome commence par produire la protéine gag. Arrivé au niveau des signaux stimulateurs il va se décaler d'un nucléotide en arrière ou bien continuer normalement la traduction. Si le ribosome ne se décale pas et continue à lire normalement l'ARNm, il rencontre un stop dans la phase normale de lecture (phase 0), cesse de traduire et relâche la protéine gag. En revanche s'il s'est décalé, le codon stop ne sera pas lu comme tel et le ribosome va poursuivre sa traduction jusqu'à un second stop plus loin qui lui se trouve dans la nouvelle phase de lecture (phase -1). Il s'arrête alors et relâche une protéine plus longue : gagpol. L'efficacité de ce processus a été mesurée plusieurs fois et évaluée entre 2 et 10% selon les études [Dulude 2005, Atkins 2016]. Cette efficacité correspond aux besoins spécifiques en gag et en gagpol requis par le processus de réplication du virus.

Un exemple procaryote : séquence dnaX impliquée dans le fonctionnement cellulaire de E. coli Le décalage de phase de lecture en -1 du gène bactérien dnaX est un exemple de FS cellulaire impliqué dans un rôle biologique important. Le gène dnaX de la bactérie E.coli code pour la production de deux sous-unités γ et τ d'une enzyme appelée ADN polymérase III responsable de la réplication de l'ADN. Son rôle est donc majeur dans l'activité cellulaire de E.coli. Comme on peut le voir sur la figure 1.12.(B), ce décalage est orchestré par la présence combinée d'une séquence glissante A AAA AAG⁹ et d'une tige boucle. A l'extrémité 5' de la séquence on trouve une séquence dite Shine-Dalgarno interne. Cette séquence joue un rôle dans l'initiation canonique procaryote, elle guide le ribosome dans sa recherche du codon initiateur. Dans le cas de la séquence dnaX, des éléments de structure laissent à penser que cette séquence joue également un rôle dans le décalage de la phase de lecture [Korostelev 2007, Larsen 1997]. En effet, pris en étau par son interaction simultanée avec la séquence Shine-Dalgarno et la tige-boucle quelques codons plus loin le ribosome se retrouve bloqué au niveau de la séquence glissante. Les contraintes associées aux interactions en question favorisent l'occurrence du décalage au niveau

9. Une des particularités de cette séquence qui contribue à renforcer l'efficacité de FS-1 réside dans le fait que les codons AAA et AAG (codons lus respectivement s'il y a décalage ou dans le cas échéant) recrutent le même $ARNt_{uuu}$, ce qui facilite le glissement du ribosome sur l'ARNm et donc le décalage en -1. On retrouve cette particularité pour la séquence codant pour gag et gagpol du virus HIV-1.

1.2. Évènements non canoniques et erreurs programmées

de cette séquence inductrice. D'ailleurs [Chen 2014] ont montré qu'une mutation de la séquence Shine-Dalgarno engendrait une diminution nette de l'efficacité de FS-1 de 75% à 38%, dans le contexte particulier de leurs expériences.

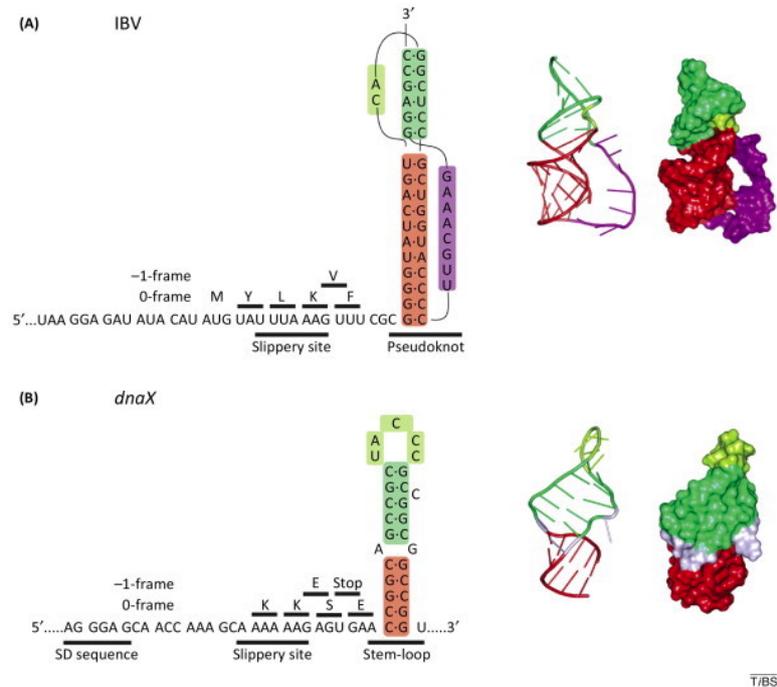


FIGURE 1.12 – Figure adaptée de [Caliskan 2014]. Schémas de séquences modèles inductrices de FS-1. (A) Séquence du gène IBV issue d'un virus affectant les organismes eucaryotes. A droite, la structure spatiale du pseudonœud en H caractéristique de cette séquence. (B) Séquence du gène dnaX de l'organisme E.coli procaryote avec une séquence Shine-Dalgarno. A droite on retrouve la structure spatiale de la tige boucle.

Le ribosome qui se décale d'un nucléotide rencontre un codon stop dans la nouvelle phase de lecture juste après la séquence glissante et libère la sous-unité γ . Si le ribosome ne se décale pas, il continue la traduction et produira la sous-unité τ . Le taux d'efficacité de déphasage est estimée à 50% dans le cas du gène dnaX in-vivo [Larsen 1997], ce qui permet de produire de façon stoechimétrique les deux sous-unités. L'exemple du décalage de phase pour le gène dnaX illustre bien comment le déphasage jumelé à la traduction conventionnelle est un moyen efficace utilisé par des organismes pour produire deux protéines ayant des fonctions différentes, dans un rapport précis.

décalage de la phase de lecture chez IBV : système de référence pour l'étude du phénomène chez les eucaryotes De la même manière que le gène dnaX peut être considéré comme le système modèle procaryote de décalage de la phase de lecture en -1 du fait de sa haute efficacité de décalage, le gène IBV est un système modèle pour le FS-1 chez les eucaryotes. Son étude a été favorisée par la découverte et l'essor de systèmes de traduction in-vitro eucaryotes. Le gène IBV est issu du code génétique du virus de la bronchite infectieuse aviaire, un virus

Chapitre 1. La traduction eucaryote : entre biologie et physique : apports de la molécule unique pour l'étude d'un processus complexe

de la famille des coronavirus qui affecte des espèces d'oiseaux. L'implication exacte du FS-1 dans les processus de réplication du virus IBV est moins claire que pour le virus HIV, mais la littérature semble indiquer qu'il sert à la régulation du ratio relatif de deux classes de protéines enzymatiques virales : des protéases et des enzymes de modification de l'ARNm [Plant 2008]. On retrouve encore pour cet ARNm (cf. 1.12.(A)), les deux éléments stimulateurs essentiels du FS-1 : une séquence glissante U UUA AAG et une structure secondaire. Il s'agit dans ce cas précis d'un pseudonœud de forme H¹⁰. Le pseudonœud de cette séquence a été historiquement le premier observé et étudié par [Brierley 1989], concluant à l'existence de structures secondaires plus complexes et plus structurées que les tiges boucles. Par la suite, d'autres pseudonœuds ont pu être identifiés chez différents virus de plantes et d'animaux. L'efficacité de cette séquence a été mesurée entre 40 et 80% par deux équipes [Caliskan 2014, Brierley 1997]. Il est important de noter que leur mesure a été réalisée sur un gène IBV adapté pour être exprimé dans des cellules bactériennes de E.coli. Les auteurs ont notamment dû adapter dans ce sens l'ARNm par l'ajout d'une séquence Shine-Dalgarno à l'extrémité 5'.

1.2.2.3 Problématiques d'étude du décalage de la phase de lecture en -1

Considérant le décalage de la phase de lecture, nous avons vu qu'un même processus était utilisé dans des contextes biologiques très différents, et favorisé par des éléments qui peuvent prendre diverses formes (plus d'une dizaine de séquences glissantes ont été identifiées et de même les structures secondaires stimulatrices présentent une grande diversité de séquences et de structures). Il y a donc un mécanisme général conservé mais de nombreuses variantes selon les systèmes biologiques étudiés. De ce fait, trois problématiques principales peuvent être identifiées.

- Par quels mécanismes la séquence glissante et la structure secondaire interagissent-elles avec le ribosome pour favoriser son glissement d'un nucléotide en arrière sur l'ARN messager ?
- Par quels mécanismes le taux de frameshift est-il régulé pour s'assurer que le ratio des deux protéines produites soit celui requis par l'organisme ?
- La diversité des éléments stimulateurs observés explique-t-elle la diversité dans les efficacités de décalage et plus généralement quelle est l'influence de la nature de ces éléments stimulateurs sur les mécanismes du décalage de phase ?

1.2.3 Erreurs programmées de la terminaison : franchissement du codon stop

Les erreurs spontanées et programmées affectent aussi la dernière étape de la traduction : la terminaison. La terminaison a lieu quand le ribosome rencontre un codon stop : UAA, UGA ou UAG. Interviennent alors lors du processus normal les facteurs de terminaison eRF1 et eRF3. Seulement, l'incorporation au site A de ces facteurs est en compétition avec l'incorporation d'un ARN de transfert proche-cognat (appariement codon-anticodon assuré pour seulement deux nucléotides sur trois). Dans des conditions classiques de traduction, grâce aux mécanismes de contrôle par le ribosome de l'incorporation des ARNt pour ne garder que les ARNt cognats, l'incorporation d'un ARNt à la place des facteurs de terminaison a une occurrence très faible, de

10. Se référer au paragraphe : *Structure secondaire stimulatrice* pour la description plus précise de ce pseudonœud.

1.2. Évènements non canoniques et erreurs programmées

0,3% par exemple pour des levures [Namy 2003]. Ce sont ici des erreurs spontanées. Mais dans un certain contexte nucléotidique (nature des nucléotides voisins du codon stop), ce phénomène, appelé translecture du codon stop, peut avoir une occurrence nettement plus importante, allant jusqu'à 20% des ribosomes qui ne s'arrêtent pas au stop et produisent de fait une protéine plus longue. Le fait que ce pourcentage élevé d'erreurs soit lié à une séquence spécifique de l'ARNm en fait une erreur programmée car inscrite dans le code génétique.

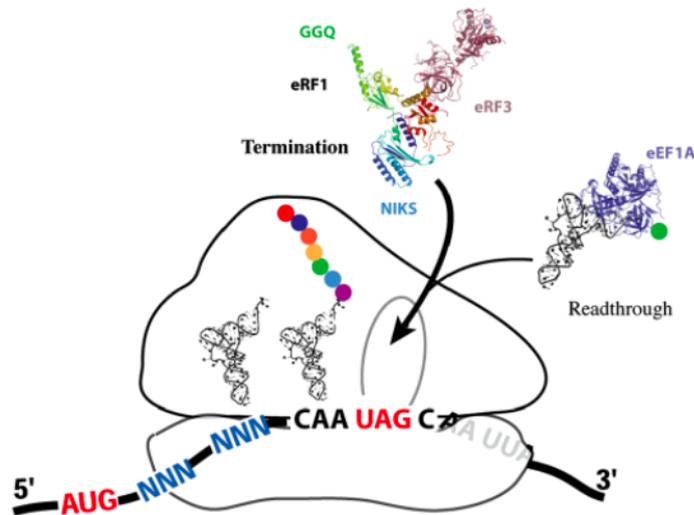


FIGURE 1.13 – Schéma du mécanisme de franchissement du codon stop illustrant la compétition entre l'incorporation des facteurs de terminaison eRF1-eRF3 et celle d'un ARNt proche-cognat au site A.

Comme le décalage de la phase de lecture, la translecture est un processus utilisé par les virus comme un mécanisme de régulation de la production de deux protéines à partir d'un seul ARN messenger [Gesteland 1996]. Les facteurs favorisant la translecture ne sont pas aussi nettement identifiés que pour le décalage de la phase de lecture. On a identifié l'existence des facteurs cis, c'est à dire liés à l'ARN messenger lui-même et au contexte nucléotidique en amont et en aval du codon stop (parfois également l'existence de structures secondaires stimulatrices), mais également des facteurs trans comme la nature des ARNt en présence. Il a aussi été montré que des molécules chimiques pouvaient induire une meilleure efficacité de translecture pour un ARNm donné [Bugaud 2016]. Il reste donc de nombreuses interrogations à la fois sur les acteurs favorisant la translecture et sur les mécanismes qui la régissent, encore peu connus chez les eucaryotes.

1.2.4 Évènements non canoniques : un champ de recherche ouvert

Les processus d'erreurs programmées et d'initiation IRES dépendante sont un champ de recherche actif depuis leur découverte dans les années 70. La première difficulté a été d'identifier les cas existants dans l'ensemble des règnes du vivant. Cela a été fait en partant des virus et des bactéries qui sont les principaux utilisateurs de ces processus non canoniques, mais peu à peu des exemples ont été identifiés, plus rares, dans le génome des organismes eucaryotes.

Chapitre 1. La traduction eucaryote : entre biologie et physique : apports de la molécule unique pour l'étude d'un processus complexe

Dans un second temps, des études se sont intéressées aux acteurs de ces phénomènes. Grâce à des techniques de biologie moléculaire et à des études structurales, les éléments qui favorisent l'existence d'erreurs programmées ont été identifiés ainsi que leur importance relative dans l'efficacité du processus. Le principal défi réside désormais dans la compréhension des mécanismes d'action et de régulation mis en jeu par ces phénomènes. Dans l'ensemble des cas décrits, des modèles ont été proposés, en particulier pour les mécanismes procaryotes, mais ces modèles restent discutés et de nombreuses interrogations demeurent.

Nous montrerons dans la suite de ce chapitre que les techniques de molécule unique sont des outils adéquats pour étudier les phénomènes non canoniques. Elles permettent en effet d'isoler des événements rares comme les erreurs programmées et ouvrent la voie à des approches dynamiques qui donnent accès aux étapes cinétiques des mécanismes étudiés. Nous montrerons la complémentarité essentielle entre ces techniques à l'interface entre la biologie et la physique avec d'autres approches, en particulier avec les études de structure qui ont connu un grand essor ces dernières années. Les études de structure apportent des informations sur l'organisation des acteurs du mécanisme à un instant t très complémentaires du suivi en temps réel du mécanisme proposé par la molécule unique.

1.3 Molécule unique et techniques complémentaires pour l'étude de la traduction

1.3.1 Principe et atouts de la molécule unique

Les techniques rassemblées sous la nomination de molécule unique permettent de détecter ou manipuler des molécules chimiques ou bio-chimiques à l'échelle individuelle pour étudier leurs propriétés ou suivre leur dynamique isolément. La plupart des techniques classiques de bio-chimie utilisées dans l'étude du ribosome (NMR, foot-print...) sont des techniques de mesure d'ensemble. Elles consistent à étudier un processus en moyennant le comportement individuel d'un grand nombre de molécules. Aussi, ne sont obtenues que des informations statistiques moyennes et le plus souvent statiques sur le processus étudié.

De plus, il est impossible avec une mesure d'ensemble d'isoler une sous-population dont le comportement serait différent, comme c'est le cas lorsque l'on étudie des événements rares comme les erreurs programmées. De plus, l'hétérogénéité de la population n'est pas prise en compte par la mesure d'ensemble. Étudier l'histoire individuelle de chaque molécule est adapté pour distinguer des sous-populations au sein d'un ensemble et étudier la distribution des comportements individuels. On présente dans la figure 1.14 le cas de la translecture. Si l'on considère qu'une sous-population de 10% des ribosomes va passer le codon stop par translecture, dans le cas d'une mesure d'ensemble, il sera difficile d'isoler ces événements de la masse des ribosomes qui traduisent normalement. On accède à des informations sur le processus dans son ensemble comme le taux de translecture, les aspects structuraux ou encore l'action de molécules inductrices (favorisant la translecture). Mais on ne peut étudier le déroulement particulier du processus pour la sous-population impliquée. Avec l'étude en molécule unique, on peut isoler les 10% de ribosomes affectés par la translecture pour observer l'impact de ce processus sur les mécanismes de traduction. On peut également aborder les aspects cinétiques du phénomène.

1.3. Molécule unique et techniques complémentaires pour l'étude de la traduction

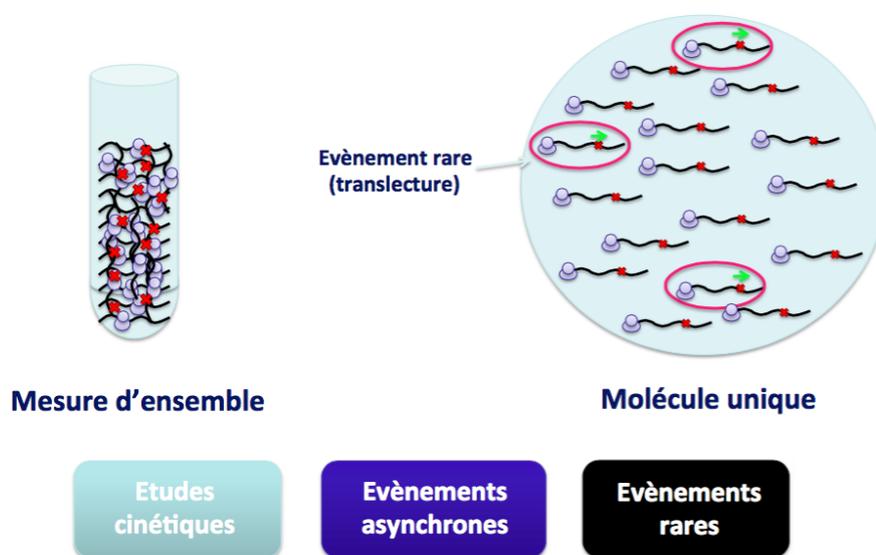


FIGURE 1.14 – Schéma représentant les enjeux de la molécule unique et ses atouts pour l'étude de la dynamique du ribosome

Si l'on considère les aspects cinétiques d'un processus comme la traduction, plusieurs difficultés se posent avec les techniques de bio-chimie classiques. D'abord la traduction est un processus asynchrone par nature, ce qui signifie que l'ensemble des ribosomes en présence n'initie pas la traduction au même moment sur l'ARNm, et de même, ils ne vont pas tous à la même vitesse, leur dynamique varie tout au long de l'élongation. Aussi lorsque l'on réalise une mesure d'ensemble, on perd l'information cinétique en moyennant tous ces événements asynchrones. Même si l'on parvient à synchroniser le début de la traduction, on n'obtiendra qu'une vitesse moyenne sur l'ensemble de la population.

Avec les techniques de molécule unique, on suit chaque ribosome individuellement pendant les trois phases de la traduction. On peut donc à la fois mesurer une vitesse moyenne d'élongation mais aussi reconstruire la distribution des vitesses de l'ensemble des ribosomes, et ainsi détecter si une sous-population a un comportement cinétique particulier.

1.3.2 Techniques de molécule unique

Nous avons abordé les caractéristiques essentielles et les atouts d'une approche à l'échelle de la molécule unique. Mais l'appellation molécule unique rassemble un ensemble de techniques très diverses par le principe et la finalité de la mesure réalisée. L'échelle d'étude est le facteur commun pour l'ensemble de ces techniques. Elles peuvent être subdivisées en deux catégories principales : les techniques de micromanipulation et les techniques d'observation. On compte par exemple parmi les techniques de micromanipulation, l'AFM ou encore les techniques de pinces optiques et magnétiques [Chen 2017],[Ritchie 2012],[Yan 2015].

Chapitre 1. La traduction eucaryote : entre biologie et physique : apports de la molécule unique pour l'étude d'un processus complexe

Les techniques d'observation sont des techniques de microscopie. Elles sont elles-même divisées en deux catégories, les techniques de microscopie de fluorescence nécessitant un marquage des molécules ciblées et les autres techniques de microscopie qui ne nécessite pas de marquage. Dans cette seconde catégorie on retrouve la cryo-microscopie électronique, une technique très utilisée pour étudier la structure du ribosome. Elle permet de cartographier des ribosomes individuels mesurant environ 20 nm dans leurs moindres détails à l'échelle de l'angström. Historiquement, c'est une des techniques qui ont permis de déterminer la structure des ribosomes eucaryotes et procaryotes. Grâce à d'importantes avancées techniques ces dernières années, la cryo-EM joue un rôle primordial dans l'étude du ribosome et apporte de précieuses informations sur les mécanismes de son fonctionnement à l'échelle individuelle. Pour autant, la limitation principale de cette technique est qu'elle nécessite une préparation spécifique de l'échantillon. Celui-ci est cryogénisé, les ribosomes sont figés à un instant t pour pouvoir être observés avec une telle précision. Ce n'est donc pas une technique de microscopie adaptée pour observer le ribosome en mouvement et étudier sa dynamique. Pour ce faire, il est nécessaire de faire appel au deuxième ensemble de techniques de microscopie à l'échelle de la molécule unique : les techniques de microscopie de fluorescence. Nous détaillerons dans le paragraphe suivant deux de ces techniques souvent utilisées pour suivre la dynamique de ribosomes individuels.

1.3.2.1 Exemples de microscopies de fluorescence en molécule unique

La microscopie de fluorescence permet, via l'ajout contrôlé de molécules ou de nanocristaux fluorescents, de détecter des objets plus petits que les longueurs d'onde visibles. Au delà de la microscopie de fluorescence classique, qui sera détaillée au chapitre suivant, il existe des variantes plus sophistiquées que nous décrivons brièvement ici.

Transfert d'énergie de Forster (FRET) Il s'agit d'une technique utilisable à l'échelle de la molécule unique, permettant de mesure des distances de l'ordre de 1 à 10 nm entre deux molécules fluorescentes. Lorsque deux molécules fluorescentes sont suffisamment proches l'une de l'autre, il peut se produire un transfert d'énergie entre elles, résultant d'une interaction dipôle-dipôle. C'est ce transfert qui est appelé phénomène de FRET. S'il y a recouvrement entre le spectre d'émission d'une première molécule fluorescente (qui sera appelée donneur) et le spectre d'absorption d'une seconde (qui sera appelée accepteur) alors lorsque le donneur est excité il peut soit se désexciter radiativement en émettant un photon de fluorescence, soit transférer son énergie non radiativement à l'accepteur qui se désexcitera lui-même en émettant un photon de fluorescence. L'accepteur n'est pas nécessairement une molécule fluorescente, ce peut-être une molécule appelée Black Hole Quencher (BHQ) qui absorbe dans la gamme d'émission de l'accepteur mais qui n'est pas elle-même fluorescente. Dans ce cas, lorsque le transfert d'énergie a lieu, l'émission de fluorescence du donneur diminue, mais l'accepteur, lui, absorbe simplement l'énergie transférée sans émettre lui même un photon de fluorescence.

L'efficacité de FRET est proportionnelle à $\frac{1}{R^6}$, où R est la distance entre les deux fluorophores. Elle vaut 50% lorsque donneur et accepteur sont distants de R_0 appelé rayon de Förster. L'ordre de grandeur de R_0 est typiquement 5 nm. On comprend ainsi que l'efficacité varie très vite avec la distance entre les marqueurs et permet donc de la mesurer très précisément. Le FRET est une technique de choix pour étudier des changements de conformation à l'échelle de

1.3. Molécule unique et techniques complémentaires pour l'étude de la traduction

la molécule unique et elle a été très largement utilisée pour étudier le ribosome depuis l'étude pionnière de Blanchard et al. Cependant, utiliser le FRET pour suivre la dynamique de traduction nécessite un important travail sur la stratégie de marquage, notamment du ribosome lui-même. Il faut trouver des molécules sujettes au FRET et venir les attacher spécifiquement pour que la distance entre elles varie selon la conformation de la cible que l'on veut observer dynamiquement.

Zero Mode Waveguide Une autre amélioration des techniques de microscopie de fluorescence en molécule unique est l'utilisation de nanostructures appelées Zero Mode Waveguides afin de dépasser une limitation intrinsèque à la molécule unique : la limitation de la concentration en espèces marquées. Cette limite est établie typiquement entre 10 et 100nM, ce qui correspond à une molécule marquée dans un volume élémentaire d'excitation qui varie de 10^{-2} à 10^{-1} fL en fonction des techniques considérées. Au delà de cette limite on ne peut plus considérer que l'on travaille en molécule unique, mais cette limite est loin d'être représentative des conditions physiologiques et travailler à cette échelle de concentration constitue nécessairement un biais. Utiliser les Zero Mode Waveguides consiste en fait à utiliser un substrat d'aluminium nanostructuré avec des trous de diamètres d variant de 30 à 80 nm où sera déposée la solution à étudier contenant les molécules marquées. Ces nanostructures se comportent comme des guides d'ondes non propagatifs permettant de confiner le champ d'excitation et donc d'abaisser le volume d'excitation effectif. Le volume élémentaire d'excitation effectif est d'autant plus faible que le trou est petit. En abaissant la valeur de ce volume, on augmente la concentration maximale en molécules marquées pour rester dans le cadre de la molécule unique [Levene 2003] (cf. figure 1.15).

Pour un ZWM de diamètre 30nm, cette limite est établie à 250 μ M. Le Zero Mode Waveguide est une technique très avantageuse mais difficile à mettre en place. L'équipe qui a réalisé l'étude [Chen 2014] que nous détaillons plus loin collabore avec l'entreprise Pacific Bioscience qui valorise le ZWM au travers d'appareils commerciaux. C'est l'utilisation de cette technique qui leur permet de travailler à des concentrations allant jusqu'à 1 μ M pour certains facteurs.

1.3.3 Stratégies de marquage pour la molécule unique

1.3.3.1 Différentes possibilités de marquage

Un grand nombre d'acteurs sont impliqués dans le processus de traduction, ce qui laisse la possibilité de marquer différents éléments pour suivre plus ou moins indirectement l'activité du ribosome. Une première façon indirecte d'observer l'activité du ribosome est de suivre la production d'une protéine fluorescente (un mutant de la GFP) par le ribosome pour mesurer sa vitesse d'élongation [Katranidis 2009]. Seulement le temps correspondant au temps d'apparition du signal de fluorescence ne concerne pas seulement la traduction de la protéine mais inclut aussi la cinétique de repliement et de maturation de la protéine. Hors ces cinétiques sont loin d'être négligeable devant la cinétique de traduction du ribosome et induisent nécessairement un biais dans la mesure. On peut aussi marquer spécifiquement l'ARN messager grâce à des oligonucléotides complémentaires de la séquence codante ou bien les ARN de transfert et les facteurs d'élongation pour suivre leur mouvement orchestré par le ribosome. Pour autant la

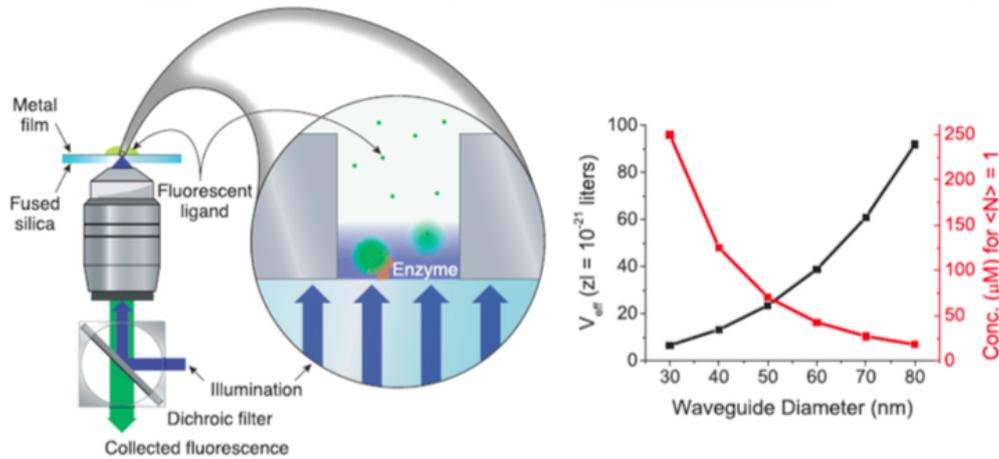


FIGURE 1.15 – Figure adaptée de [Levene 2003]. A Gauche : principe d’une expérience de microscopie de fluorescence avec un échantillon nanostructuré sous forme de ZMW. Une couche de 100 nm d’aluminium est déposée sur une lamelle de microscope et percée de trous de diamètre allant de 30 à 100 nm par lithographie électronique. L’excitation et la collection du signal de fluorescence se font comme sur un montage d’épifluorescence. A Droite : Volume effectif d’excitation (dans lequel une molécule fluorescente peut effectivement être excitée) en noir et concentration maximale de molécules fluorescente pour laquelle il y a en moyenne 1 molécule fluorescente par volume effectif d’excitation (en rouge) en fonction du diamètre du trou dans la couche d’aluminium.

méthode de marquage la plus directe pour suivre l’activité traductionnelle et identifier les étapes de la dynamique du ribosome reste le marquage du ribosome lui-même. Le ribosome étant une macro-molécule complexe, son marquage constitue en lui-même un défi, et peut encore connaître des évolutions, notamment pour le ribosome eucaryote.

1.3.3.2 Marquage du ribosome procaryote

Les premières découvertes en terme de structures, les premiers extraits cellulaires optimisés pour la traduction et les premières études de ce processus se sont concentrés sur la traduction procaryote, moins complexe que le processus eucaryote. C’est donc naturellement que les premières techniques de marquage du ribosome aient été développées sur des ribosomes procaryotes. Deux stratégies principales de marquage du ribosome procaryote ont été développées, basées sur la modification des éléments qui le composent. Pour les deux approches, l’objectif est de marquer spécifiquement, efficacement et surtout de façon stable le ribosome sans altérer son activité biologique.

Marquage par modification d’une protéine du ribosome La première stratégie de marquage consiste à modifier des protéines constitutives du ribosome. Par exemple les travaux de [Fei 2010] ont ciblé la protéine L1 située sur la sous-unité 50S du ribosome, proche des sites P et E et plus particulièrement du site E. [Fei 2008]. La procédure de marquage est détaillée dans la figure 1.16.

1.3. Molécule unique et techniques complémentaires pour l'étude de la traduction

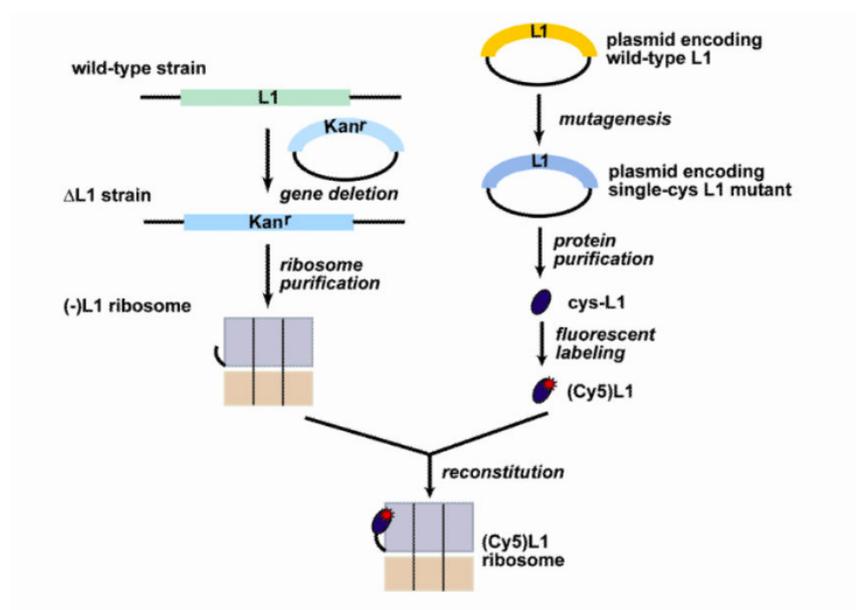


FIGURE 1.16 – Figure adaptée de [Fei 2010] illustrant la méthode de marquage du ribosome par modification de la protéine L1. Des ribosomes modifiés pour lesquels L1 a été déléetée sont produits et purifiés d'un côté et par une autre voie un complexe (Cy5)L1 est produit. L'ensemble du système est reconstitué pour former un ribosome actif, marqué au niveau de L1 par une cyanine5.

Elle consiste d'un côté à produire et purifier des ribosomes *E.coli* (-)L1ribosome pour lesquels la protéine L1 a été déléetée. En parallèle, des protéines L1 couplées à un marqueur cyanine sont produites et purifiées à partir d'un gène modifié par mutagénèse. Enfin l'ensemble (Cy5)L1-ribosome est reconstitué pour donner un ribosome marqué. Les auteurs ont vérifié par la suite la viabilité de leur système. Ils ont constaté que 90% des ribosomes marqués étaient actifs in-vitro.

Marquage par modification des ARN ribosomiques La deuxième technique de marquage développée par [Dorywalska 2005] spécifiquement pour la microscopie de fluorescence en molécule unique consiste à modifier des boucles d'ARN ribosomiques sur les deux sous-unités du ribosome. Pour effectuer ce marquage, les auteurs se sont appuyés sur des études structurales [Yusupov 2001, Wimberly 2000, Schlutzen 2000] des sous-unités du ribosome pour isoler des hélices d'ARN ribosomal éloignées des sites où se situe l'activité du ribosome (sites E,P,A, protéines L1,L7 et L12 cf. 1.17.A). Ils ont modifié génétiquement ces hélices en ajoutant des extensions tiges boucles (cf.figure 1.18) sur lesquelles pourront venir s'hybrider des oligonucléotides couplés à un marqueur fluorescent. Les auteurs ont alors vérifié que ces ribosomes modifiés étaient bien actifs et traduisaient efficacement in-vitro. Ils ont également vérifié qu'ils obtenaient une bonne efficacité de marquage des ribosomes et qu'ils étaient en mesure de les accrocher sur une surface fonctionnalisée pour les observer en molécule unique (figure 1.17).

Les résultats de cette étude ont été suivis de plusieurs études de la dynamique du ribosome procaryote par microscopie de fluorescence en molécule unique [Chen 2014, Marshall 2008] qui ont apportées de précieuses informations sur les mécanismes et les étapes cinétiques de l'élon-

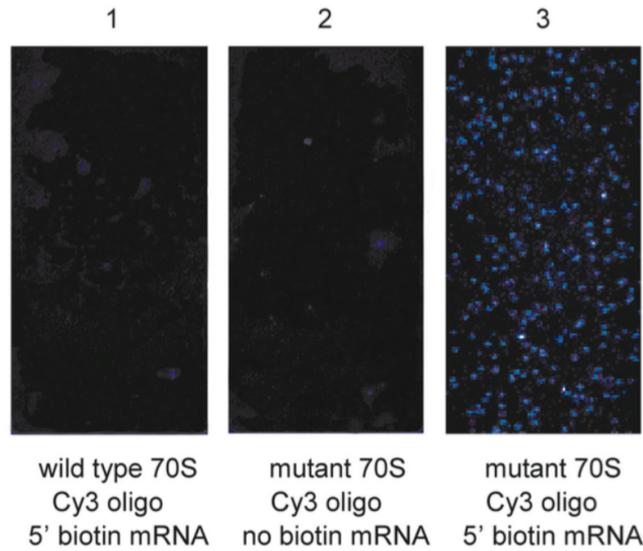


FIGURE 1.17 – Figure adaptée de [Dorywalska 2005]. Images de microscopie de fluorescence en réflexion totale de ribosomes 70S accrochés spécifiquement en surface de l'échantillon. (1) image TIRFM lorsque les ARNm ribosomiaux ne sont pas mutés. Aucun signal de fluorescence n'est visible. (2) Image TIRFM, les ribosomes mutés sont observés sur un échantillon dont la surface n'est pas fonctionnalisée. Aucun signal de fluorescence n'est visible. (3) Image TIRFM d'un échantillon où les ribosomes mutés sont mis en présence d'une surface fonctionnalisée. On observe un signal de fluorescence correspondant à l'émission de Cy3, qui marque spécifiquement le ribosome. En conclusion les ribosomes sont efficacement marqués et s'accrochent spécifiquement à une surface fonctionnalisée.

gation.

1.3.3.3 Marquage du ribosome eucaryote

La structure du ribosome eucaryote (de la levure *Serevisae*) n'a été élucidée complètement qu'en 2010. Les techniques de marquage sont de fait plus récentes et encore peu répandues pour le ribosome eucaryote. Dans la lignée des travaux ayant permis de développer le marquage des ARN ribosomiaux du ribosome procaryote, une équipe a développé une technique similaire appliquée au ribosome eucaryote de levure [Petrov 2010]. Là aussi deux hélices ont été identifiées et génétiquement modifiées pour y ajouter des structures tiges boucles complémentaires d'oligofluorophores cyanines. Les auteurs ont démontré qu'ils parvenaient à observer des complexes oligofluorophores-ribosomes stables dans le temps et adaptés à une accroche en surface pour l'observation en molécule unique. Cette récente avancée ouvre la voie aux études dynamiques du ribosome eucaryote en molécule unique comme celle qui sera présentée dans la section 1.3.4.

1.3.4 Exemples d'études du décalage de phase en -1

Comme nous l'avons souligné dans la section 1.3.1, la molécule unique est particulièrement adaptée à l'étude d'erreurs programmées comme le décalage de la phase de lecture en -1 puis-

1.3. Molécule unique et techniques complémentaires pour l'étude de la traduction

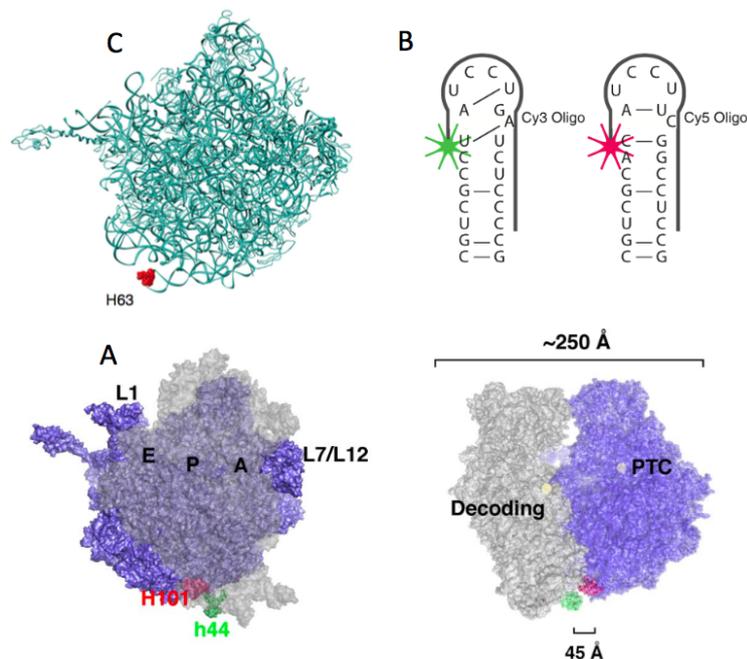


FIGURE 1.18 – Figures adaptées de [Dorywalska 2005] et [Petrov 2010]. Cartographies réalisées par cristallographie X illustrant les positions des ARNm ribosomiaux modifiés dans le but de marquer le ribosome spécifiquement. (A) Marquage d'un ribosome eucaryote au niveau des boucles H101 et H44. Ces boucles ARNr sont positionnées loin des sites impliqués dans l'activité du ribosome (sites A,P,E, protéines L1/L7 et L12, tunnel d'entrée...). A droite on observe qu'un changement de conformation du ribosome modifie la distance entre les deux zones marquées. (B) Illustration de la stratégie de marquage. Des tiges boucles sont accrochées sur les ARNr. Les oligofluorophores s'accrochent par liaison codon-anticodon à ces structures. (C) Marquage du ribosome procaryote au niveau de la boucle H63, elle aussi éloignée des sites d'activité stratégiques du ribosome.

qu'elle permet d'isoler la population des ribosomes qui se décalent. Nous présenterons dans cette partie une étude en molécule unique du mécanisme de décalage de phase en -1 pour le gène *dnaX* procaryote qui met en exergue comment les interactions du ribosome avec les différentes structures inductrices contribuent à provoquer le décalage. Nous présenterons ensuite une étude de structure qui apporte un autre éclairage sur le mécanisme de FS, nous confronterons les résultats de ces deux études.

1.3.4.1 Etude cinétique du mécanisme de décalage de phase de lecture en -1

Pour étudier le décalage de lecture en -1, les auteurs de [Chen 2014] utilisent la microscopie de fluorescence à l'échelle de la molécule unique pour suivre la dynamique de ribosomes individuels mis dans un contexte favorable au FS-1. La force de cette étude est de combiner à la fois la technique du FRET et du ZMW pour parvenir à un modèle détaillé du mécanisme de FS -1.

Chapitre 1. La traduction eucaryote : entre biologie et physique : apports de la molécule unique pour l'étude d'un processus complexe

Stratégies de marquage et principe de la mesure Pour étudier les différents mécanismes mis en jeu dans le FS-1, [Chen 2014] n'ont pas marqué que le ribosome en un point mais ont au contraire mis en place plusieurs stratégies de marquage en parallèle. Ils peuvent ainsi suivre la dynamique de plusieurs acteurs de la traduction et leurs interactions relatives lorsqu'a lieu le décalage de phase. Les stratégies de marquage sont résumées sur la figure 1.19.

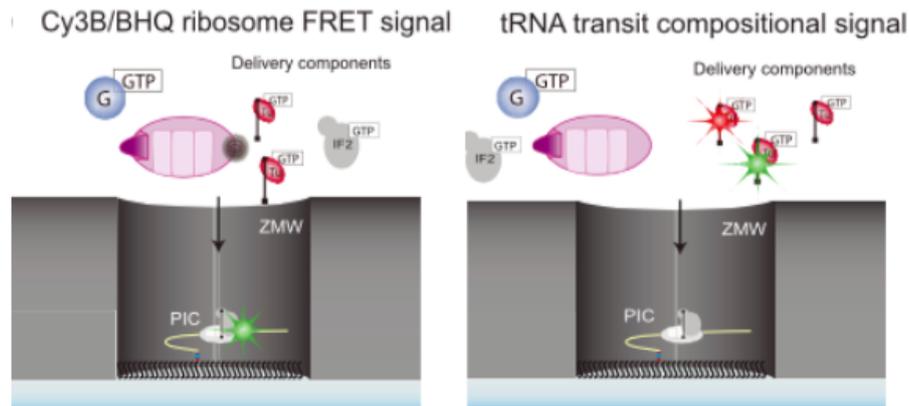


FIGURE 1.19 – Figure adaptée de [Chen 2014] illustrant les techniques utilisées, la stratégie de marquage et la nature des signaux étudiés. Gauche : la SU 30S est marquée spécifiquement avec Cy3 et la 50S avec un Black Hole Quencher (BHQ). Les positions des marqueurs sont contrôlées et telles que lorsque le ribosome 70S est formé, un signal de FRET est observable entre eux. Droite : ce sont les ARNt qui sont marqués (Cy3 ou Cy5 en fonction de l'ARNt).

On y retrouve en gris foncé l'architecture d'un ZWM dont la surface au fond est fonctionnalisée. On accroche un ARN messenger sur la surface sur lequel est déjà recruté le complexe de pré-initiation (PIC) comprenant principalement la sous-unité 30S et l'ARNt initiateur. Selon les expériences réalisées les auteurs veulent suivre le mouvement des sous-unités du ribosome 70S (figure de gauche) ou bien regarder la dynamique de transit des ARNt au sein du ribosome (figure de droite). Certains tests requierent d'observer ces deux signaux en parallèle. L'ensemble de ces signaux permet donc de suivre la dynamique du ribosome dans son ensemble à partir du moment où il s'initie sur l'ARN messenger.

Suivi du mouvement de cliquet du ribosome par FRET entre les deux sous-unités

Dans le cadre de l'étude présentée ici, le FRET est utilisé pour visualiser les mouvements de rotation de la grande sous-unité (SU) du ribosome par rapport à la petite. En effet, au début d'un cycle d'élongation, les deux SU sont dans une configuration dite décliquetée (cf. figure 1.6 page 8). Elles passent ensuite par une configuration encliquetée entre la formation de la liaison peptidique et la translocation pour revenir à la configuration décliquetée en entamant le cycle d'élongation suivant.

Pour suivre ce mouvement, les auteurs marquent en un endroit spécifique la petite sous-unité avec une molécule fluorescente Cy3 qui joue le rôle de donneur du couple FRET, et la grande sous-unité avec un BHQ, molécule inhibitrice de fluorescence, accepteur du couple.

1.3. Molécule unique et techniques complémentaires pour l'étude de la traduction

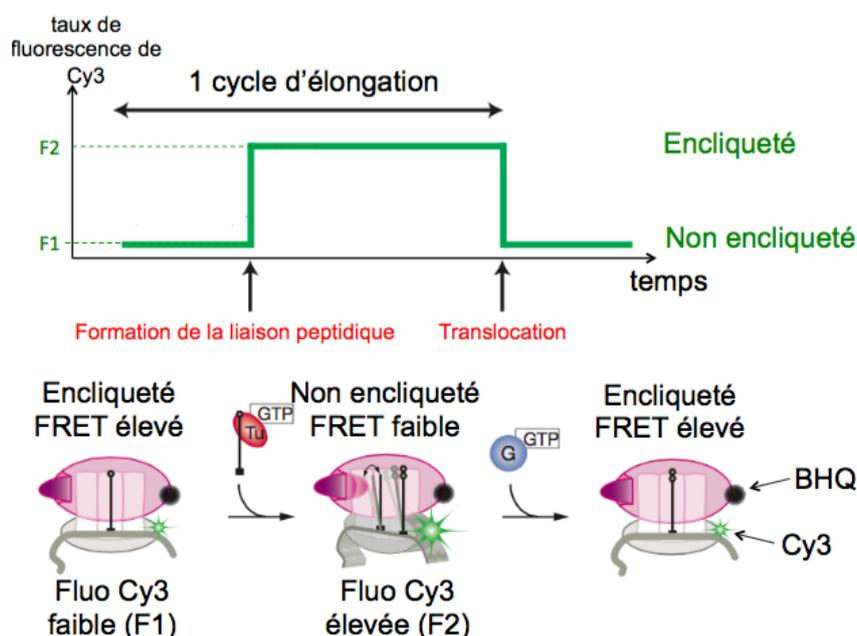


FIGURE 1.20 – Figure adaptée de [Chen 2014] décrivant le niveau de fluorescence du marqueur Cy3 de la petite SU en fonction de la conformation du ribosome 70S.

Au début du cycle, le ribosome est dans un état non encliqueté et les molécules du couple FRET sont très proches (cf. figure 1.20). Le donneur Cy3 transfère donc la majorité de son énergie à l'accepteur, et de son signal de fluorescence est faible (niveau de fluorescence F1 de Cy3 dans la figure 1.19). Au moment de la formation de la liaison peptidique, les SU passent dans l'état encliqueté. Les molécules du couple FRET s'éloignent, l'efficacité de FRET diminue et le signal de fluorescence du donneur augmente (niveau de fluorescence F2 de Cy3 dans la figure 1.20).

En résumé, l'état non encliqueté du ribosome correspond à un niveau de fluorescence faible du marqueur de la petite SU et l'état encliqueté (entre la formation de la liaison peptidique et la translocation) à un niveau de fluorescence élevé.

Les auteurs parviennent ainsi non seulement à identifier les changements de conformation du ribosome mais aussi à distinguer l'ensemble des cycles d'élongation du ribosome puisqu'à chaque cycle correspond un changement de conformation.

Frameshift et pause du ribosome Pour étudier spécifiquement la dynamique des ribosomes qui sont sujets au FS -1, les auteurs ont choisi d'utiliser la séquence dnaX de E.coli inductrice de FS. Cette séquence est illustrée sur la figure 1.21.a. On retrouve :

- la séquence Shine-Dalgarno interne surlignée en rouge. Cette séquence se situe après le codon d'initiation d'où l'intitulé interne, elle n'est pas impliquée dans l'initiation du ribosome mais joue le rôle de séquence inductrice de FS-1
- la séquence glissante A AAA AAG surlignée en vert au niveau des codons 6,7 et 8,
- un premier codon stop dans la phase de lecture -1 surligné en bleu clair,

Chapitre 1. La traduction eucaryote : entre biologie et physique : apports de la molécule unique pour l'étude d'un processus complexe

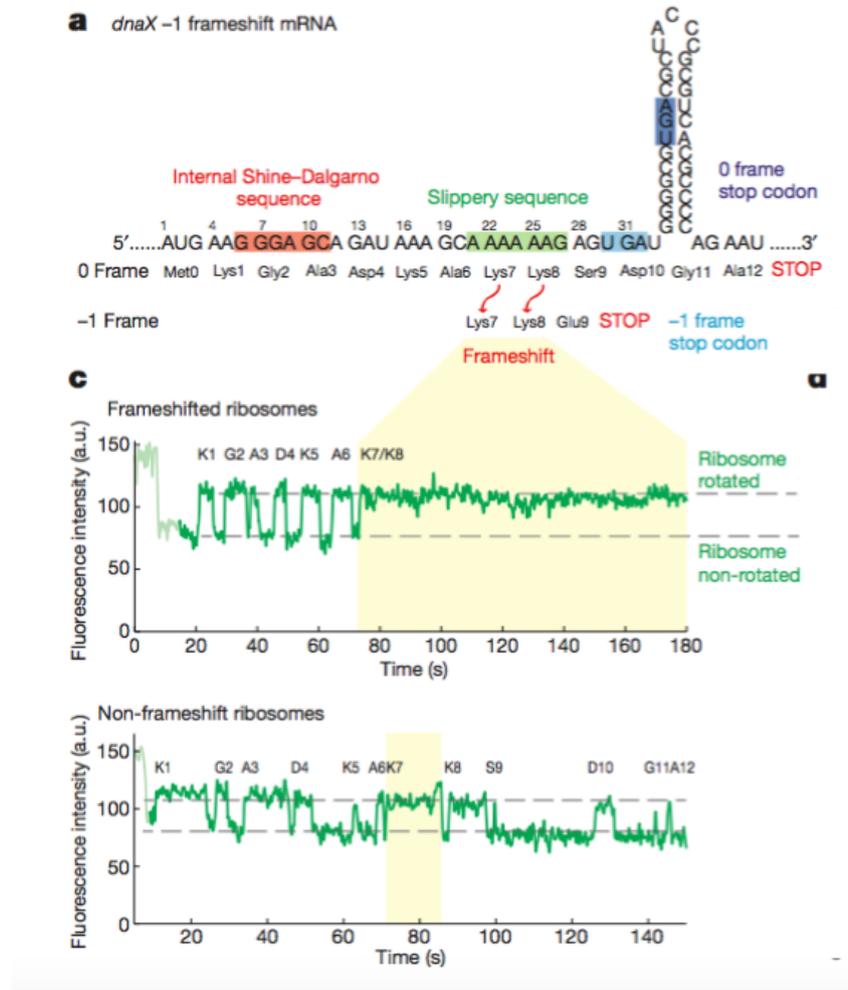


FIGURE 1.21 – Figure adaptée de [Chen 2014] illustrant la pause du ribosome dans un état encliqueté au niveau de la séquence glissante. (a) Séquence *dnaX* inductrice de FS -1 chez *E.coli*. On retrouve surlignée en rouge la séquence Shine-Dalgarno, en vert la séquence glissante et en bleu les codons stop dans les phases 0 et -1. La ligne du bas indique les acides aminés correspondant aux codons lus si le ribosome reste en phase, ou si il se décale. Ces acides aminés seront ensuite repérés par une unique lettre (K pour lysine, A pour Alanine, V pour Valine,...) et un numéro indiquant le numéro du codon (0 correspond au codon Start, puis K1 = premier codon lysine,...) (b) Signal de fluorescence du Cy3 marquant la petite SU reflétant les changements de conformation du ribosome (mouvement de cliquet) au cours des cycles d'élongation pour les ribosomes décalant leur phase de lecture.. (c) Idem pour les ribosomes qui ne se décalent pas.

- la structure tige-boucle située deux codons derrière la séquence glissante. Le second codon stop dans la phase normale de lecture (phase 0), surligné en bleu foncé, se situe dans la séquence de la tige-boucle.

La dynamique de traduction du ribosome est visible au travers de ses changements de conformation (cf. figure 1.21.b et c) marqués par une alternance entre deux niveaux de fluorescence

1.3. Molécule unique et techniques complémentaires pour l'étude de la traduction

(F1 et F2). Le niveau haut de fluorescence correspondant à un évènement de translocation dure en moyenne quelques secondes.

Arrivés au niveau des deux derniers codons de la séquence glissante codant tous deux pour une Lysine (codons K7 et K8), deux populations cinétiques se distinguent. Une première population pour laquelle le signal de fluorescence varie à l'identique des premiers cycles sur quelques secondes (figure 1.21.c). En revanche pour une autre population on constate que les ribosomes restent dans un état de conformation encliqueté pendant environ 100s (cf. partie en jaune sur la trace temporelle sur figure 1.21.b). Certains ribosomes effectuent donc une pause dans cette conformation, qui semble correspondre avec l'occurrence du FS -1. Les histogramme présentés sur la figure 1.22 identifient clairement les deux populations cinétiques.

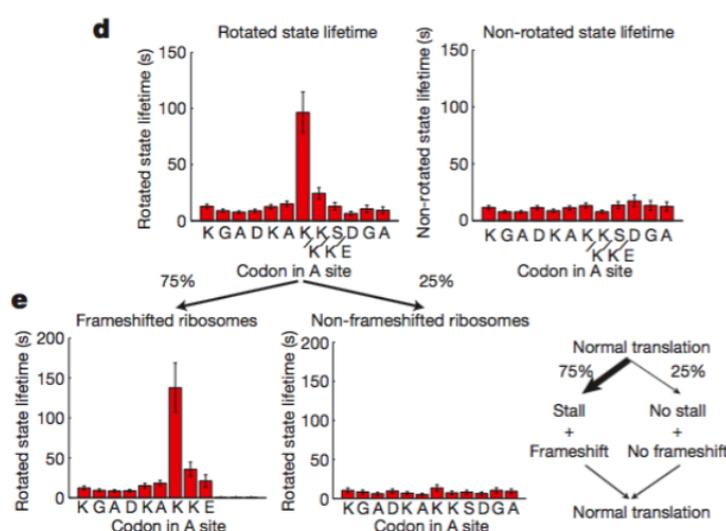


FIGURE 1.22 – Figure adaptée de [Chen 2014] illustrant les deux populations cinétiques mises en jeu dans l'étude du FS-1. (d) A gauche, histogramme de répartition du temps moyen passé par les ribosomes dans l'état encliqueté en fonction du codon traduit. A droite, idem pour l'état non-encliqueté. A ce stade, la distinction n'est pas faite entre les ribosomes qui se décalent et ceux qui restent en phase. (e) A gauche, histogramme de répartition du temps moyen passé dans l'état encliqueté pour les ribosomes qui se décalent. Au milieu, idem pour les ribosomes qui ne se décalent pas. A droite, schéma décrivant les étapes de traduction. Les premiers codons sont traduits normalement. Ensuite, 75% des ribosomes font une pause et décalent leur phase de lecture, tandis que 25% ne font pas de pause et restent en phase. Ensuite, une traduction normale reprend pour tous les ribosomes.

Les histogrammes représentent le temps moyen que le ribosome passe dans l'état encliqueté ou décliqueté en fonction du codon traduit. Il est aisément possible de reconnaître a posteriori la population des ribosomes qui se décalent du reste des ribosomes. En effet les ribosomes qui se décalent s'arrêtent au codon stop en phase -1, soit après avoir traduit 9 codons tandis que ceux qui ne sont pas sujets au FS-1 traduisent 12 codons avant de s'arrêter au niveau du stop dans la phase 0. Le nombre de cycles d'élongation effectués permet donc d'identifier à quelle population chaque ribosome appartient. Ainsi dans cette étude 75% des ribosomes sont sujets

Chapitre 1. La traduction eucaryote : entre biologie et physique : apports de la molécule unique pour l'étude d'un processus complexe

au FS-1 contre seulement 25% qui traduisent normalement. Il s'agit ici d'une haute efficacité de décalage de la phase de lecture.

Pour les deux populations, le temps passé par le ribosome dans l'état décliqueté est conservé. Ce n'est pas un élément cinétique distinctif. En revanche, on constate sur l'histogramme représentant le temps de vie de l'état encliqueté pour les deux populations de ribosomes (cf. figure 1.22.e) que la longue pause dans l'état encliqueté n'est présente que pour la population des ribosomes qui se décalent. C'est donc bien une particularité cinétique du phénomène de FS-1 qui caractérise l'interaction du ribosome avec les éléments inducteurs.

Suivi du signal de transit des ARN de transfert En parallèle du signal FRET, les auteurs s'intéressent aussi à l'évolution du signal de fluorescence de marqueurs cyanines associés à des ARN de transfert qui seront pris en charge par le ribosome pendant la traduction.

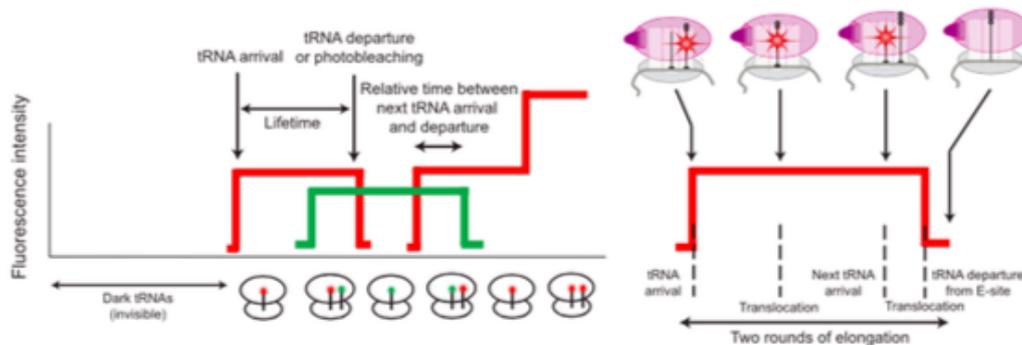


FIGURE 1.23 – Figure adaptée de [Chen 2014] montrant les signaux de fluorescence attendus lors des incorporations successives par le ribosome d'un ARNt marqué Cy5 (rouge), puis d'un ARNt Cy3 (vert) et enfin de 2 ARNt successifs marqués Cy5. Les étapes correspondantes du cycle d'élongation sont indiquées à droite.

On observe sur la figure 1.23 l'évolution du signal de fluorescence d'un ARNt couplé à une cyanine (en rouge) lorsqu'il transite dans les trois sites du ribosome. Lorsque l'ARNt est recruté on observe l'apparition du signal de fluorescence. Ce signal est stable pendant le transit de l'ARNt. Une fois qu'il est éjecté du site E, l'ARNt va sortir de la zone d'observation et le signal de fluorescence va disparaître. La perte du signal de fluorescence du fait du départ de l'ARNt du site E est en concurrence avec sa disparition par photoblanchiment¹¹.

Il est possible que deux ARNt marqués soient simultanément dans les sites A et P du ribosome (cf. figure 1.23, à gauche). Les ARNt ont été marqués selon leur nature soit avec une Cy3 soit avec une Cy5. Selon que l'on ait affaire à deux ARNt marqués par la même molécule (qui émet à la même longueur d'onde) ou bien à deux ARNt marqués différemment, l'évolution du signal n'est pas la même. Dans un cas on observe deux paliers, un premier lors de l'arrivée du premier ARNt et un second lors qu'arrive le second. Si les ARNt ne sont pas marqués par la même molécule, alors on observe deux signaux en parallèle à des longueurs d'onde différentes (mais colocalisés en seul endroit).

11. cf. chapitre 2, section 2.1.1.2 : Phénomène de photoblanchiment

1.3. Molécule unique et techniques complémentaires pour l'étude de la traduction

Découplage du mouvement des ARNt et des changements de conformation du ribosome au moment du décalage de la phase Pour établir le lien entre la pause du ribosome dans l'état encliqueté et l'occurrence du FS, les auteurs ont observé en parallèle le transit d'ARN de transfert suivant la méthodologie expliquée au paragraphe précédent. Plus précisément, ils utilisent des ARNt-Lys marqués Cy5 et des ARNt-Val marqués Cy3.

Les auteurs ont tout d'abord transcrit un ARNm légèrement différent de celui utilisé pour suivre la dynamique du ribosome au niveau de la séquence glissante : le codon GCA (pour l'Alanine A6) précédent la séquence glissante est muté en GUA codant pour une Valine (cf. figure 1.24a). Ainsi, autour de la séquence glissante, on a à la suite un codon Lys (noté K5 associé à un ARNt marqué Cy5) puis un codon Val (V6 : ARNt Cy3) puis deux codons Lys (K7 et K8 : Cy5). Les signaux de fluorescence mesurés correspondant au temps de résidence de chacun des ARNt sont représentés sous la séquence de l'ARNm.

Ils ont ainsi regardé le transit de l'ARNt portant un acide aminé Val (en mutant la séquence au niveau du codon qui précède la séquence glissante. GCA qui code pour une Alanine devient GUA et code pour une valine : Val comme visible sur la figure 1.4). La translocation de cet ARNt a lieu quand le ribosome arrive sur le codon AAA (K7) qui marque le début du temps de pause pour les ribosomes qui se décalent ainsi que l'incorporation d'un ARNt lysine appelé ici Lys7 au site A (7^{ème} lysine de la séquence d'acides aminés). Ce temps de pause est matérialisé par un fond jaune clair sur la figure 1.24.a.

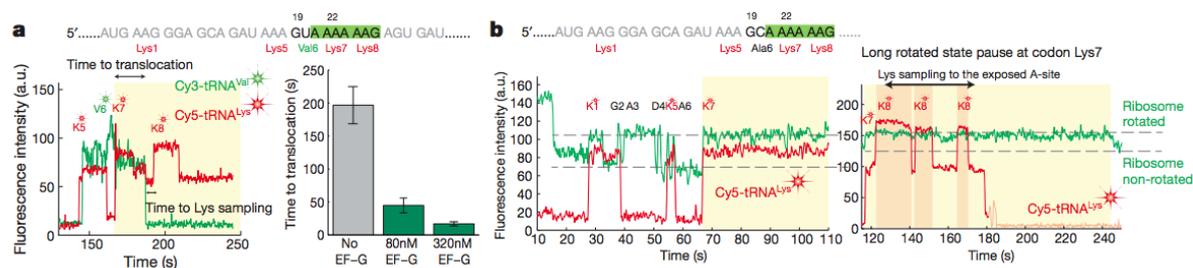


FIGURE 1.24 – Signaux de fluorescences des ARN de transfert qui transitent dans le ribosome. (a) Évolution du signal de fluorescence des ARNt marqués Cy3-tRNA-Val et Cy5-tRNA-Lys au cours du temps. Le premier signal apparaît lors de l'incorporation d'une valine au codon K5. Il est suivi de l'arrivée successive de deux ARNt codant pour une lysine correspondant aux codons K7 et K8. La zone jaune-orangée indique que le ribosome est alors dans un état encliqueté. A droite, histogramme représentant le temps associé à l'étape de translocation en fonction de la concentration en facteur d'élongation EF-G. (b) Signal de fluorescence associé au complexe Cy5-tRNA-Lys (courbe rouge) confronté au signal de FRET du changement de conformation du ribosome. Les variations successives et rapides du signal de fluorescence de l'ARNt au niveau du codon K8 traduisent le phénomène d'échantillonnage de celui-ci au site A.

On y voit particulièrement l'arrivée au codon V6 puis le départ de Cy3-ARNt-Val, et l'arrivée de Cy5-ARNt-Lys au codon K7. Cet événement marque le début de la pause du ribosome dans un état encliqueté long (typ. 138 s). Cette pause est indiquée par un rectangle jaune pâle sur la trace temporelle. L'intervalle de temps entre l'arrivée de l'ARNt-Lys sur K7 et le départ de l'ARNt-Val correspond au temps de translocation, soit typ. 45 s. On constate donc que la translocation et l'éjection de l'ARNt du site E durent beaucoup moins longtemps que la pause du ribosome

Chapitre 1. La traduction eucaryote : entre biologie et physique : apports de la molécule unique pour l'étude d'un processus complexe

dans l'état encliqueté. De plus, la translocation est d'autant plus courte que la concentration en EF-G, facteur d'élongation catalysant la translocation, est élevée (cf. histogramme figure 1.24a).

Normalement la translocation et le changement de conformation des SU du ribosomes sont des évènements couplés. Mais pendant le phénomène de FS les auteurs de cette étude observent un découplage entre la translocation et le mouvement de cliquet du ribosome qui se retrouve dans une conformation inhabituelle lorsque arrive l'ARN de transfert qui s'associe au codon Lys8. On est alors en présence d'un intermédiaire non-canonique de traduction où il y a une ARNt porteur de la chaîne polypeptidique dans le site P et un ribosome toujours dans un état encliqueté. Reste alors à déterminer si le site A est disponible pour accommoder un nouvel ARNt.

Les auteurs sont repartis de l'ARNm non muté (figure 1.24.b). Seuls les codons Lys sont alors associés à un ARNt fluorescent émettant dans le rouge. La voie verte est donc utilisable pour suivre les mouvements des SU du ribosome comme dans les premières expériences. On voit que le Cy5-ARNt-Lys s'associant au codon Lys8 n'est pas incorporé en une seule étape. On observe un phénomène dit d'échantillonnage. L'ARNt est partiellement incorporé puis rejeté 3 fois comme le montre la trace rouge sur la figure 1.24,b représentant la fluorescence de cet ARNt. On observe trois créneaux successifs correspondant à plusieurs tentatives d'incorporation de l'ARNt. De fait, 71% des ribosomes (soit la proportion de ribosomes décalant leur phase de lecture) présentent ce phénomène d'échantillonnage.

En observant la signal de fluorescence de l'ARN de transfert Cy3-ARNt-Val on constate que la translocation et l'éjection de l'ARNt du site E ont lieu rapidement, et le ribosome reste un long temps après cet évènement bloqué dans l'état encliqueté. On peut noter d'après l'histogramme représentant le temps de translocation en fonction de la concentration en facteur d'élongation EF-G que le temps de translocation varie drastiquement en fonction de cette concentration. En l'absence de EF-G, le temps de translocation est similaire à celui de la pause du ribosome (200s) alors qu'il est d'environ 20s pour une concentration de 320nM. EF-G joue un rôle essentiel de catalyseur de la translocation.

Normalement la translocation et le passage d'une conformation à l'autre sont des évènements couplés. Mais pendant le phénomène de FS les auteurs de cette étude observent un découplage entre la translocation et le mouvement de cliquet du ribosome qui se retrouve dans une conformation inhabituelle lorsqu'arrive l'ARN de transfert qui porte la lysine8. De ce fait on voit sur la figure 1.24,b que l'ARNt Lys8 n'est pas incorporé en une seule étape. On observe un phénomène dit d'échantillonnage. L'ARNt est partiellement incorporé puis rejeté 3 fois comme le montre la trace rouge sur la figure 1.24,b représentant la fluorescence de cet ARNt. On observe trois créneaux successifs correspondant à plusieurs tentatives d'incorporation de l'ARNt.

Bilan des conclusions de l'étude et établissement d'un modèle A partir de ces différentes observations, l'étude établit un modèle des mécanismes mis en jeu lorsqu'à lieu le décalage.

A l'approche de la séquence glissante et de la tige boucle, deux populations de ribosomes se distinguent. Une première population va traduire normalement cette séquence particulière sans modification de la cinétique par rapport aux codons précédents. Une seconde population de ribosomes effectue alors une longue pause (en moyenne 200s) dans l'état encliqueté.

La translocation des ARNt présents dans le site A et P a alors lieu de façon découplé du

1.3. Molécule unique et techniques complémentaires pour l'étude de la traduction

retour à un état non-encliqueté, catalysé par le facteur d'élongation EF-G. Après cette étape, la liaison codon-anticodon de l'ARNt présent au site P est rompue et le site A est vacant. Bien que le ribosome ne soit pas dans une conformation usuelle et favorable à l'incorporation d'un ARNt, celui-ci est tout de même incorporé (étape d'échantillonnage).

Mais à cette étape les liaisons codons-anticodons des ARNt en présence ne sont pas formées et le ribosome est dans une conformation non usuelles. C'est à ce moment là que le mécanisme de FS -1 peut avoir lieu, les deux ARNt se décalent d'un nucléotide dans le sens (-). Enfin EF-G catalyse la translocation et de fait le retour dans une conformation décliquetée, mais cette étape détermine irréversiblement la phase qui s'est instaurée.

1.3.4.2 Complémentarité avec les observations faite par une étude structurale par Cryo-EM

Comme nous l'avons déjà évoqué, les études cinétiques comme celle présentée ci-dessus apportent des observations très complémentaires d'autre techniques d'étude du ribosome et en particulier des études de structure par cryomicroscopie électronique (ou cryo-EM pour Cryo Electron Microscopy). La cryo-EM permet d'identifier et de cartographier avec une grande précision l'ensemble des acteurs de la traduction à un instant t dans un état donné ce qui permet de mettre au jour leurs interactions. Ces cartographies sont établies pour un grand nombre de ribosomes en parallèle qui sont figés dans différents états de réaction au moment où l'échantillon a été cryogénisé.

Il est très intéressant de comparer pour un évènement comme le FS -1 les mesures cinétiques discutées plus tôt avec des résultats d'une étude structurale par Cryo-EM qui va figer à un instant t un ensemble de sous-étapes du processus et va permettre de voir les mécanismes mis en jeu à l'échelle moléculaire. Ici, une étude qui éclaire les résultats précédemment décrits est celle de [Namy 2006]. Dans cette étude, les auteurs étudient des ribosomes en interaction avec un pseudonœud et isolent plusieurs intermédiaires de réaction représentés sur la figure 1.25.

En visualisant les structures de ces intermédiaires, les auteurs ont proposé un mécanisme d'interaction entre le ribosome et cette structure secondaire qui favorise l'occurrence du FS -1.

Interaction avec le pseudonœud (PK) Grâce à son site hélicase dans le tunnel d'entrée, le ribosome qui traduit la séquence inductrice commence à ouvrir le pseudonœud. Les auteurs identifient avec une résolution spatiale de l'ordre de 16 angströms plusieurs points d'interaction entre le site hélicase du ribosome et le PK et constatent que des incompatibilités stéréochimiques dans ces interactions font opposition à une ouverture efficace de la structure par le pseudonœud. Il existe donc des forces de tensions entre le ribosome et l'ARN messenger dans cette configuration.

Rôle du facteur d'élongation eEF2 Un autre intermédiaire identifié est celui d'un ribosome, toujours en interaction avec le PK, mais également avec le facteur d'élongation eEF2 eucaryote qui catalyse la translocation. Les cartographies indiquent que dans cet état le ribosome est soumis simultanément aux tensions créées avec l'ARN messenger et aux tensions provoquées par l'interaction avec le facteur qui pousse aux changements de conformation associés à la translocation (cf. figure 1.25). Sous ces tensions combinées, l'ARN de transfert au site P qui a une certaine plasticité se courbe et la liaison codon-anticodon est rompue. Alors que l'ARNt passe

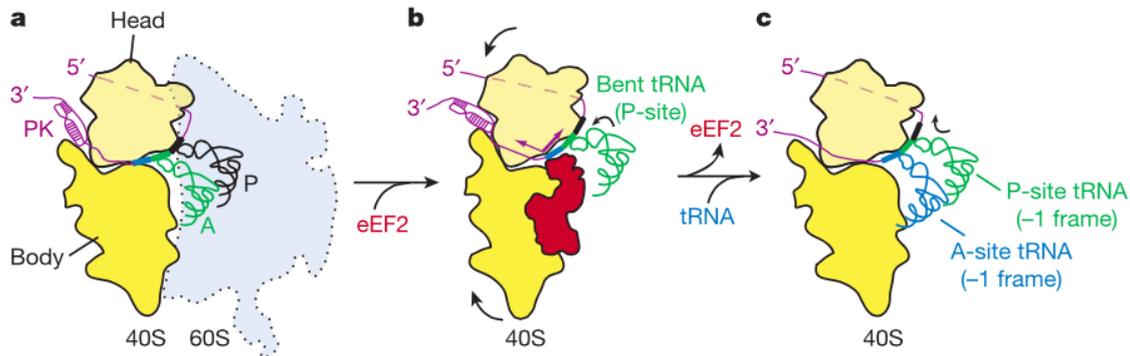


FIGURE 1.25 – Figure adaptée de [Namy 2006]. Schéma illustratif des interactions entre le ribosome et le peudonœud (PK) de l'ARNm IBV potentiellement responsable du FS-1. (a) Illustration de l'interaction des sous-unités 40S et 60S avec le pseudonœud d'IBV. (b) Illustration des mécanismes de tensions qui surviennent du fait de l'interaction avec le PK. Soumis à ces tensions dans deux directions (représentées par des flèches violettes), l'ARNt au site P a tendance à se distordre dans la direction de lecture. (c) Lors de la translocation catalysée par eEF2, la liaison codon-anticodon est rompue, et l'ARNt se relâchant de ses tensions précédentes tend à se décaler dans la direction opposée au sens de lecture, favorisant un nouveau cadre de lecture en -1.

du site P au site E et qu'un ARNt arrive au site A, les tensions appliquées à l'ARNt de transfert se relâchent, ce qui le pousse à se décaler d'un nucléotide dans la direction (-), provoquant ainsi le décalage de la phase de lecture.

Conclusions à la lumière de la comparaison avec [Chen 2014] L'ensemble du mécanisme proposé est cohérent avec celui proposé par [Chen 2014]. Il confirme d'abord le rôle primordial des facteurs d'élongation respectivement procaryote (EF-G) et eucaryote (eEF2) qui, en catalysant la translocation, jouent également un rôle d'établissement de la phase de lecture. L'étude structurale corrobore le fait que le frameshift ait lieu juste après la translocation, alors que le ribosome est bloqué dans un état intermédiaire non canonique du fait de son interaction avec la structure secondaire de l'ARNm. Plus précisément [Chen 2014, Namy 2006] affirment que le FS a lieu suite à l'incorporation de l'ARNt au site A (celui qui arrive pendant que le ribosome est dans un état encliqueté), alors que les liaisons codons-anticodons des deux ARNt ne sont pas formées. Le cycle de translocation suivant, catalysé par les facteurs d'élongation, met fin à la longue pause du ribosome dans l'état encliqueté et engage de façon irréversible le ribosome dans la phase de lecture -1.

1.3.5 Exemple d'étude de l'initiation IRES dépendante

La molécule unique a également contribué à éclaircir les mécanismes propres à l'initiation IRES dépendante. Nous présenterons ici un corpus de deux articles qui se sont intéressés à l'initiation par une IRES CrPV (IRES issue de Cricket Paralysis Virus) et ont montré que cette initiation impliquait des interactions fortes et dynamiques entre le ribosome et la structure IRES.

1.3. Molécule unique et techniques complémentaires pour l'étude de la traduction

1.3.5.1 Apports des études structurales

Comme dans le cas du FS -1, les études de structure ont apporté des éléments importants sur les mécanismes d'initiation des IRES, qui donnent de précieuses informations pour interpréter les mesures cinétiques. Dans le cas de l'IRES CrPV, les travaux de [Fernández 2014] qui utilisent la Cryo-EM proposent un modèle pour les deux premiers cycles d'élongation d'un ribosome initié par une IRES CrPV.

L'IRES CrPV est une IRES qui permet une initiation totalement indépendante de tout facteur externe. Pour cela, cette étude structurale a identifié que l'IRES CrPV a une interaction particulièrement forte avec le ribosome, notamment via un de ses pseudonœuds appelé domaine PKI qui interagit avec le site A du ribosome pour mimer partiellement la présence d'un ARN de transfert dans ce site (le PKI est illustré en vert sur la figure 1.26.B). Il faut a priori que ce domaine transite dans les sites du ribosome et soit expulsé comme un ARNt classique pour que la phase d'élongation canonique puisse commencer. La question que se posent les auteurs est de savoir comment se déroule le mouvement de cette première "translocation" particulière et si elle implique les mêmes acteurs qu'une translocation canonique lors de la phase d'élongation.

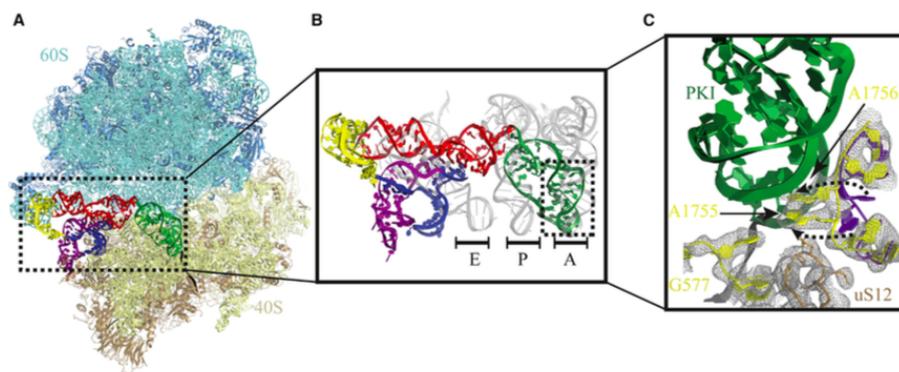


FIGURE 1.26 – Figure adaptée de [Fernández 2014]. Cartographie réalisée en Cryo-EM d'un ribosome en interaction avec l'IRES CrPV. (A) Cartographie générale du ribosome 80S initié sur l'IRES CrPV (B) Zoom sur la structure spatiale du domaine PKI (en vert) qui mime un ARNt initiateur au site A du ribosome. (C) Interactions spécifiques du domaine PKI avec le site A via différentes protéines ribosomales.

Un premier constat que révèlent les cartographies cryo-EM du ribosome 80S en interaction avec l'IRES CrPV est la présence de deux sous-populations de ribosomes. Une première, majoritaire, se trouve dans l'état encliqueté et une seconde dans un état décliqueté. Cette observation laisse penser que les ribosomes se trouvent impliqués dans un processus dynamique qui fait appel aux mêmes changements de conformation que l'étape de translocation dans un cycle d'élongation normal (illustrée sur la figure 1.27.A).

Pour vérifier si un cycle de translocation doit avoir lieu pour qu'un nouvel ARNt puisse être incorporé, Fernandez et al. ont préincubé le complexe ribosome-IRES avec des facteurs d'élongation eEF2 puis après rinçage, ils les ont mis en présence des complexes ternaires eEF1-ARNt-aa-GTP. Après vérification sur gel, ils ont observé que les complexes pré-incubés avec

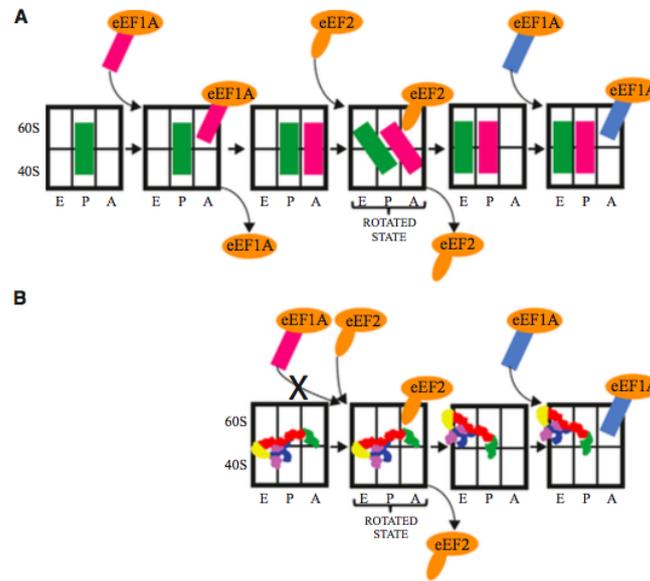


FIGURE 1.27 – Schéma illustratif du mécanisme du premier évènement de translocation lors de l'initiation par une IRES CrPV proposé par [Fernández 2014]. Seuls les 3 sites A,P et E du ribosome sont représentés. Les rectangles de couleur correspondent aux ARNt. (A) Cycle d'élongation normal. (B) Cycle non canonique correspondant au transit de l'IRES dans le ribosome. Comme dans un évènement de translocation classique, eEF2 catalyse le mouvement du domaine PKI du site A vers le site P, ce qui libère le site A pour l'incorporation d'un premier ARNt.

eEF2 avaient pu incorporer l'ARNt alors que ceux qui n'avaient pas été mis en présence du facteur d'élongation ne pouvaient pas incorporer l'ARNt. La déduction de cette expérience est que, comme pour un évènement de translocation lors de la phase d'élongation, **le mouvement du domaine PKI du site A au site P est catalysé par le facteur eEF2, et s'accompagne d'un changement de conformation du ribosome. On peut donc supposer qu'il s'agit bien d'un évènement de translocation qui présente toutes les caractéristiques de ceux observés pendant la phase d'élongation** (cf. figure 1.27).

Une interrogation est soulevée à la suite des conclusions de ces tests. eEF2 catalyse-t-il d'abord le mouvement du PKI avant que n'interviennent l'ARNt et le facteur eEF1, ou bien faut-il l'intervention de l'ensemble de ces facteurs simultanément pour qu'ait lieu la translocation ? En effet des travaux de toe-print [Pestova 2003, Jang 2010] ont indiqué que si l'on mettait le complexe 80S-IRES uniquement en présence de eEF2, la translocation n'était pas détectable par le biais de leur technique. [Fernández 2014] proposent l'hypothèse d'un état d'équilibre instable entre un état pré et post translocation en présence de eEF2 qui mènerait irréversiblement à un état de post-translocation grâce à l'intervention conjointe de l'ARNt et du facteur eEF1. Cet état intermédiaire instable ne serait pas détectable par toe-printing, car la région protégée par le ribosome reste la même malgré les changements de conformation. Nous présenterons dans un second temps une récente étude cinétique en molécule unique [Petrov 2016] qui s'est intéressée à la dynamique d'interaction entre l'IRES CrPV et le ribosome eucaryote et nous montrerons comment cette approche a apporté des éléments qui viennent conforter le modèle proposé par

1.3. Molécule unique et techniques complémentaires pour l'étude de la traduction

[Fernández 2014] et même répondre à l'interrogation posée sur le rôle du facteur eEF2 dans les premiers évènements de translocation.

1.3.5.2 Etude cinétique du recrutement du ribosome par une IRES CrPV

Les travaux de [Petrov 2016] se sont intéressés à l'initiation IRES dépendante et ont étudié la dynamique de la formation du complexe 80S-IRES-CrPV ainsi que celle du premier cycle d'élongation suivant l'initiation.

Principe de la mesure Ici aussi l'étude cinétique de l'initiation repose sur plusieurs stratégies de marquage en parallèle. Comme visible sur la figure 1.28, tous les acteurs essentiels impliqués dans l'initiation IRES dépendante ont été marqués. Les sous unités du ribosome sont marquées par la technique des ARN ribosomaux hybridés à des structures tiges boucles portant une cyanine. L'extrémité 3' de la structure IRES est également marquée par une cyanine couplée à un brin d'ADN complémentaire. Enfin les ARNt sont marqués pour que l'on puisse suivre leur transit durant les premiers cycles d'élongation. Ici les auteurs n'utilisent pas le FRET, ils observent simplement l'évolution du signal de fluorescence émis par les différents acteurs.

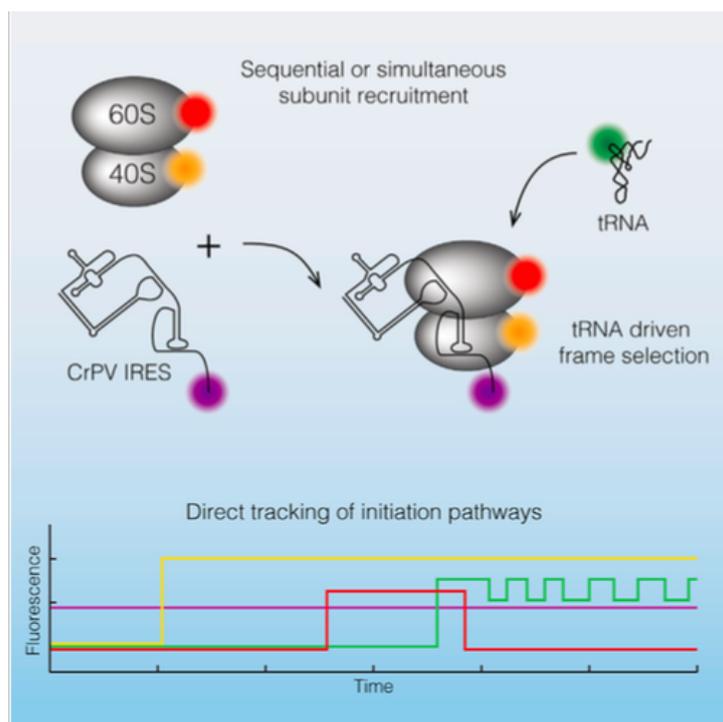


FIGURE 1.28 – Figure adaptée de [Petrov 2016]. Illustration du principe de la mesure de la cinétique de l'initiation IRES dépendante par microscopie de fluorescence en molécule unique.

L'ARN messager possédant une IRES CrPV est accroché spécifiquement en surface d'un Zero Mode Waveguide. Les autres éléments sont présents dans le milieu. Ici aussi l'utilisation d'un ZWM permet de travailler à des concentrations en ARNt, facteurs d'élongation, ribosomes,...

marqués importantes.

Recrutement des deux sous-unités La première dynamique observée est celle du recrutement des sous-unités 40S et 60S par l'IRES CrPV. Deux hypothèses sont envisageables : celle d'un recrutement séquentiel et celle d'un recrutement simultané. En réalité les deux cas sont observés, mais le recrutement séquentiel est prédominant dans l'ensemble des conditions expérimentales explorées¹². Les cinétiques d'association de la sous-unité 40S individuellement et de la sous-unité 60S sont présentées dans la figure 1.29. Elles correspondent à la distribution statistique d'un grand nombre de cinétiques individuelles.

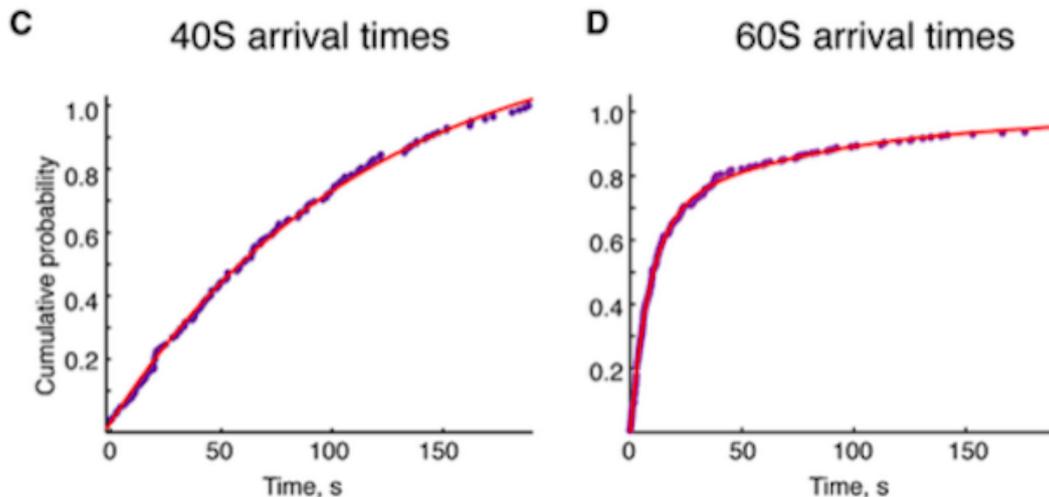


FIGURE 1.29 – Figure adaptée de [Petrov 2016]. Mesures de la cinétique d'association des complexes 40S :CrPV puis 40S :60S :CrPV.(C) Mesure de la cinétique d'association de la sous-unité 40S sur l'IRES CrPV. (D) Mesure de la cinétique d'association de la sous-unité 60S sur le complexe 40S :CrPV.

La cinétique d'association de la sous-unité 40S, illustrée sur la sous-figure 1.29.C, est lente avec un taux d'association de $0,07 \mu \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Mais une fois ce premier complexe formé, il est très stable (taux de dissociation mesuré à $0,002 \text{s}^{-1}$) et indissociable sur l'échelle de temps de l'initiation¹³. Par la suite, l'arrivée de la sous-unité 60S est environ 10 fois plus rapide que celle de la 40S, comme on peut le voir sur la sous-figure 1.29.D. Le complexe 80S-CrPV IRES ainsi formé est lui aussi stable sur l'échelle de temps considérée.

Définition de la phase de lecture et influence du facteur d'élongation eEF2 L'étude s'interroge aussi sur la dynamique du premier cycle d'élongation. [Fernández 2014] ont montré qu'il fallait un cycle de translocation pour que le site A soit disponible pour l'arrivée d'un ARNt. Mais cette étape a-t-elle la même cinétique qu'un cycle de translocation classique? Une autre question concerne la définition de la phase de lecture. Une proportion importante des ribosomes

12. 20% en moyenne de recrutement simultané, dépendant de la concentration en ions magnésiums.

13. La pérennité du signal de fluorescence émis par le complexe 40S :CrPV est limitée par le photoblanchiment des cyanines.

1.3. Molécule unique et techniques complémentaires pour l'étude de la traduction

ont été observés par [Fernández 2014] lorsqu'ils interagissent avec l'IRES dans un état encliqueté. Or, nous avons vu avec l'étude précédente [Chen 2014] du phénomène de FS-1 que cet état de conformation s'il est découplé de la translocation était propice à une indétermination de la phase.

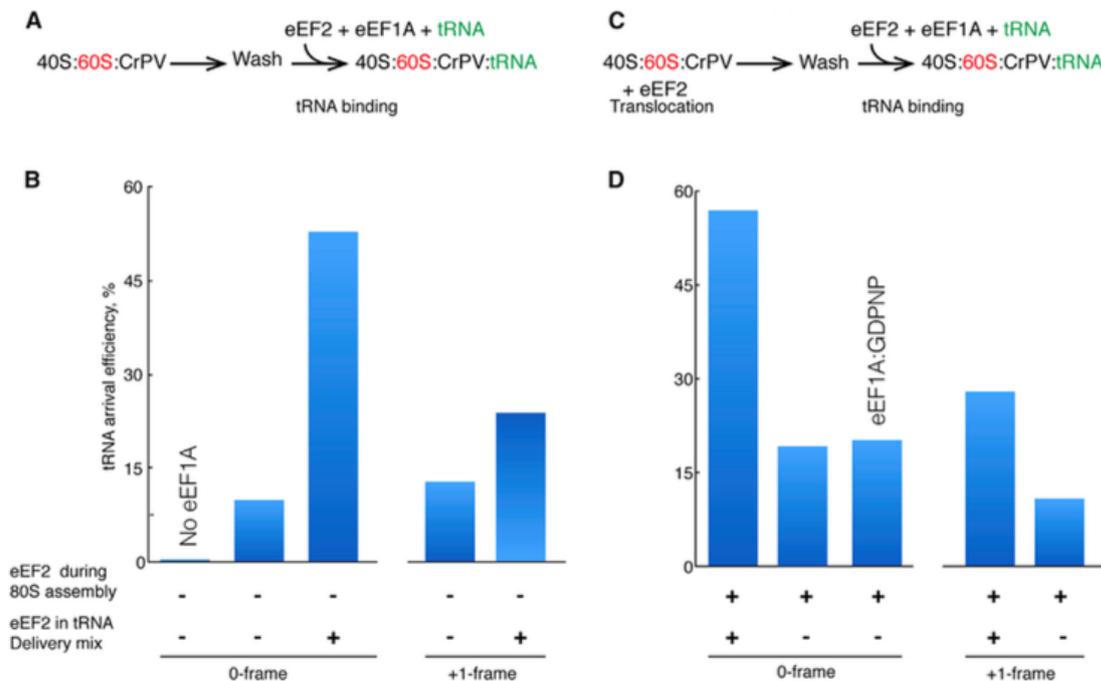


FIGURE 1.30 – Figure adaptée de [Petrov 2016]. Expérience de mesure du rôle du facteur d'élongation eEF2 durant le recrutement des sous-unités ribosomiques et les premiers cycles de translocation. eEF2 peut n'être introduit que lors du premier cycle d'élongation, avec l'ARNt et eEF1A (A) ou dès l'étape d'initiation du ribosome sur l'IRES (C). (B) et (D) Histogrammes représentant l'efficacité d'incorporation d'un ARNt au site A dans la phase 0 ou la phase +1 en fonction des conditions d'introduction de eEF2. Dans un cas, eEF1A n'est pas introduit. Dans un autre, un équivalent non hydrolysable de eEF1A-GTP, noté eEF1A-GDPNP, est utilisé. Figure adaptée de [Petrov 2016].

Pour élucider ces problématiques, les auteurs ont étudié la dynamique d'arrivée d'ARN de transfert correspondant respectivement à la phase 0 et +1 au site A du ribosome.

Précision du rôle de eEF2 dans la dynamique des premiers cycles de translocation

Quelle que soit la phase de lecture étudiée, des ARN de transfert sont incorporés au site A, mais l'efficacité d'incorporation ne sera pas la même. En moyenne, l'efficacité d'incorporation est deux fois moins importante pour la phase +1.

Pour autant, la nature de la phase n'est pas le facteur le plus déterminant pour l'efficacité d'incorporation d'un ARNt. La présence de facteurs d'élongation comme eEF1A et eEF2 est un paramètre plus critique à cet effet. Plusieurs conditions ont été testées en ce sens. Les résultats sont illustrés dans la figure 1.30.

Dans un premier cas, eEF2 est présent dès la phase de recrutement des sous-unités (à droite,

Chapitre 1. La traduction eucaryote : entre biologie et physique : apports de la molécule unique pour l'étude d'un processus complexe

sous figure 1.30.C.). Dans l'autre cas, eEF2 est introduit après le recrutement du ribosome 80S sur l'IRES (à gauche, sous-figure 1.30.A). D'autres conditions intermédiaires ont permis d'affiner les conclusions de ce test.

Dans tous les cas, le premier constat est que sans facteurs d'élongation, l'efficacité d'incorporation est faible voir nulle (si l'on ajoute pas le facteur eEF1A). Une autre condition qui limite l'efficacité de façon importante est l'absence de eEF2 au moment où sont délivrés les ARNt. En revanche dans l'autre sens, le fait de ne pas ajouter eEF2 au moment du recrutement des sous-unités n'a pas une action prédominante sur l'efficacité d'incorporation, mais il reste que l'efficacité maximale (58%) survient lorsque eEF2 est présent durant les deux étapes du processus. **La déduction faite de ces mesures est que le facteur eEF2 joue un rôle primordial pour une incorporation efficace du premier ARNt.** Comme le propose le modèle établi à partir des cartographies de Cryo-EM, eEF2 catalyse la translocation du domaine PKI du site A au site P, permettant de fait l'incorporation d'un nouvel ARNt au site A.

A partir de ce constat, l'étude s'interroge sur ce qui pourrait expliquer la nécessité de la présence constante de eEF2 pour qu'il y ait incorporation d'un ARNt de manière efficace. Deux hypothèses sont envisagées :

- L'existence d'un complexe instable entre les états post et pré translocation. eEF2 intervient alors pour déplacer l'équilibre vers un état stable post-translocation favorable à l'incorporation d'un ARNt. Cette hypothèse correspond à celle émise par [Fernández 2014] suite à leurs observations.
- Le premier cycle de translocation a lieu, catalysé par eEF2. A ce moment là, l'ARNt s'accroche de façon instable sur le ribosome et eEF2 catalyse le second cycle de translocation.

Pour déterminer laquelle de ces hypothèses est valide, les auteurs ont réalisé une expérience complémentaire. Ils ont préincubé les complexes avec eEF2 puis ont enlevé le facteur et ajouté un mélange contenant des complexes ternaires, eEF1 et GDPNP (un homologue non hydrolysable du GTP, un élément qui stabilise l'accroche de l'ARNt). Dans ces conditions (colonne (+;-)/eEF1A :GDPNP de la figure 1.30,D), ils ont observé que le taux d'incorporation des ARNt est comparable à celui observé lorsque l'on n'ajoute pas eEF2 en même temps que les ARNt, eEF1 et GTP (colonne (+;-) de la figure 1.30,D), soit 19%. Si la seconde hypothèse était juste, l'efficacité d'incorporation de l'ARNt devrait être élevée, similaire aux 58% observés dans la précédente expérience. **Aussi, l'obtention d'une faible efficacité d'incorporation est en faveur de la première hypothèse : l'existence d'un complexe 80S-IRES instable.**

Détermination de la phase lors de l'initiation Si l'on considère des configurations identiques et favorables (présence continue de eEF2) dans les tests présentés dans la figure 1.30, on constate tout de même une différence d'efficacité d'un facteur 2 d'incorporation entre la phase 0 et la phase +1. L'incorporation est deux fois plus efficace dans la phase 0. Cet effet est confirmé par la mesure du taux d'incorporation d'un ARN de transfert dans la phase 0 et la phase +1. Pour des concentrations identiques en eEF2 (200nM), le taux d'incorporation dans la phase 0 vaut $0,5\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ contre 0,03 pour la phase -1. **L'incorporation d'un ARN de transfert dans la phase -1 est donc nettement plus lent et cinétiquement défavorable, ce qui explique une moindre efficacité d'incorporation dans cette phase, et de fait son caractère minoritaire.** Une fois définie, la phase est conservée pendant les cycles d'élongation

1.3. Molécule unique et techniques complémentaires pour l'étude de la traduction

suivants.

Modèle cinétique L'ensemble du mécanisme cinétique décrit est résumé dans la figure 1.31 ci-dessous.

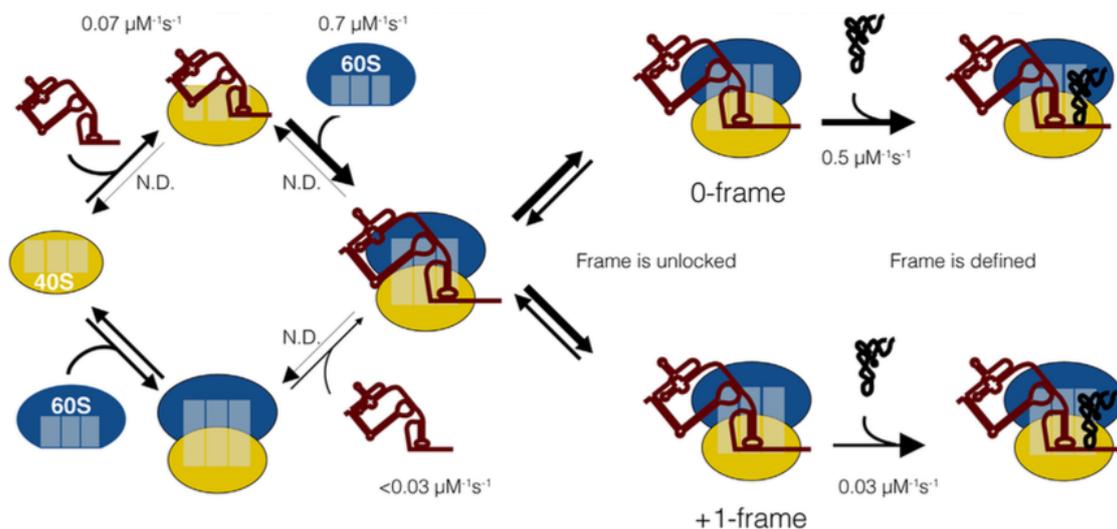


FIGURE 1.31 – Modèle cinétique proposé par [Petrov 2010] décrivant les principales étapes de l'initiation CrPV dépendante : 1. recrutement simultané ou séquentiel des deux sous-unités 2. premier cycle de translocation du domaine PKI, étape instable cinétiquement et réversible qui conduit à une indétermination de la phase à cette étape 3. Incorporation de l'ARNt au site A qui vient définir irrévérablement la phase de lecture.

Trois étapes cinétiques majeures ont été mises à jour dans ces travaux. **La première étape est l'étape de recrutement des sous-unités sur l'IRES CrPV.** Il existe deux voies en concurrence, le recrutement séquentiel et le recrutement simultané des deux sous-unités. Cinétiquement, le recrutement séquentiel est favorisé car plus rapide. **Une fois le complexe 80S-IRES formé, une seconde étape cinétique correspond au premier cycle de translocation du domaine PKI catalysé par eEF2.** Lors de cette étape le complexe oscille entre deux états de conformation du ribosome, ce qui, comme l'ont montré [Chen 2014] dans leur article sur le FS-1, favorise l'indétermination de la phase et de fait l'existence par la suite de deux phases de lecture 0 et +1. **Enfin l'action conjointe de eEF2 et du complexe ternaire (ARNt-eEF1-GTP) va catalyser le passage à un état post-translocation du ribosome puis l'incorporation efficace d'un ARNt.** Cette étape d'incorporation définit de façon irréversible la phase de lecture. L'incorporation dans la phase +1 est cinétiquement défavorable, ce qui explique que ce soit la phase minoritaire.

1.3.6 De l'in-vitro vers l'in-vivo : de nouvelles techniques d'étude en molécule unique

1.3.6.1 Une technique récente qui ouvre un nouveau champ de possibilités

Jusqu'à peu, une des limitations principales des techniques d'étude cinétique en molécule unique était la nécessité de travailler in-vitro dans des extraits cellulaires optimisés pour la traduction. Les articles présentés précédemment apportent des résultats très intéressants pour comprendre le fonctionnement du ribosome. Néanmoins, les conditions d'études, adaptées aux contraintes de la mesure et modulables, ne sont pas exactement identiques à celles des cellules in-vivo. La cellule est un milieu complexe, dans lequel il est difficile de modifier les concentrations en éléments impliqués dans le processus de traduction, et chaque cellule a ses propres particularités. Les systèmes de traduction in-vitro ne permettent d'explorer qu'un seul type de cellule eucaryote ou procaryote dans des conditions bien particulières. Mais de très récents articles [Wu 2016, Yan 2016, Morisaki 2016] ont fait la démonstration d'une méthode d'étude cinétique du ribosome in-vivo dans certaines cellules humaines (des neurones et des cellules cancéreuses des lignées HeLa et U2OS¹⁴). Ils combinent ainsi les avantages de la molécule unique avec la possibilité d'explorer le fonctionnement de la traduction pour différents ARNm et dans des conditions physiologiques par définition. Il m'importe de présenter un aperçu de ces travaux dans l'état de l'art car bien qu'ils aient été publiés à la fin de ma thèse, ils me semblent être incontournables en cela qu'ils constituent une perspective pour l'étude de la traduction en molécule unique.

Une technique de marquage astucieuse Nous avons déjà mentionné auparavant l'étude de [Katranidis 2009] où la vitesse de synthèse d'une protéine fluorescente unique était mesurée in vitro. On pourrait imaginer transposer directement cette méthode dans une cellule vivante pour faire la même mesure. Cependant, il est beaucoup plus dur de déterminer le début de la traduction in vivo, et la maturation du fluorophore est trop lente pour que la mesure de la vitesse de traduction soit fiable. Par ailleurs, le signal de fluorescence d'une protéine fluorescente individuelle est trop faible pour être détecté in vivo.

En 2016, quatre articles ont paru quasi simultanément. Chaque étude mesure la dynamique de traduction in vivo, et les méthodologies sont très similaires. D'un part, la protéine dont on suit la traduction à l'échelle individuelle est précédée d'une répétition de quelques dizaines d'épitopes qui, dès qu'ils sont traduits se lient à des anticorps produits par la cellule en fusion avec des protéines fluorescentes qui ont eu le temps de mûrir par ailleurs. Simultanément, les auteurs repèrent les ARNm avec des protéines elles aussi fluorescentes, qui se lient sur une répétition de structures introduites dans la partie 3' de l'ARNm non traduite (3'UTR). La multiplication du nombre de marqueurs sur l'ARNm et la protéine fraîchement traduite permet le repérage d'un système unique, malgré le fond de fluorescence intrinsèque de la cellule et le faible signal de chaque marqueur individuellement. La co-localisation des deux signaux permet de repérer les ARNm en cours de traduction, et l'intensité du signal des anticorps permet d'évaluer la vitesse de traduction de la protéine.

Prenons l'exemple de [Yan 2016]. Les auteurs ont transfecté la cellule avec deux rapporteurs. Le premier code pour un anticorps en fusion avec GFP (scFv-GFP). Le second, présenté sur la

14. respectivement cancer du col de l'utérus et sarcome osseux.

1.3. Molécule unique et techniques complémentaires pour l'étude de la traduction

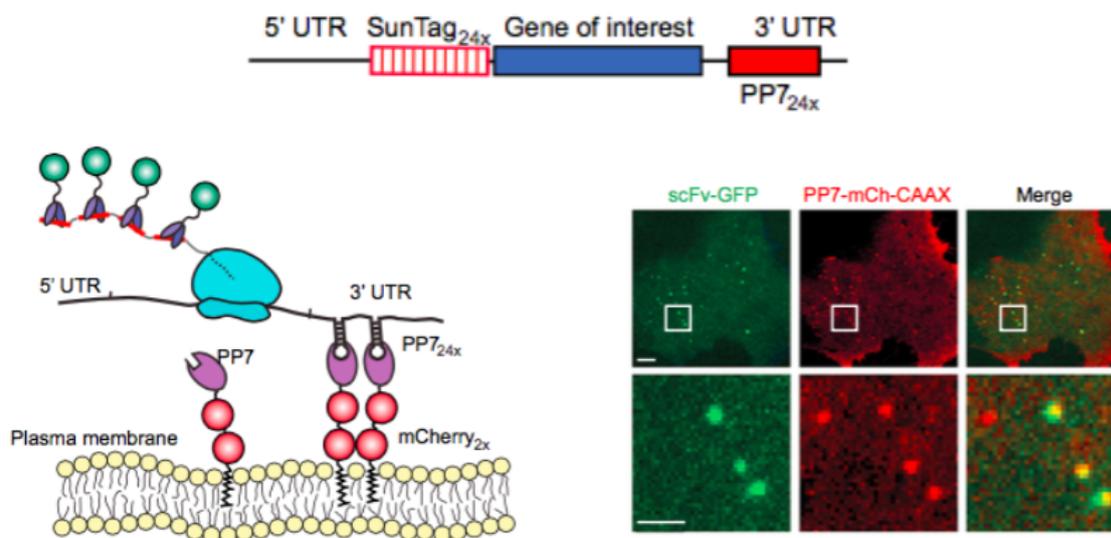


FIGURE 1.32 – Figure adaptée de [Yan 2016]. Illustration du principe de la technique de marquage SunTag et du principe de la mesure cinétique réalisée dans l'étude [Yan 2016]. Les ARN messagers d'intérêt sont spécifiquement accrochés à la membrane et marqués grâce à l'interaction entre les structures de la région 3'UTR avec des protéines marquées avec mCherry et s'accrochant à la membrane. La colocalisation du signal de traduction matérialisé par la détection des anticorps scFv-GFP se liant aux Sun-Tag avec le signal des protéines reconnaissant les tiges-boucles de la région 3'UTR de l'ARNm permet d'identifier sur les images de fluorescence (en bas à droite) des sites de traduction actifs.

figure 1.32, possède une séquence codant pour 24 peptides appelés SunTag suivie de la séquence codant pour le gène d'intérêt et d'une région non traduite (3'UTR) possédant 24 structures secondaires en tiges-boucles, reconnues par des protéines PP7¹⁵ marquées avec mCherry, une protéine fluorescente rouge. Les anticorps sc-Fv-GFP reconnaissent les SunTag. Ainsi au fur et à mesure que le ribosome traduit l'ARN messager, les anticorps viennent s'accrocher à la protéine en formation et on voit apparaître un signal de fluorescence spécifique à la traduction.

1.3.6.2 Mesurer une cinétique de traduction in-vivo

Selon les études, la traduction peut-être étudiée dans le volume de la cellule [Wu 2016, Morisaki 2016] ou bien les ARN messagers peuvent être immobilisés sur la membrane cellulaire [Yan 2016]. Si l'on observe l'ensemble de la cellule en volume, il faut suivre les ARNm qui diffusent rapidement. L'avantage est de pouvoir observer leur position spécifique et leur déplacement au sein de la cellule, ce qui donne des informations sur le mécanisme de traduction à l'échelle cellulaire. L'inconvénient est que la diffusion rapide ne permet pas une observation dans le temps long. En immobilisant les ARNm sur la membrane, l'équipe de [Yan 2016] peut

15. protéines PP7 de la capsid d'un bactériophage, exprimées par la cellule en fusion avec mCherry. Ces protéines sont connues pour interagir fortement avec les tiges-boucles de la région 3'UTR de l'autre rapporteur.

Chapitre 1. La traduction eucaryote : entre biologie et physique : apports de la molécule unique pour l'étude d'un processus complexe

observer la traduction pendant des dizaine de minutes. Nous nous intéresserons plus avant aux résultats de cette étude. Pour accrocher l'ARN messenger à la membrane, les auteurs utilisent un marqueur PP7-mCherry qui s'accroche d'un côté à la membrane et de l'autre spécifiquement à l'ARNm. La protéine mCherry est fluorescente. La détection des colocalisations entre les deux signaux sur les images de microscopie de fluorescence permet d'identifier les sites de traductions actifs. L'intensité du signal de fluorescence de la GFP peut-être relié via un traitement des image aux nombre d'anticorps en présence. Ici bien que l'on observe des ARN messagers individuels, plusieurs ribosomes traduisent l'ARNm les uns à la suite des autre¹⁶. L'intensité du signal de fluorescence dépend donc du nombre de ribosomes qui traduisent et de la vitesse moyenne de traduction. Pour mesurer une vitesse de traduction de ribosomes individuels, les auteurs utilisent un antibiotique qui bloque à un instant l'initiation des ribosomes sur l'ARNm. Ils observent alors un seul ribosome par ARNm en train de traduire et déduisent de l'évolution du signal de fluorescence de la GFP, la vitesse de traduction du ribosome. En moyennant sur l'ensemble des ARNm observés, les auteurs trouvent une vitesse de traduction moyenne in-vivo de $3,5 \pm 1,1$ codon/s.

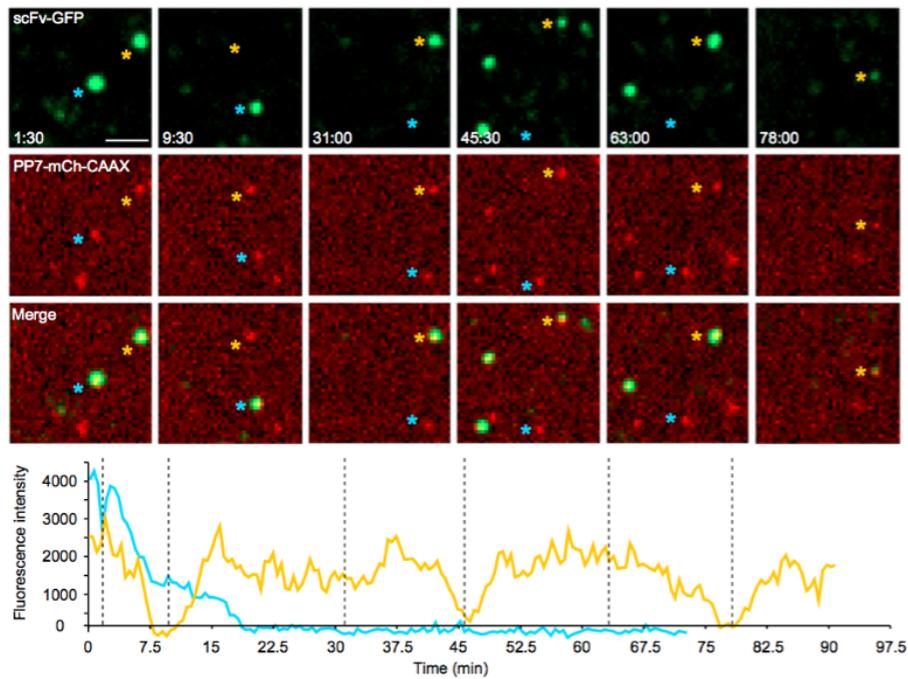


FIGURE 1.33 – Figure adaptée de [Yan 2016]. En haut, images de microscopie de fluorescence au cours du temps dans les différents canaux d'émission. On détecte deux sites de traduction marqués par une étoile bleue et jaune et l'on peut suivre leur évolution au cours du temps. En bas, cette évolution est retracée sous la forme de traces temporelle du signal de fluorescence associé à svFv-GFP pour chacun des ARNm repérés.

16. On parle alors de polysomes. Se référer à la section 1.1.3 de ce chapitre.

1.3. Molécule unique et techniques complémentaires pour l'étude de la traduction

Activation et désactivation de l'activité traductionnelle des ARNm En observant l'activité des ARN messagers accrochés à la membrane cellulaire pendant près d'une heure et demi, les auteurs ont pu entre autres mettre en évidence que la traduction d'un gène n'est pas un processus stable et linéaire dans le temps. Les traces temporelles représentant l'évolution du signal de fluorescence pour deux ARN messagers différents présentés sur la figure 1.33 montrent clairement ce comportement. La trace bleue relate l'évolution temporelle d'un ARNm qui après avoir été traduit activement pendant 10 min, voit son activité traductionnelle décroître jusqu'à devenir nulle avec un temps caractéristique de décroissance de quelques minutes (cf. figure 1.34). Ce phénomène appelé "shut-down" n'est pas nécessairement définitif. Sur la trace temporelle jaune, on constate qu'un autre ARNm connaît des phases de non activité et d'activité alternées. Les auteurs proposent que ce phénomène soit un mécanisme de régulation de l'expression d'un gène. Dans une des deux autres études publiées dans le même temps, les auteurs démontrent que

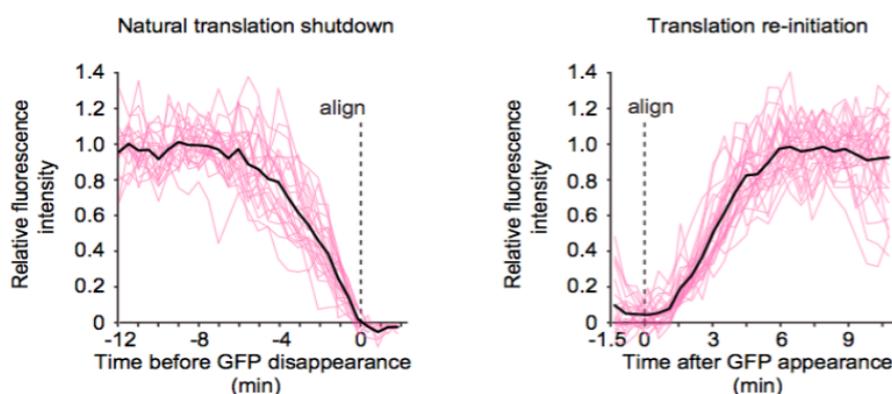


FIGURE 1.34 – Figure adaptée de [Yan 2016]. Traces temporelles moyennes (sur plusieurs dizaines de sites dont les cinétiques sont représentées en rose) illustrant les phénomènes d'extinction et de réapparition de la traduction. L'extinction est visualisée par une décroissance sur une échelle de plusieurs minutes de l'intensité de fluorescence de la GFP associée à un site de traduction. De même, on observe que la ré-apparition du signal de traduction a lieu sur une échelle de plusieurs minutes.

ce mécanisme de régulation probablement commun à tous les ARNm peut néanmoins avoir des caractéristiques spécifiques à un type de cellule et même à une localisation dans les cellules. Ainsi dans des cellules de neurones, les auteurs montrent une traduction favorisée dans les dendrites proximales et réprimées dans les dendrites distales [Wu 2016].

1.3.6.3 Quelques limitations

Les techniques de microscopie de fluorescence en molécule unique in-vivo sont très prometteuses, mais il existe tout de même des limitations à leur champ exploratoire. La première, due à la nature du marquage, est l'impossibilité de s'intéresser à l'initiation du ribosome. En effet, il faut d'abord que le ribosome traduise la séquence SunTag avant que l'on puisse mesurer sa cinétique de traduction (la séquence SunTag est toujours située avant le gène d'intérêt). Aussi, comme l'initiation a nécessairement lieu avant que le ribosome ne traduise cette fameuse sé-

Chapitre 1. La traduction eucaryote : entre biologie et physique : apports de la molécule unique pour l'étude d'un processus complexe

quence, on ne peut pas mesurer la cinétique associée à l'étape d'initiation. Cette technique n'est par exemple pas adaptée lorsque l'on considère des problématiques comme celle de la dynamique de l'initiation IRES dépendante.

On peut également noter qu'il est impossible avec ce type de marquage de distinguer des états intermédiaires de la traduction et des changements de conformation comme ceux observés grâce au FRET dans les travaux de [Chen 2014, Petrov 2016]. Dans le cas du marquage SunTag, on peut seulement mesurer l'évolution de l'intensité de fluorescence sur un site de traduction qui, ramené au nombre de codons traduits et au nombre de ribosomes présents sur l'ARNm, permet d'obtenir une estimation de la vitesse moyenne d'élongation du ribosome.

En réalité, les études in-vivo proposent aujourd'hui un point de vue original et plus global sur la cinétique de traduction à l'échelle cellulaire (traduction des ARNm sur le temps long, localisation de l'activité traductionnelle dans les cellules...), tandis que d'autres techniques de molécule unique comme celles présentées dans le début de cet état de l'art permettent d'entrer dans le détail des mécanismes et des étapes des différentes phases de la traduction. Elles seront de fait plus à même d'isoler des événements rares et non canoniques pour comprendre en détail leur fonctionnement et leur dynamique, tandis que les études in vivo sont pour l'instant plutôt axées sur l'étude de la régulation de la traduction.

1.4 Principe de notre mesure en molécule unique

Nous avons montré au travers de l'état de l'art toutes les potentialités qu'offrent les techniques de molécules uniques pour l'étude de la traduction à différentes étapes et à différentes échelles. C'est au cœur de ce champs de recherche dynamique que notre équipe a décidé d'inscrire son approche d'étude de la traduction eucaryote à l'échelle de la molécule unique par microscopie de fluorescence en réflexion totale. Comme nous avons pu l'illustrer, il n'existe pas une unique technique reine pour parvenir à cette fin et notre approche a évolué et évolue toujours en gardant à l'esprit les apports des différentes techniques qui ont été présentées dans ce chapitre.

Dans cette dernière section je présenterais les principaux enjeux et le principe de notre mesure de la cinétique de traduction en molécule unique. Je présenterais en particulier le système biologique rapporteur utilisé pour notre étude.

1.4.1 Enjeux de la mesure

Nous avons choisi de caractériser la dynamique de traduction de ribosomes mammifères individuels par une technique de microscopie de fluorescence à l'échelle de la molécule unique. Notre étude se base sur trois objectifs majeurs qui ont guidé le déroulement de mon projet de thèse :

- parvenir à mesurer la vitesse d'élongation d'un **ribosome eucaryote individuel**¹⁷ et

17. Au moment où j'ai initié mon projet de thèse, les études cinétiques se concentraient surtout sur l'étude du ribosome procaryote, que l'on savait purifier et marquer à partir d'extraits cellulaires. L'étude de la cinétique du ribosome eucaryote restait encore peu explorée, les expériences in vitro étant plus complexes à mettre en œuvre. Nous avons pris le parti de nous intéresser aux ribosomes mammifères pour avoir un système rapporteur présentant des similarités avec le système de traduction humain.

1.4. Principe de notre mesure en molécule unique

pour l'ensemble d'une population de ribosomes, parvenir à tracer la **distribution statistique** des vitesses d'élongation,

- caractériser le comportement cinétique de ribosomes engagés dans des **processus non canoniques** tels que l'initiation par une IRES virale ou le décalage de la phase de lecture en -1,
- respecter autant que possible un critère **d'intégrité biologique** de notre système in-vitro pour s'approcher au maximum des **conditions de traduction physiologiques**.

A partir de ces objectifs, ont été imaginés et mis en œuvre une expérience de mesure cinétique et un système traductionnel rapporteur. Nous décrirons ici ce système et le principe de notre expérience de mesure de la cinétique du ribosome mammifère sur plusieurs cycles d'élongations.

1.4.2 Définition du système biologique rapporteur

Nous avons conçu un système biologique rapporteur qui prend en compte les enjeux de la technique de microscopie choisie ainsi que ceux imposés par notre problématique biologique. Nos systèmes biologiques ont évolué durant ma thèse au fur et à mesure que nous posions de nouvelles interrogations biologiques ou que nous explorions de nouvelles pistes pour optimiser nos expériences. Nous présenterons dans cette partie le système rapporteur conçu au cours des thèses qui ont précédé la mienne, et qui a servi de base au développement de tous les autres.

1.4.2.1 Intégrité biologique du système : un enjeu essentiel

L'intégrité biologique du système traductionnel est un enjeu qui a guidé en permanence nos choix pour concevoir et faire évoluer les systèmes rapporteurs. Nous souhaitons modifier le moins possible notre système pour que les résultats biologiques de notre études soient les plus pertinents possible au regard de ce qui se passe in-vivo pour un organisme mammifère. Ainsi seul l'ARN messager sera marqué par des sondes fluorescentes puisque la microscopie de fluorescence requiert le marquage de nos systèmes biologiques. Les ribosomes ainsi que tous les facteurs impliqués dans la traduction sont issus du lysat de réticulocyte de lapin (RRL) et ne sont pas marqués ou chimiquement modifiés.

1.4.2.2 Description de l'ARN messager

L'ARNm est la base de notre système rapporteur. Le design de ces ARNm est décidé en étroite collaboration avec l'équipe de biologistes de l'I2BC. Nous produisons ces ARNm à l'I2BC par des techniques de biologie moléculaire (décrites en annexe 2). Il est important de noter que ces techniques permettent une grande modulabilité de la séquence mais sont coûteuses en temps. Chaque modification de l'ARNm est un choix pris consciencieusement. L'ARNm rapporteur a plusieurs éléments constitutifs caractéristiques (cf. figure 1.35).

D'abord, à l'extrémité 5' de l'ARNm, peut s'hybrider un oligonucléotide comprenant 6 biotines appelé RNOB. Il assure une fixation stable de l'ARNm aux sites d'accroche de la surface. Plus en aval, on a inséré une structure secondaire IRES CrPV. Le ribosome se complexe sur cette IRES sans l'intervention d'aucun facteur d'initiation et sans la coiffe. C'est donc une manière

Chapitre 1. La traduction eucaryote : entre biologie et physique : apports de la molécule unique pour l'étude d'un processus complexe

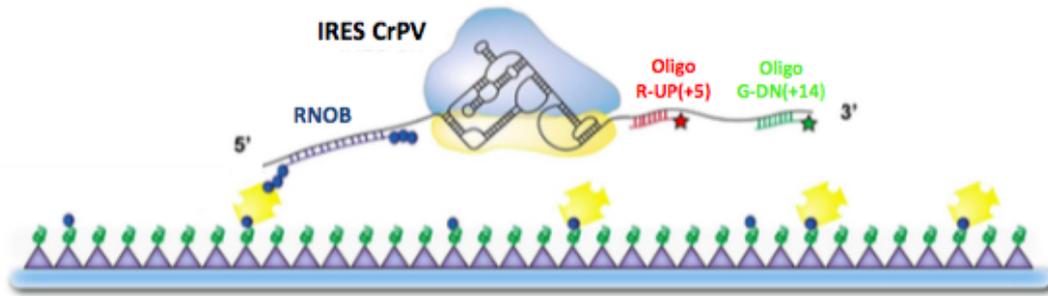


FIGURE 1.35 – Système rapporteur de référence pour l'étude de la traduction eucaryote en molécule unique.

d'initier la traduction sans avoir à purifier séparément les nombreux facteurs impliqués dans l'initiation eucaryote.

Enfin deux oligo-fluorophores sont hybridés à l'ARNm pour le rendre visible en microscopie de fluorescence. Le premier oligonucléotide couplé avec un fluorophore, appelé UP par la suite, peut s'hybrider à l'ARNm quelques codons après la structure IRES. L'oligonucléotide est une séquence ARN complémentaire l'ARN messenger, il vient donc former avec celui-ci une séquence double-brin stable bien que la liaison soit non-covalente. Le second oligonucléotide (appelé DOWN) est hybridé plus loin sur l'ARNm.

Plusieurs systèmes rapporteurs différents seront présentés tout au long de ce manuscrit. Nous avons donc défini une nomenclature normalisée pour ces systèmes. Ces ARNm possèdent une structure IRES en 5', puis 2 séquences sur lesquelles peuvent s'hybrider les jalons UP et DOWN. Nous repérons la position de ces séquences par le nombre de codons entre l'extrémité de l'empreinte du ribosome lorsque celui-ci est initié sur l'IRES et le début (côté 5') de la séquence d'un jalon (cf. figure 1.36). Par exemple, l'ARNm représenté sur la figure 1.36 est noté CrPV-UP(+2)-DN(+11) car il a une IRES CrPV et il y a 2 (resp. 11) codons entre le ribosome initié et le début de la séquence sur laquelle s'hybride le jalon UP (resp. DN).



FIGURE 1.36 – Hybridation des oligo-fluorophores sur l'ARN messenger.

On injecte initialement dans la cellule micro-fluidique une solution contenant les systèmes rapporteurs à une concentration très faible (de l'ordre du nM). C'est une condition nécessaire

1.4. Principe de notre mesure en molécule unique

pour s'assurer que l'on travaille bien à l'échelle de la molécule unique. En effet les sites d'accroche sur la surface sont suffisamment nombreux pour que la surface soit entièrement recouverte si la concentration en systèmes rapporteurs est trop élevée. Pour s'assurer que l'on est en molécule unique on considère que sur une zone d'observation, le nombre de systèmes étudié ne doit pas excéder 2000 observés en parallèle. On nommera par la suite "couverture", le nombre de systèmes biologiques présents sur une zone d'observation. Sur un échantillon, des milliers de systèmes tels que celui décrit ci-dessus sont ainsi accrochés de manière stable et spécifique.

1.4.3 Principe de la mesure cinétique

Le système rapporteur a été conçu pour mesurer la vitesse d'élongation du ribosome eucaryote. Les ribosomes pré-attachés à l'IRES vont commencer la traduction au moment où l'on injecte dans l'échantillon un extrait cellulaire, le lysat de réticulocyte de lapin (RRL). Cet extrait apporte les ARNt, les facteurs d'élongation et l'énergie nécessaire au ribosome pour fonctionner efficacement. On commence l'acquisition du signal de fluorescence de façon synchronisée avec l'injection du RRL, qui correspond à notre temps initial t_0 . Le ribosome va alors traduire l'ARN messenger codon par codon jusqu'à arriver au premier jalon fluorescent. Pour le système rapporteur décrit plus haut, l'extrémité du ribosome atteint le premier jalon 2 cycles après avoir fait sortir l'IRES du site A, comme visible sur la figure 1.36.

Le ribosome est alors capable d'ouvrir le double-brin formé par l'ARNm et l'oligonucléotide grâce à une activité hélicase. Il s'agit de la capacité du ribosome à ouvrir les séquences double-brins de l'ARNm afin de traduire la séquence. Le choix initial de la séquence des oligonucléotides a été fait en considérant l'article qui décrit l'activité hélicase [Takyar 2005]. Ces travaux indiquent que le ribosome est en mesure d'ouvrir ces structures liées par de simples liaisons hydrogènes, sans grand impact sur son activité traductionnelle et sa cinétique.

Après 3 cycles d'élongation supplémentaires, et donc d'ouverture progressive du double-brin ARNm/jalon, l'appariement entre ces deux derniers est complètement déstabilisé. Le jalon se détache de l'ARN messenger et diffuse instantanément hors de l'onde évanescente. On perd à cet instant t_1 le signal de fluorescence du premier jalon. 9 codons plus tard le ribosome va détacher de la manière la deuxième jalon fluorescent au temps t_2 . Connaissant le nombre de codons N_c entre les deux jalons, on est donc en mesure de remonter au temps caractéristique d'élongation en s/codons par la simple relation :

$$t_{el} = \frac{\Delta t}{N_c} = \frac{(t_2 - t_1)}{N_c} \quad (1.1)$$

Etant donné que l'on connaît le temps t_0 correspondant au début de la traduction pour tous les ribosomes, on peut également s'intéresser à la cinétique de départ de chaque jalon individuellement. Dans ce cas le temps mesuré est représentatif à la fois de la cinétique d'élongation mais aussi de celle propre à l'initiation IRES dépendante comme nous le montrerons au chapitre 4. Ces mesures cinétiques peuvent être réalisées pour l'ensemble des systèmes observés en parallèle sur un échantillon. On pourra de fait non seulement accéder à la mesure de la vitesse moyenne du ribosome mais aussi réaliser une mesure statistique et tracer la distribution de la cinétique.

De la même façon que pour les ARNm, nous avons choisi une nomenclature pour les oligofluorophores cohérente avec le principe de la mesure cinétique. En 5' du jalon fluorescent, se

Chapitre 1. La traduction eucaryote : entre biologie et physique : apports de la molécule unique pour l'étude d'un processus complexe

trouve le fluorophore. Le nom du jalon commencera donc par le code du fluorophore. Ensuite, on lui donne le nom de la séquence sur laquelle il s'hybride (UP ou DN) suivi du nombre de nucléotides appariés. Finalement, on indique entre parenthèses le nombre de cycles d'élongation que le ribosome devra effectuer avant de détacher le jalon. Ce nombre dépend non seulement de la position de la séquence complémentaire sur l'ARNm mais aussi de la longueur du brin hybridé. Par exemple, sur la figure 1.35, les jalons sont respectivement ATR-UP12-(+5) et ATG-DN12-(+14). Les marqueurs sont donc un ATTO émettant dans le rouge (ATR) ou le vert (ATV), chaque jalon a 12 nucléotides appariés, et il faut 5 cycles d'élongation pour détacher le UP, et 14 (en tout) pour détacher le DN. Notez que la position du jalon UP est notée (+2) pour l'ARNm, car le début de l'appariement est 2 codons derrière l'empreinte du ribosome, mais le ribosome doit parcourir 3 codons supplémentaires pour ouvrir et donc déstabiliser suffisamment le duplex pour que le jalon parte.