

Efficacité de traduction et structures

IRES

Sommaire

5.1	Stratégies de maximisation de l'efficacité de traduction	133
5.1.1	Par quels biais agir sur l'efficacité de traduction ?	133
5.1.2	Test de différentes stratégies d'optimisation	135
5.1.3	Conclusions et validation d'une approche pour une traduction efficace	140
5.2	Etude comparative de différentes IRES virales	140
5.2.1	Critère de sélection d'une troisième IRES virale : Etudes biochimiques de l'efficacité d'initiation dans le RRL	141
5.2.2	Mesures cinétiques comparatives en molécules uniques des IRES CrPV, HCV et EMCV	144
5.3	Conclusion	151

5.1 Stratégies de maximisation de l'efficacité de traduction

Face au constat de la faible efficacité des ribosomes du RRL, nous avons cherché en priorité des stratégies visant à augmenter cette efficacité. Plusieurs approches étaient envisageables, nous avons essayé d'identifier les paramètres qui peuvent être corrélés à l'efficacité de reconnaissance et de traduction. Nous présenterons les paramètres identifiés à cette intention ainsi que les différents tests qui ont été réalisés en conséquences, afin de conclure sur une solution viable.

5.1.1 Par quels biais agir sur l'efficacité de traduction ?

Quels sont les paramètres essentiels qui influent sur l'efficacité de reconnaissance et de traduction ? Au vu des premières expériences réalisées avec les ribosomes pré-incubés, nous faisons l'hypothèse que la faible efficacité mesurée sur l'IRES CrPV avec uniquement les ribosomes du RRL n'est pas due à une faible efficacité de traduction des ribosomes lorsqu'ils sont engagés sur l'ARNm. En effet, en les pré-incubant, on mesure une efficacité globale de 50%. Les ribosomes sont donc en mesure de traduire l'ARNm et de détacher les marqueurs fluorescents. Il est plus probable que l'étape limitante soit le recrutement par la structure virale IRES.

Pour identifier la cause exacte, il est nécessaire de revenir aux éléments qui constituent notre système rapporteur :

- l'ARN messenger,

- les sondes fluorescentes,
- la structure IRES.

S'ajoute à ces éléments l'extrait cellulaire qui contient les ARN de transfert, de nombreux facteurs (facteurs d'élongation, facteurs de terminaison...) et les ribosomes endogènes qui sont ici les principaux acteurs du processus. On ne peut pas agir sur l'ensemble de ces éléments. Nous souhaitons modifier le moins possible l'extrait cellulaire pour travailler dans des conditions plus physiologiques. Les sondes fluorescentes ont peu de risque d'avoir un impact sur l'efficacité d'initiation du ribosome (T_m assez faible). Il nous reste alors deux possibilités : modifier l'ARN messager ou modifier la structure IRES dans l'espoir d'obtenir une initiation plus efficace.

Concernant l'ARN messager, une cause hypothétique de la faible efficacité d'accroche et de traduction réside dans le fait que l'ARN messager est accroché en 5' à une très faible distance de la surface fonctionnalisée, à peine quelques nm. La surface est recouverte par des molécules de PEG qui forment une couche homogène. **On peut imaginer que la proximité du site d'initiation avec les molécules qui recouvrent la surface peut engendrer une gêne stérique pour les sous-unités de ribosome et empêcher leur recrutement efficace sur l'IRES.**

Pour ce qui est de l'autre hypothèse qui fait appel à la nature de la structure IRES elle-même, il est possible que toutes les IRES n'aient pas la même efficacité de recrutement du ribosome dans l'extrait cellulaire considéré. Quand les ribosomes sont pré-incubés, le problème est différent. On maîtrise la nature et la concentration des différents facteurs et on peut optimiser le recrutement du ribosome. Mais lorsque l'on travaille avec les ribosomes du RRL, l'efficacité de recrutement par l'IRES est un facteur à prendre en compte. Cette efficacité peut résulter à la fois des différences structurales et fonctionnelles des IRES, mais aussi de leur fonctionnement dans un environnement précis avec des concentrations en facteurs d'initiation et d'élongation fixes comme dans le RRL.

De plus les travaux de [Pestova 2004] sur l'IRES CrPV stipulent que le recrutement des sous-unités 40S et 60S par cette IRES est inhibé lors de tests *in vitro* par la présence des facteurs d'initiation (eIF1, eIF1A et eIF3). *In vivo*, dans le cadre d'une infection virale, des mécanismes complémentaires sont mis en œuvre par le virus pour inactiver les facteurs d'initiation qui peuvent jouer un rôle d'inhibition, mais dans un contexte *in vitro* où l'IRES est isolée du reste du génome du virus, ces mécanismes n'ont pas lieu. Le RRL étant optimisé pour l'initiation canonique, il contient l'ensemble des facteurs d'initiation cités. **Il est donc possible que l'action de ces facteurs inhibe le recrutement du ribosome sur l'IRES CrPV dans le RRL.**

Pour résoudre la problématique de l'efficacité d'initiation, nous avons dans un premier temps favorisé la première hypothèse regardant l'accroche et le design de l'ARNm. La gêne stérique nous semblait la cause la plus probable de la faible efficacité d'initiation et la mise en œuvre d'une stratégie d'optimisation demandait moins de modifications de notre protocole expérimental. Les résultats de ces premiers tests sont exposés dans la section qui suit.

5.1. Stratégies de maximisation de l'efficacité de traduction

5.1.2 Test de différentes stratégies d'optimisation

5.1.2.1 Nouveau design de l'ARN messager

Notre première tentative a porté sur la modification de la séquence de l'ARN messager pour essayer d'éloigner le site d'initiation IRES de la surface fonctionnalisée. Pour cela une séquence d'espacement a été ajoutée entre le site d'accroche et l'IRES CrPV comme visible sur la figure 5.1. Cette séquence est suffisamment longue pour dégager l'espace autour de l'IRES CrPV afin d'assurer un recrutement plus aisé du ribosome. La nomenclature des ARNm porteurs de cette séquence commencera par la lettre S devant le nom de l'IRES (ex : S-CrPV-UP(+2)-DOWN(+18)).

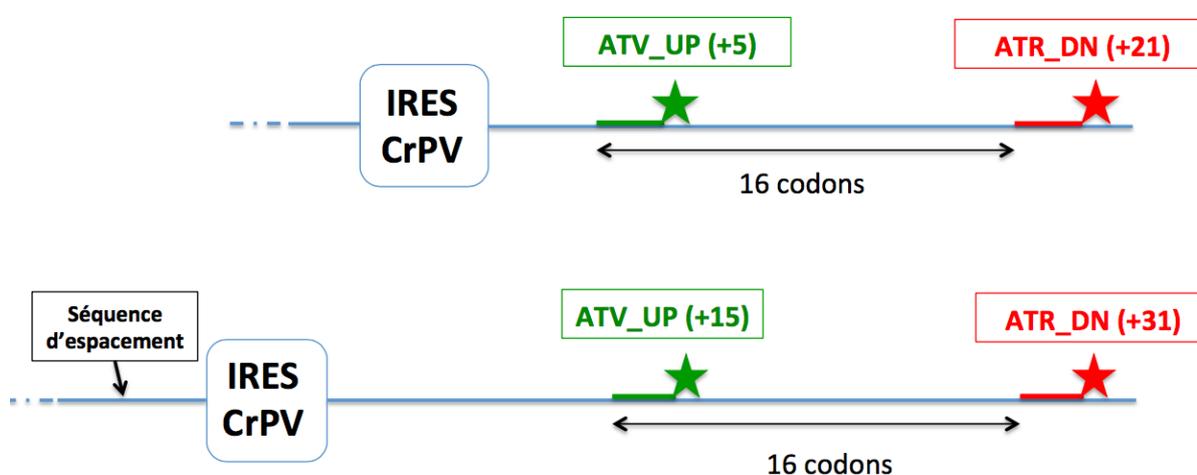


FIGURE 5.1 – Schéma représentatif des ARNm CrPV-UP(+2)-DN(+18) en haut et S-CrPV-UP(+12)-DN(+28) en bas. On a ajouté à ce second système rapporteur une séquence d'espacement en amont de l'IRES et la distance qui sépare l'IRES du premier jalon est allongée de 15 codons.

Nous avons ajouté une autre modification à cet ARN messager : le premier oligofluorophore est éloigné de 10 codons supplémentaires de l'IRES. Cette modification n'a pas pour but d'augmenter l'efficacité de recrutement du ribosome, mais simplement d'avoir une meilleure précision sur la mesure du temps de départ du premier jalon. En effet, nous avons mesuré lors des expériences décrites dans le chapitre précédent que les ribosomes du RRL traduisaient avec un temps caractéristique : $t_{el} = 0,3$ s/codon. Donc pour traduire 5 codons il ne faut en moyenne au ribosome que 1,5 s. Notre résolution temporelle étant de une image toutes les 2,5 s, nous n'avons pas la résolution temporelle nécessaire pour mesurer précisément le temps court correspondant au départ du premier marqueur. Plutôt que de changer la résolution temporelle, nous choisissons d'éloigner ce marqueur pour augmenter la précision de nos mesures cinétiques.

Les résultats des mesures cinétiques sur le système rapporteur S-CrPV-UP(+12)-DOWN(+28) sont présentés sur la figure 5.2. Elle représente les courbes cumulées moyennées de départs des oligofluorophores ATR-DN12-(+21) pour l'ARNm CrPV-UP(+2)-DOWN(+18) présenté dans le chapitre précédent (cf. figure 4.11 du chapitre 4) et pour l'ARNm S-CrPV-UP(+12)-

DOWN(+28) revu pour améliorer l'efficacité d'initiation. Chaque courbe est accompagnée de son contrôle sans IRES acquis dans des conditions identiques aux expériences de traduction correspondantes. Les courbes de traduction et de contrôle correspondant à l'ARNm S-CrPV-UP(+12)-DOWN(+28) sont plus hautes : il y a moins de départs cumulés au cours du temps que pour les expériences précédentes. Cela est en grande partie dû aux améliorations apportées à notre protocole expérimental qui engendrent moins de départs spontanés et par photoblanchiment. En revanche l'écart entre traduction et contrôle est le même pour les deux ARNm. Cet écart est faible, et correspond à des valeurs de l'efficacité de reconnaissance et de traduction A autour de 10%.

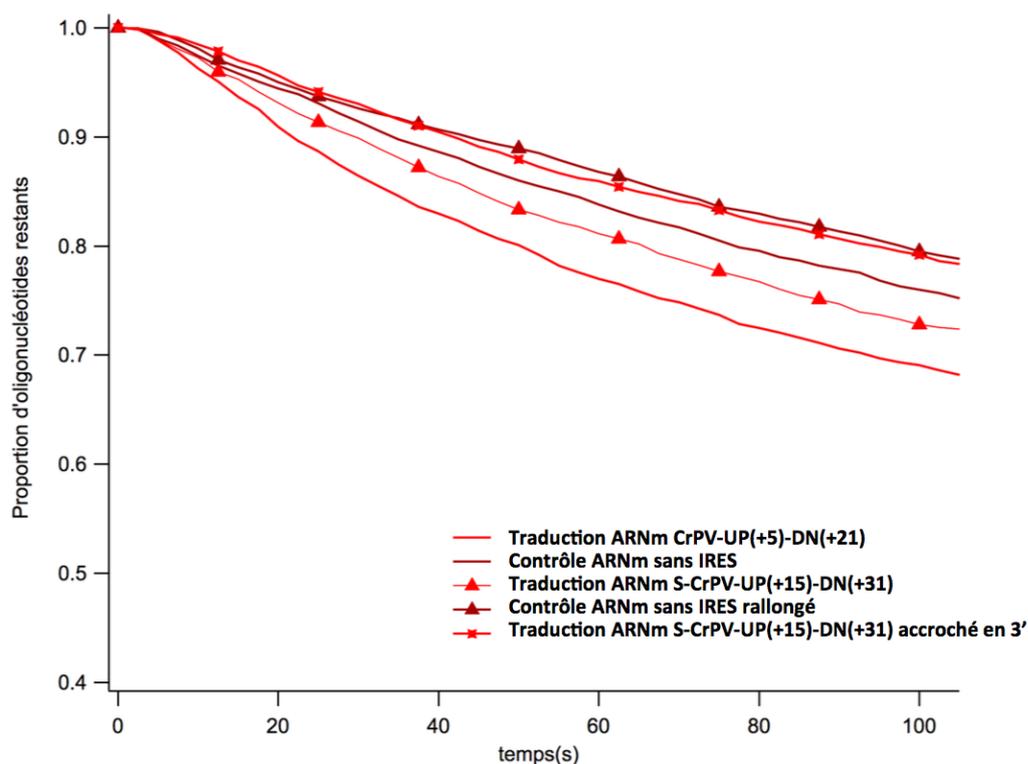


FIGURE 5.2 – Courbe représentant la proportion de la population initiale de jalons fluorescents DOWN restant au cours du temps pour les ARNm S-CrPV-UP(+12)-DOWN(+28) (courbe rouge, marqueurs triangulaires) et CrPV-UP(+2)-DOWN(+18) (courbe rouge sans marqueurs) et leurs contrôles respectifs (courbes rouge foncé). La courbe avec les marqueurs en étoile correspond à une expérience de traduction avec une accroche en 3' de l'ARNm CrPV-UP(+12)-DOWN(+28).

On peut en conclure que l'introduction d'une séquence d'espacement avant l'IRES n'a pas amélioré l'efficacité d'initiation des ribosomes du RRL sur l'IRES CrPV.

5.1.2.2 Test de l'accroche en 3'

Une autre possibilité pour éloigner le site d'initiation de la surface (tout en restant dans les 100 nm de profondeur de l'onde évanescente) est d'accrocher l'ARN messager en surface par

5.1. Stratégies de maximisation de l'efficacité de traduction

son autre extrémité, l'extrémité 3'. Cela est possible grâce à l'utilisation d'un oligonucléotide appelé LOMB spécifique de la séquence finale de l'extrémité 3'. Dans ce cas, l'espace autour de l'IRES est complètement dégagé pour le recrutement du ribosome. Cette modification est induite sur un ARNm S-CrPV-UP(+12)-DOWN(+28), qui possède les mêmes caractéristiques que celui décrit dans la figure 5.1. Il est simplement accroché à son autre extrémité. Nous réalisons une mesure cinétique dans des conditions expérimentales identiques à celles des expériences sur l'ARNm S-CrPV-UP(+12)-DOWN(+28) classique. Le contrôle de référence est donc le même (courbe rouge foncée marquée de triangles sur la figure 5.2). La courbe cumulée moyennée correspondant à l'ARNm accroché en 3' est marquée d'étoiles. On constate qu'elle est confondue avec la courbe de contrôle correspondante. Aussi on peut en conclure que dans ce cas de figure, l'efficacité d'initiation n'est pas supérieure à celle des ARNm accrochés en 5'. Il s'agit de fait de la condition qui engendre l'initiation la moins efficace, contrairement à nos attentes.

En conclusion de ces deux tests, le facteur responsable de la faible efficacité d'initiation n'est pas lié à l'encombrement stérique dû à la proximité de l'IRES avec la lamelle de microscope. Nous nous sommes alors tournés vers la seconde hypothèse envisageable, celle d'une faible efficacité de recrutement du ribosome spécifiquement par l'IRES CrPV dans le RRL.

5.1.2.3 Essais avec l'initiation par une IRES HCV

En parallèle des tentatives de modification d'ARN messagers porteurs de l'IRES CrPV, nous avons envisagé d'étudier l'initiation par une autre IRES virale. Ce test a deux visées. D'abord comme nous avons pu obtenir une preuve de principe de notre capacité à mesurer une cinétique d'initiation sur l'IRES CrPV, il est bien sûr intéressant de **démontrer que notre méthode est généralisable à d'autres systèmes d'initiation**. Ensuite nous espérons que le recrutement du ribosome par une autre IRES serait plus efficace. Notre choix s'est porté sur l'IRES HCV (virus de l'hépatite C). Il est justifié par plusieurs éléments :

- l'IRES HCV est une IRES très étudiée du fait du virus qui lui est associé (virus de l'hépatite C) qui affecte l'être humain et représente de fait un enjeu thérapeutique majeur,
- HCV appartient à une autre catégorie d'IRES (type II),
- les mécanismes d'initiation mis en jeu sont donc très différents de ceux de l'IRES CrPV. En particulier, il n'y a pas de structure qui mime un ARNt initiateur (domaine PKI) pour l'IRES HCV¹. Il est donc intéressant de voir si ces différences induisent une différence cinétique.

De nouvelles constructions de systèmes rapporteurs ont été réalisées en remplaçant la séquence IRES CrPV par une IRES HCV. Le premier ARNm étudié est HCV-UP(+12)-DN(+21). Le premier jalon reste éloigné de l'IRES pour mesurer plus facilement son instant de départ. La distance entre le premier et le second oligofluorophore est fixée à 9 codons seulement dans un premier temps pour limiter le photoblanchiment.

1. Nous avons discuté au chapitre 1 dans l'état de l'art de l'importance de cette structure mimétique dans la dynamique d'interaction entre le ribosome et l'IRES CrPV. Les résultats présentés dans le chapitre 4 vont également dans ce sens, la translocation du domaine PKI est une étape cinétiquement déterminante.

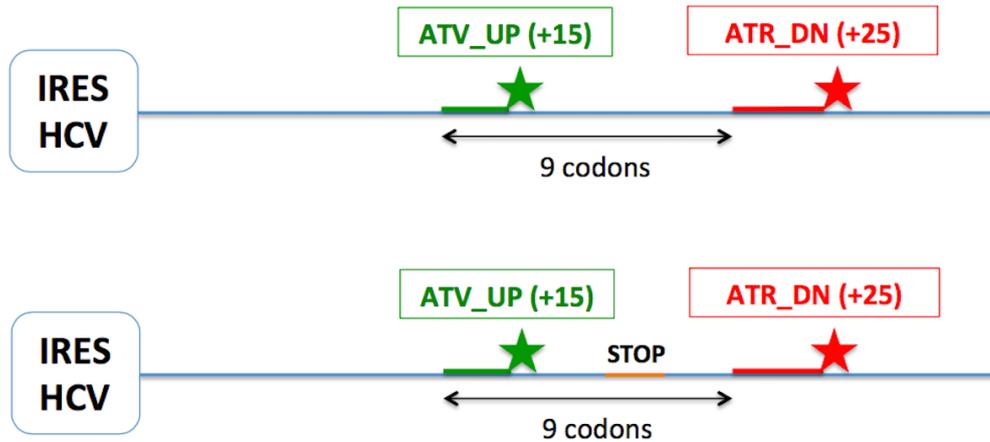


FIGURE 5.3 – Schéma représentatif des ARNm HCV-UP(+12)-DN(+21) en haut et HCV-UP(+12)-STOP-DN(+21) en bas. Ici le second jalon est un oligofluorophore ATR-DN15(+25) (séquence de 15 nucléotides) tandis que le premier jalon est un oligofluorophore ATV-UP12(+15) (séquence de 12 nucléotides).

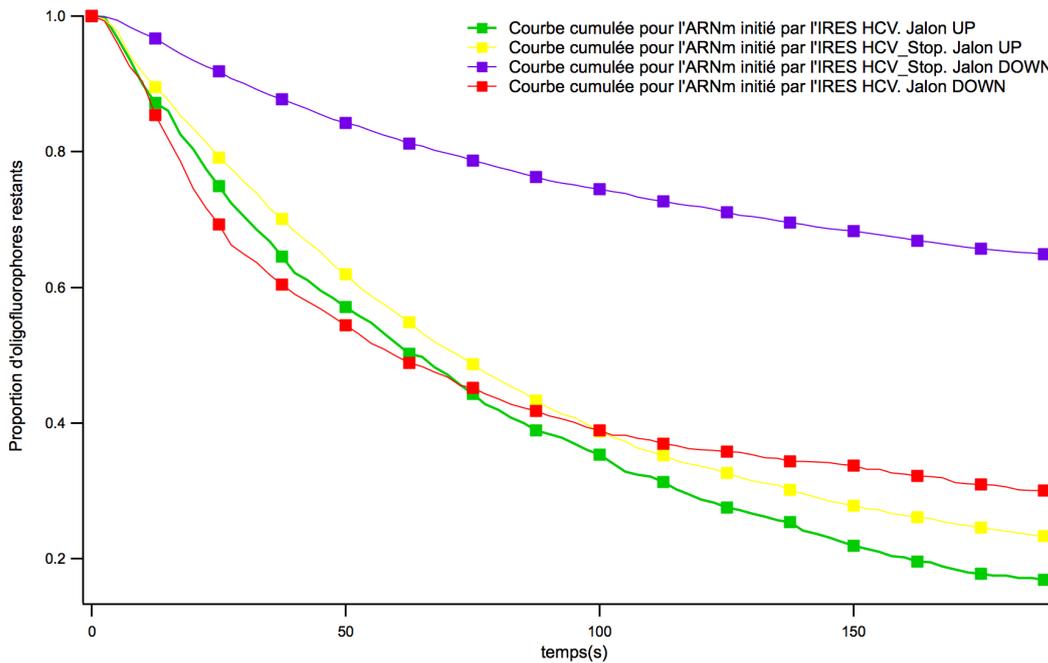


FIGURE 5.4 – Courbe représentant la proportion de la population initiale de jalons fluorescents (UP ou DOWN) restants au cours du temps pour l'ARNm HCV-UP(+12)-DN(+21) et l'ARNm de contrôle spécifique au jalon DOWN : HCV-UP(+12)-STOP-DN(+21)

Nous avons profité de la réalisation de ces nouvelles constructions pour tester un contrôle spécifique au jalon DOWN, HCV-UP(+12)-STOP-DN(+21) consistant à introduire sur l'ARNm

5.1. Stratégies de maximisation de l'efficacité de traduction

un codon stop entre les deux jalons fluorescents, comme visible sur la figure 5.3. De cette façon, le premier jalon est détaché comme dans l'expérience de traduction, tandis que le second jalon n'est pas détaché par traduction. On doit donc observer dans une couleur (canal vert correspondant au premier jalon) une courbe de départs cumulés identique aux courbes de traduction et dans l'autre couleur (canal rouge correspondant au second jalon) une courbe identique aux expériences de contrôle sans IRES.

L'avantage de ce contrôle est qu'il démontre que la différence de départs observée entre les expériences de traduction et les expériences de contrôle est bien spécifiquement liée à une activité de traduction. Les résultats de ce test sont représentés sur la figure 5.8 qui montre les courbes de départs cumulés moyennées dans les deux couleurs pour les ARNm HCV (expérience de traduction) et HCV-STOP (expérience de contrôle spécifique au jalon DOWN). Pour le premier jalon, on observe effectivement que les courbes correspondant à l'ARNm HCV et à l'ARNm HCV-STOP sont confondues (courbe verte et courbe jaune sur 5.4). A l'inverse, on constate un écart très important entre les deux expériences pour le second jalon. Lorsqu'un stop est présent entre les deux jalons, la proportion de départ après 200 s est de seulement 30%, tandis que dans l'expérience de traduction en l'absence de stop cette proportion atteint 65%.

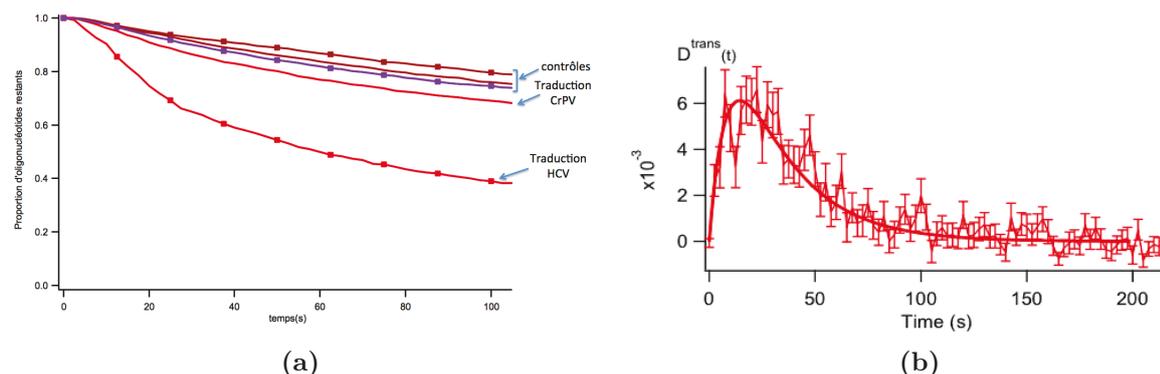


FIGURE 5.5 – Cinétiques de départ de l'oligonucléotide DOWN pour une initiation par une IRES HCV. (a) Courbes représentant la proportion de la population initiale de jalons fluorescents DOWN restants au cours du temps pour respectivement un ARNm CrPV (ainsi que son contrôle associé) et un ARNm HCV (ainsi que son contrôle associé). (b) Distribution du taux de départs instantanés du jalon ATR-DN15-(+25) au cours du temps pour l'ARNm HCV renormalisé par son contrôle spécifique HCV-STOP. La distribution est ajustée par la loi $\mathcal{D}(t)$ décrite au chapitre 4.

De plus on peut voir sur la figure 5.5a que la courbe de départs cumulés du contrôle HCV-STOP est comparable à celle du contrôle sans IRES effectué dans les mêmes conditions expérimentales (courbe rouge foncée). Cela valide que notre contrôle sans IRES est un contrôle probant pour évaluer la part de traduction dans nos expériences. Cette figure 5.5 compare les courbes de départ cumulées pour l'ARNm CrPV-UP(+2)-DOWN(+18) avec celles obtenues avec l'ARNm HCV-UP(+12)-DN(+21). Sont aussi représentés le contrôle correspondant à l'expérience de traduction sur CrPV-UP(+2)-DOWN(+18), et les deux contrôles réalisés en même temps que les expériences de traduction sur HCV, un contrôle sans IRES et un contrôle HCV-STOP. L'écart entre courbe de traduction et courbe de contrôle est très nettement supérieur pour les expériences avec l'ARNm HCV. Ce constat est confirmé lorsque l'on analyse les courbes de départs

instantanés des oligofluorophores. Celle du jalon DOWN est présentée sur la figure 5.5b. **On en déduit par ajustement la valeur de l'efficacité globale A qui s'élève à 30% contre seulement 10% pour l'IRES CrPV.**

5.1.3 Conclusions et validation d'une approche pour une traduction efficace

Les différents tests réalisés nous ont permis de mesurer l'efficacité d'initiation et de traduction des ribosomes du RRL dans différentes configurations. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

ARNm	A(UP)	A(DOWN)
CrPV-UP(+2)-DN(+18)	13 \pm 1%	8 \pm 1%
S-CrPV-UP(+12)-DN(+28) 5'	9 \pm 2%	8 \pm 1%
S-CrPV-UP(+12)-DN(+28) 3'	négligeable	négligeable
HCV-UP(+12)-DN(+21)	42 \pm 3%	30 \pm 1%

TABLE 5.1 – Tableau récapitulatif des mesures de l'efficacité de reconnaissance et de traduction pour les différents tests décrits plus haut.

L'ensemble de ces tests a amené à la conclusion que l'efficacité d'initiation et de traduction était limitée par l'IRES CrPV. **Dans les conditions de nos expériences, l'efficacité de recrutement du ribosome par cette IRES est faible, tandis que l'utilisation d'une IRES HCV nous a permis de multiplier par 3 l'efficacité de recrutement.** Ces observations vont dans le sens des conclusions de l'étude de [Pestova 2004]. L'activité de recrutement des deux sous-unités du ribosome est inhibée par la présence dans le RRL de facteurs d'initiation qui sont normalement impliqués dans l'initiation canonique.

5.2 Etude comparative de différentes IRES virales

Par la suite, ayant identifié l'importance du choix de l'IRES pour mesurer une cinétique de traduction des ribosomes du RRL, nous avons choisi d'aller plus loin dans l'étude de l'initiation IRES dépendante. Nous avons cherché à identifier dans la littérature des IRES qui présentent une efficacité d'initiation importante dans le RRL. De plus, comme nous avons mesuré une cinétique de traduction pour deux IRES issues de types différents et présentant des caractéristiques structurales et fonctionnelles différentes, nous souhaitons choisir une troisième IRES avec des caractéristiques encore différentes (type, structure, mécanismes d'initiation...). Ainsi nous espérons pouvoir réaliser une étude comparative de l'efficacité et de la cinétique d'initiation de ces IRES afin de mettre en lumière ou bien un mécanisme commun d'initiation de ces structures ou au contraire de mettre en exergue les différences qui les séparent dans leur interaction dynamique avec le ribosome.

5.2. Etude comparative de différentes IRES virales

5.2.1 Critère de sélection d'une troisième IRES virale : Etudes biochimiques de l'efficacité d'initiation dans le RRL

Après l'obtention de résultats très prometteurs sur l'IRES HCV, nous avons souhaité poursuivre dans cette démarche en réalisant une étude comparative de trois IRES issues de différentes catégories parmi celles décrites dans le chapitre d'introduction. Puisque nous avons constaté par l'expérience des différences d'efficacité de recrutement entre l'IRES CrPV et l'IRES HCV dans le RRL, nous nous sommes référés à la littérature pour identifier les IRES qui donnent lieu à une initiation efficace dans le RRL. 3 études, [Borman 1995, Borman 1997, Panthu 2015], se sont intéressés à l'efficacité de l'initiation IRES dépendante dans différentes conditions : dans le RRL, dans un système de translation in-vitro hybride conçu à partir du RRL et dans des lignées cellulaires in-vivo. Bien qu'elles présentent toutes des éléments de compréhension des mécanismes d'initiation des IRES issues de catégories distinctes, nous nous intéresserons plus particulièrement à [Borman 1995] qui cible l'efficacité d'initiation dans le RRL pour sa correspondance avec nos propres conditions d'études.

5.2.1.1 Principe de la mesure

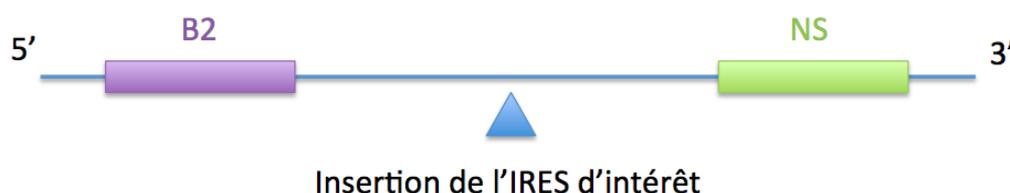


FIGURE 5.6 – ARNm utilisé dans [Borman 1995]. Il contient d'abord le cistron B2, avec initiation canonique, puis le cistron NS, pour lequel l'initiation canonique n'est pas possible. Entre les 2 gènes, les auteurs insèrent une IRES à tester.

Les ARN messagers utilisés dans cette étude possèdent la structure IRES incluse entre deux phases codantes pour les protéines B2 et NS (cf. figure 5.6). La partie codante pour B2 est dotée d'une initiation canonique coiffe dépendante. Elle sert de contrôle positif et permet de renormaliser les efficacités de traduction. La partie codant pour NS utilise une initiation non canonique. L'IRES étudiée est insérée entre les deux cistrons. Les cistrons B2 et NS codent pour deux protéines différentes. La traduction se fait en présence de méthionine avec un S radioactif ($^{35}\text{S-Met}$) pour permettre la lecture sur gel du produit de traduction. Ce gel permet d'évaluer l'efficacité de traduction des deux gènes pour chacun des cas considérés.

La traduction du gène en amont B2 atteste de la capacité des ribosomes à traduire les ARN messager. Pour tous les ARNm étudiés, les auteurs mesurent une traduction effective du cistron comme visible sur la figure 5.7. Un ARNm rapporteur sans IRES insérée entre B2 et NS sert de contrôle (colonne de droite sur la figure 5.7). On constate que pour ce contrôle, B2 est effectivement traduite tandis que NS ne l'est pas. Ce contrôle atteste que l'efficacité de traduction de la séquence NS correspond à l'efficacité d'initiation de l'IRES insérée entre les deux cistrons.

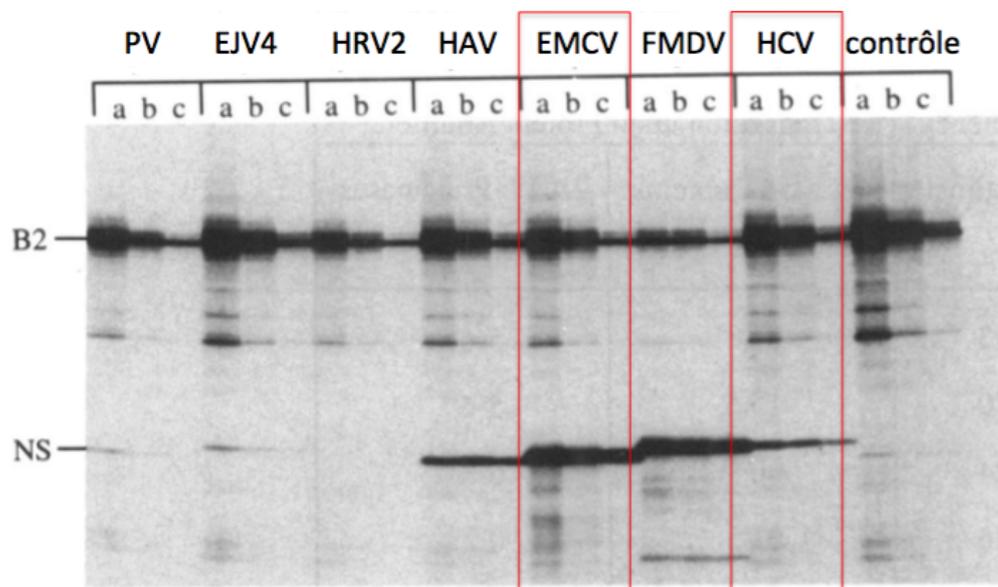


FIGURE 5.7 – Figure adaptée de [Borman 1997]. Gel d'électrophorèse représentant, via la production d'une protéine radioactive, l'efficacité de traduction des protéines B2 et NS pour différentes IRES, et à des concentrations initiales en ARNm différentes.

Ici les colonnes (a),(b) et (c) correspondent à différentes concentrations en ARNm, à savoir 25, 12,5 et 6,25 µg/ml.

A partir de cette mesure, les efficacités d'initiation des différentes IRES étudiées sont résumés dans le tableau de la figure 5.8

Deux des panels de conditions testées sont (1) la concentration en espèces salines (KCl et MgCl) et (2) l'ajout d'extrait de cellules HeLa humaines à hauteur de 20% dans le RRL.

5.2.1.2 Efficacité d'initiation dans le RRL pur

La première conclusion que l'on peut faire à la lecture de ce tableau concerne les différences d'efficacité d'initiation dans le RRL non modifié. Les efficacités de traduction relative dans le RRL pur pour les différentes IRES sont résumées dans la colonne (b)/Physiological/(-)HeLa encadrée en violet. On retrouve une différenciation correspondant aux différentes catégories d'IRES². Les IRES de type IV (PV, EJV4, HRV et HAV) sont en moyenne peu efficaces dans le RRL, alors que les IRES de type III EMCV et FMDV sont très efficaces dans cet extrait cellulaire. HCV qui est une IRES de type II présente une efficacité d'initiation intermédiaire, étonnement plus proche de HAV (type IV) que de EMCV et FMDV. HAV est une IRES de type IV mais présente des caractéristique en terme d'efficacité similaires à celles des IRES des catégories supérieures.

2. Les catégories des IRES étudiées dans cet articles et les facteurs d'initiations qui leur sont associées sont résumées dans le tableau de la figure 5.9 qui est issu de l'étude de [Pérard 2010] pour faciliter la lecture des résultats qui suivent.

5.2. Etude comparative de différentes IRES virales

	VIRUS	(a)		(b)		
		Optimal Salt conditions		Relative Translation Efficiency		
		KCl (mM)	MgCl ₂ (mM)	Physiological		Optimal
		- HeLa	+HeLa			
Type IV	PV	80 (60-105)	0 (0-0.3)	1	23	53
	EJV4	85 (55-100)	0.5 (0.35-0.65)	2	31	70
	HRV	65 (50-80)	0.5 (0.4-0.7)	0.1	6	24
	HAV	65 (40-115)	0.5 (0-1.0)	22	10	26
Type II	EMCV	120 (30-130)	0.5 (0-1.0)	100 ^(c)	51	100 ^(c)
	FMDV	125 (40-150)	0.5 (0.1-0.9)	99	45	98
Type III	HCV	110 (40-120)	0.5 (0.1-1.0)	15	7	19

FIGURE 5.8 – Figure adaptée de [Borman 1997]. Tableau récapitulatif des résultats de l'étude biochimique de caractérisation de l'efficacité d'initiation de différentes IRES dans le RRL pur ou modifié. (a) Valeurs des concentrations salines optimales pour maximiser l'efficacité de chaque IRES. (b) Pourcentage d'efficacité d'initiation relative (par rapport à l'initiation canonique) pour les différentes IRES dans le RRL pur (colonne encadrée en violet), dans le RRL supplémenté en cellules HeLa, ou dans le RRL modifié pour optimiser le fonctionnement de chaque IRES.

Famille	Nom	Facteurs canoniques	Facteurs non canoniques (ITAFs)	Type d'IRES
Virus à ARN				
Tout identique				
Picornaviridae	Entérovirus : PV	40S, 60S, eIF2, eIF3, eIF4G, eIF4A, eIF4B	PTB, La, SRp20, PCBP2, UNR	IV
	Rhinovirus : VHR	40S, 60S, eIF2, eIF3, eIF4G, eIF4A, eIF4B	PTB, La, PCBP2, UNR	IV
	Hepatovirus : VHA	40S, 60S, eIF2, eIF3, eIF4G, eIF4A, eIF4B	PTB, PCBP2	IV
	Cardiovirus : EMCV	40S, 60S, eIF2, eIF3, eIF4G, eIF4A, eIF4B	PTB	III
	Aphtovirus : FMDV	40S, 60S, eIF2, eIF3, eIF4G, eIF4A, eIF4B	PTB, ITAF45	III
	Flaviviridae	Pestivirus : CSFV	40S, 60S, eIF2, eIF3	PTB, PCBP2, La
Hepacivirus : VHC		40S, 60S, eIF2, eIF3	PTB, hnRNPL, hnRNP-D, NSAP1, La	II
Dicistroviridae	Dicistrovirus : CrPV	40S, 60S	non déterminé	I

FIGURE 5.9 – Figure adaptée de [Pérard 2010]. Tableau récapitulatif des familles et des catégories d'IRES avec les facteurs d'initiation impliqués pour chacune des IRES classifiées.

La différence majeure entre HAV et les autres IRES de type IV réside dans la nécessité de présence des facteurs non canoniques, comme les protéines UNR et La. De même EMCV et FMDV diffèrent des autres IRES de leur famille uniquement par le faible nombre de facteurs non canoniques impliqués et non pas par le nombre de facteurs canoniques (cf. 5.9). Ce constat

laisse penser que les facteurs non canoniques, et en particulier les deux facteurs cités jouent un rôle important pour définir l'efficacité d'une IRES dans le RRL, plus encore que les facteurs canoniques. On peut noter que HCV requiert des facteurs non canoniques qui lui sont propres, avec seulement les protéines La et PTB en commun avec les autres IRES présentées dans 5.9. Cette particularité peut expliquer en partie le comportement spécifique de cette IRES dans le RRL.

5.2.1.3 Impact des concentrations salines sur l'efficacité d'initiation

Lorsque l'on fait varier la concentration en espèces salines, on retrouve les mêmes groupes d'IRES qui ont des comportements similaires. Les IRES PV, EJV et HRV sont sensibles à la variation de concentration en espèces salines tandis que pour les autres, l'efficacité d'initiation dépend peu de cette variation. De même la présence d'extrait cellulaire de cellules HeLa augmente l'efficacité pour le premier groupe au moins d'un facteur 20, tandis que pour les 4 autres IRES (HCV, EMCV, HAV et FMDV), on observe l'effet inverse, à savoir un effet inhibiteur.

5.2.1.4 Bilan global de l'étude

Ce que l'on peut déduire de ces travaux est que **l'efficacité de traduction est effectivement un paramètre très variable selon les IRES dans un milieu donné**. Pour autant il apparaît clairement qu'il n'est pas évident de faire une hypothèse sur l'efficacité d'initiation d'une IRES en considérant seulement sa catégorie ou des arguments structuraux. L'environnement biochimique et les conditions expérimentales jouent un rôle déterminant.

Dans des conditions biochimiques similaires aux nôtres, l'IRES EMCV semble être le meilleur choix pour s'assurer d'avoir une initiation efficace. De plus, ce choix nous permettrait de confronter les résultats cinétiques pour trois IRES issues de trois catégories distinctes (types I, II et III), et mettant en jeu différents mécanismes d'initiation. Il est important de garder à l'esprit que le passage d'une expérience en tube à la molécule unique induit des variations importantes de l'environnement des systèmes étudiés (concentration en ARN messagers beaucoup plus faible, surface fonctionnalisée...). Si nous prenons pour référence les résultats de [Borman 1995], il est possible que nous obtenions des résultats différents dans nos conditions expérimentales.

5.2.2 Mesures cinétiques comparatives en molécules uniques des IRES CrPV, HCV et EMCV

5.2.2.1 Systèmes rapporteurs pour l'étude comparative des IRES

L'étude bibliographique nous a permis d'identifier l'IRES EMCV comme une bonne candidate pour notre étude en molécule unique. Nous réalisons donc une construction avec cette IRES notée EMCV-UP(+12)-DN(+28) (cf. figure 5.10). Nous souhaitons comparer en molécule unique, dans un premier temps l'efficacité, puis la cinétique des trois IRES CrPV, HCV et EMCV. Les systèmes rapporteurs étudiés, associés à chacune de ces IRES sont présentés dans la figure 5.10. Le système rapporteur avec l'IRES EMCV est identique dans sa conception à celui avec IRES HCV, mis à part la distance entre les deux jalons qui est de 16 codons.

5.2. Etude comparative de différentes IRES virales

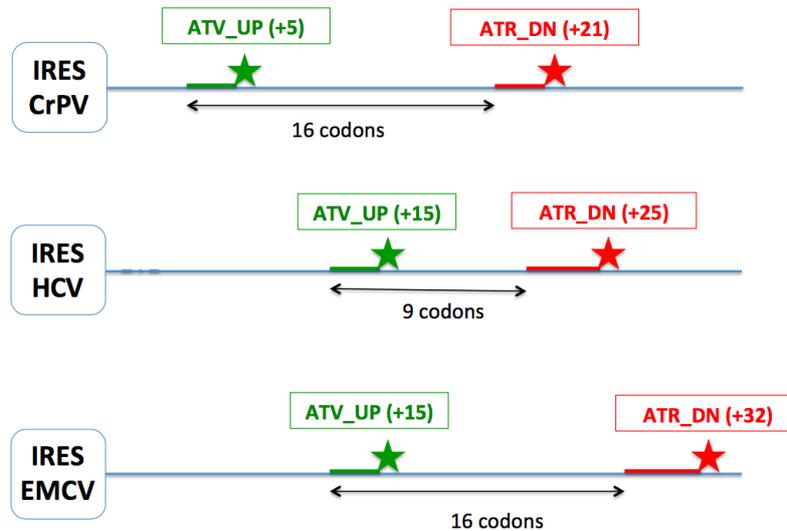


FIGURE 5.10 – Illustration des systèmes rapporteurs utilisés pour l'étude comparative de l'initiation par les IRES CrPV, HCV et EMCV.

5.2.2.2 Obtention des paramètres cinétiques

On réalise pour les systèmes rapporteurs avec IRES HCV et EMCV la même procédure d'acquisition et d'analyse des données que pour les expériences décrites dans le chapitre 4 sur les ARNm avec IRES CrPV.

On obtient donc des cinétiques de départs instantanés $D^{trad}(t)$ dans chaque couleur individuellement pour les deux systèmes rapporteurs HCV-UP(+12)-DN(+21) et EMCV-UP(+12)-DN(+28). On compare ces cinétiques à celles acquises avec le système rapporteur avec IRES CrPV, déjà décrites dans le chapitre 4.

En observant les cinétiques décrites sur la figure 5.11, on peut faire un premier constat immédiat. Pour les trois IRES étudiées, on ajuste avec succès les cinétiques de départ dans une seule couleur $D^{trad}(t)$ par notre loi modèle $\mathcal{D}(t)$. **Ceci signifie que l'on retrouve dans tous les cas une dynamique à deux temps caractéristiques : un temps court t_1 et un temps long t_0 , ainsi qu'un troisième paramètre A qui caractérise l'efficacité globale.**

On peut noter que les barres d'erreurs issues de la procédure de bootstrap traduisent à la fois l'importance de l'échantillon statistique initial et son homogénéité interne. L'erreur est particulièrement faible pour la cinétique de départ du jalon ATR-DN15(+25) de l'ARNm avec IRES HCV. Nous avons accumulé pour cette cinétique un échantillon statistique important (plus de 4000 particules analysées dans la traduction et dans le contrôle sans IRES), et les améliorations apportées à notre protocole expérimentale (décrites au chapitre 3) ont permis d'améliorer la reproductibilité de nos mesures et de fait de minimiser la variabilité au sein d'un échantillon statistique.

Nous n'avons pu réaliser qu'une première série d'expériences préliminaires sur l'ARNm avec IRES EMCV, et n'avons pas accumulé une statistique suffisante pour le jalon ATV-UP15(+15).

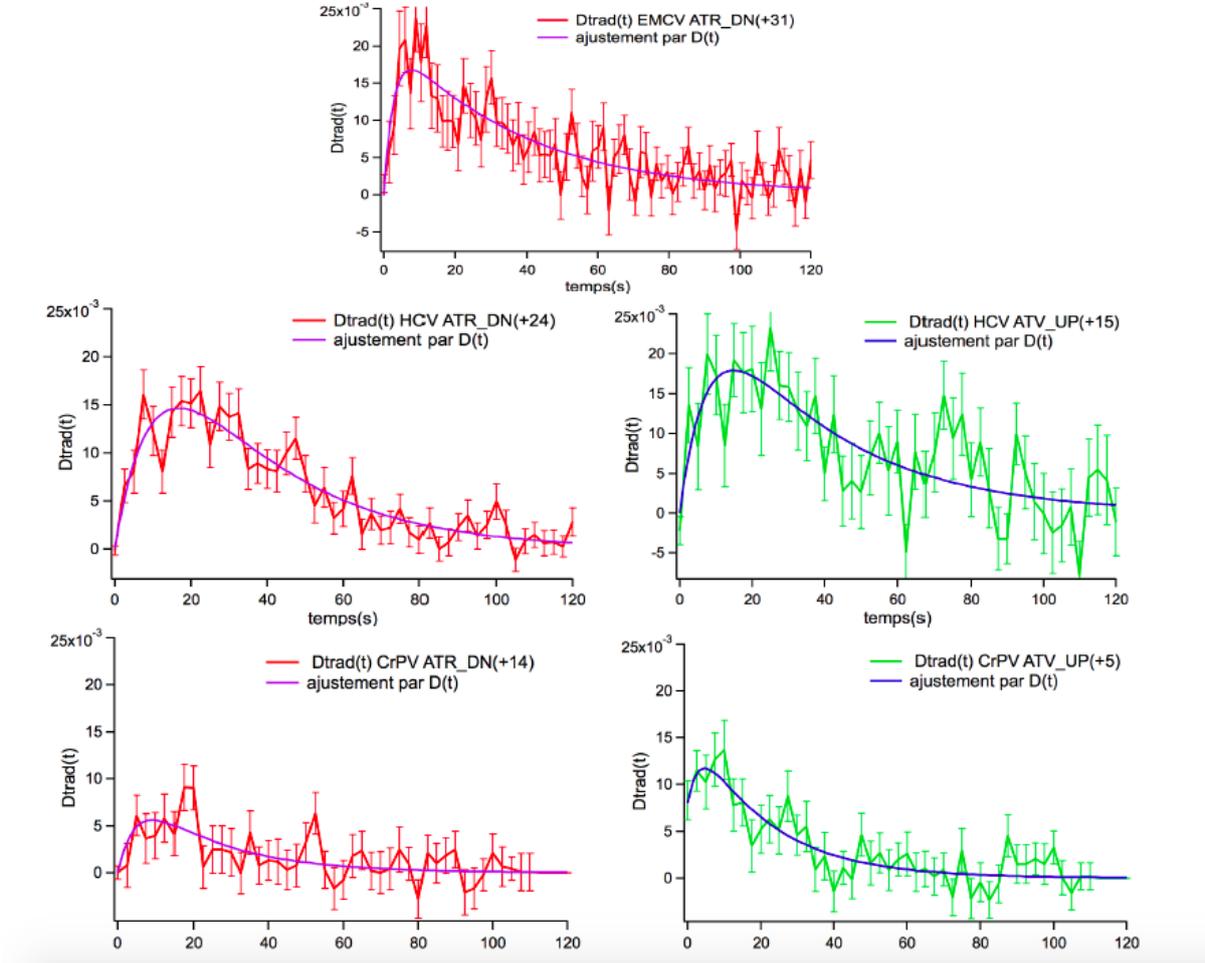


FIGURE 5.11 – Distribution des départs instantanés dans une couleur $D^{trad}(t)$ pour les différentes IRES étudiées. Les courbes rouges correspondent aux cinétiques de départ du jalon fluorescent ATTO rouge en position DOWN. Les courbes vertes correspondent aux cinétiques de départ du jalon fluorescent ATTO vert en position UP. Le tracé de la distribution, l’ajustement par la loi $\mathcal{D}(t)$ et l’établissement des barres d’erreurs sont réalisées par une procédure de bootstrap, réitérée 100 fois.

Nous ne présentons de fait que la cinétique de départ du jalon ATR-DN15(+32).

5.2.2.3 Comparaison des efficacités d’initiation

Nous pouvons déduire des cinétiques décrites plus haut la valeur de l’efficacité globale A , assimilée dans notre cas à l’efficacité de recrutement et d’initiation des trois IRES que nous comparons.

Comme attendu au vu des études biochimiques présentées dans la section précédente, l’efficacité d’initiation de l’IRES EMCV est très supérieure à celle de l’IRES CrPV mais également plus importante que celle de l’IRES HCV. Le paramètre A est évalué à 50% pour le départ du marqueur DOWN et à 65% pour le départ du marqueur UP. Les

5.2. Etude comparative de différentes IRES virales

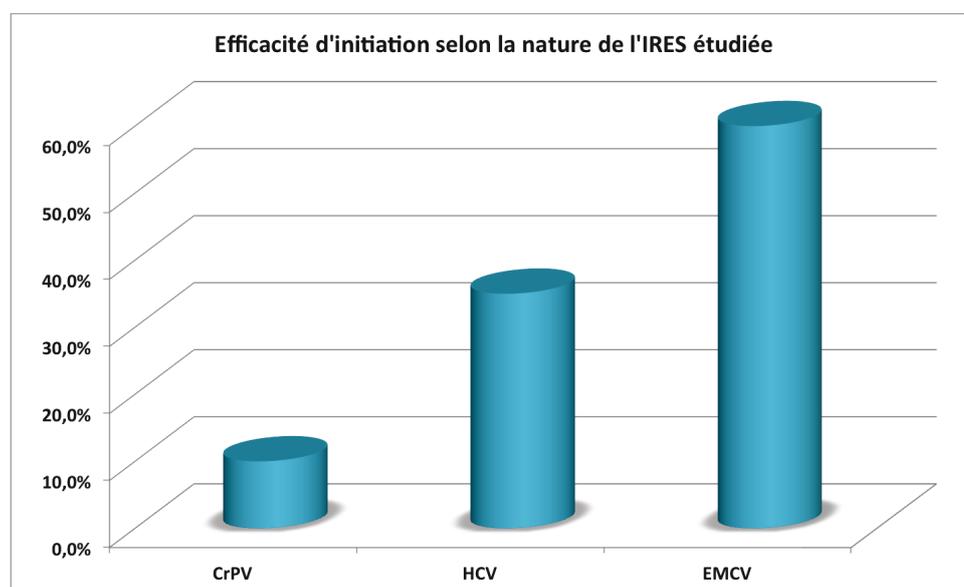


FIGURE 5.12 – Histogramme représentant l'efficacité d'initiation moyenne pour les trois IRES étudiées : CrPV, HCV et EMCV.

efficacités d'initiation moyennées (moyenne des mesures de A dans les deux couleurs) pour les trois IRES étudiées en molécule unique sont résumées dans l'histogramme de la figure 5.12. Les mesures en molécule unique sont cohérentes avec les mesures biochimiques dans le RRL. Elles confirment le fait que des IRES de types différents présentent des efficacités différentes dans un milieu d'étude donné.

On peut proposer une hypothèse pour expliquer les différences observées sur les trois IRES étudiées. [Pestova 2004] décrit l'implication des facteurs eIF1, eIF1A et eIF3 dans l'inhibition de l'initiation par l'IRES CrPV. Pour HCV et EMCV, le facteur eIF3 est impliqué dans l'initiation IRES dépendante, et peut avoir une implication moindre dans l'activité inhibitrice, voir même au contraire favoriser la voie non canonique de l'initiation. Une étude va dans ce sens pour l'IRES HCV : [Pérard 2009]. Elle montre que eIF3 interagit fortement avec un des domaines structuraux de l'IRES HCV, et catalyse l'accroche stable de la sous-unité 40S à la structure IRES. Dans ce cadre eIF3 n'a donc plus une fonction inhibitrice du recrutement du ribosome mais bien au contraire c'est un facteur facilitant ce recrutement.

5.2.2.4 Comparaison des paramètres temporels

Nous avons constaté que pour les trois IRES considérées, on mesurait une cinétique gouvernée par deux temps caractéristiques : un temps long t_0 et un temps court t_1 .

Les temps issus de l'ajustement par la loi $\mathcal{D}(t)$ sont résumés dans le tableau de la figure 5.13. Nous avons directement divisé la valeur de t_1 par le nombre de codons correspondant pour obtenir le paramètre t_{el} exprimé en seconde/codon.

	CrPV		HCV		EMCV
	UP	DN	UP	DN	DN
$t_0(s)$	20 ± 4	19 ± 7	33 ± 9	29 ± 5	37 ± 5
$t_{el}(s/c)$	$0,3 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,09$	$0,14 \pm 0,03$

FIGURE 5.13 – Tableau récapitulatif des paramètres cinétiques temporels extraits de l’ajustement par $\mathcal{D}(t)$ des cinétiques de la figure 5.11.

Confirmation de la vitesse d’élargissement du ribosome L’ensemble des 5 mesures du temps caractéristique d’élargissement t_{el} estimé sur des systèmes rapporteurs différents nous permet de donner une valeur moyenne et un écart type de ce temps caractéristique :

$$t_{el}l = 0,35 \pm 0,14s/codon$$

L’écart type, rapporté à la valeur de la moyenne est important, ce qui traduit bien que la précision de notre mesure sur le temps court est limitée. Nous ne pouvons établir une valeur absolue de la vitesse d’élargissement du ribosome, mais nous constatons que, sur un ensemble d’expériences étalées dans le temps, et correspondant à des systèmes rapporteurs différents³, nous mesurons systématiquement avec les ribosomes du RRL un temps caractéristique d’élargissement dans une gamme de valeur dispersée autour de 0,3 s/codon.

La figure 5.14 illustre en particulier que, en faisant varier la position du jalon fluorescent sur l’ARN messager rapporteur, la valeur du temps court brut t_1 évolue selon une courbe de tendance linéaire dont le coefficient directeur est cohérent avec la valeur moyenne de t_{el} . Cela conforte la validité de notre mesure expérimentale même si l’on éloigne les jalons fluorescents sur l’ARNm (et en particulier le second jalon DOWN)

Plus généralement, nous avons démontré à l’issue de cette étude comparative que notre méthode de mesure de la cinétique du ribosome était transposable à différents systèmes rapporteurs et donc à différentes problématiques biologiques d’étude de la traduction eucaryote.

Comparaison des temps longs Nous avons identifié l’existence d’un temps long pour les trois IRES étudiées, nous considérerons que ce temps long traduit trois événements successifs :

1. La diffusion des ribosomes du RRL jusqu’à l’ARNm
2. Le recrutement des sous-unités par l’IRES⁴

3. Nous avons fait varier à la fois la nature du système d’initiation, la position des jalons fluorescents, la nature des oligonucléotides...

4. Les travaux de [Petrov 2016] abordés au chapitre 1 ont décrit la cinétique de cette première étape et mesuré une cinétique lente pour le recrutement de la sous unité 40S par l’IRES CrPV. Le recrutement des sous-unités n’est donc pas nécessairement une étape négligeable du point de vue cinétique.

5.2. Etude comparative de différentes IRES virales

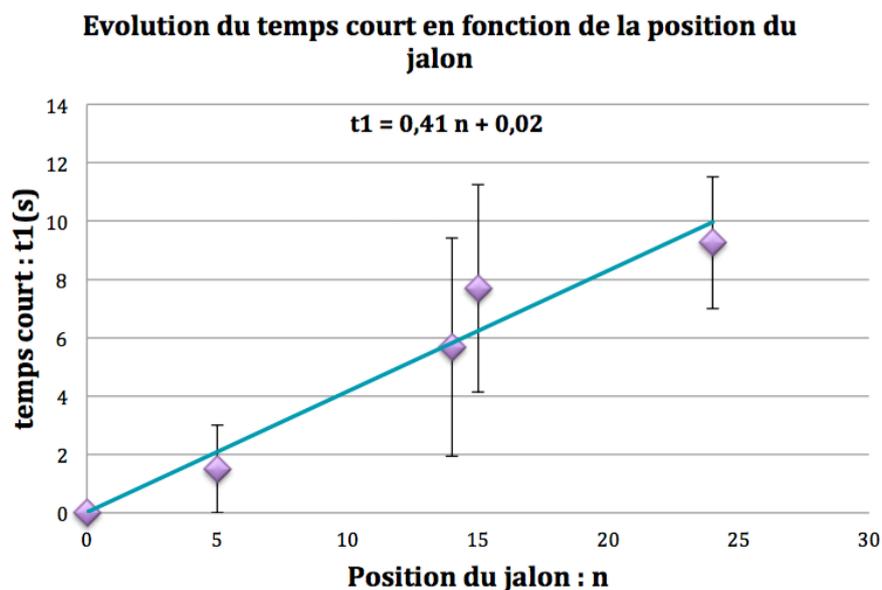


FIGURE 5.14 – Graphique illustrant l'évolution du temps court t_1 en fonction de la position du jalon fluorescent sur l'ARNm qui est détaché par le ribosome. Cette évolution est ajustée par une courbe de tendance linéaire de coefficient directeur $a=0,41$.

3. L'interaction du ribosome avec la structure de l'IRES et la phase d'initiation à proprement parler. Cette étape est potentiellement très différente pour les trois IRES considérées pour lesquelles les mécanismes d'initiation diffèrent.

Pour les trois IRES, nous mesurons un temps long de plusieurs dizaine de secondes, mais l'on constate des différences. Le temps long pour l'IRES CrPV a été évalué autour de 20 s pour les expériences avec les ribosomes du RRL (contre 40 s pour les ribosomes pré-incubés). Pour l'IRES HCV, on trouve un temps long autour de 30 s, et pour l'IRES EMCV, un temps long proche de 40 s. Il n'est pas évident d'interpréter les différences de temps long entre ces trois structures IRES.

Biochimiquement, l'IRES CrPV est l'IRES pour laquelle les interactions ribosome/structure IRES sont les plus fortes du fait du complexe PKI imitateur d'un ARN de transfert au site A. Il a été démontré dans la littérature que le premier cycle de translocation de ce domaine était une étape cinétiquement longue qui justifiait l'existence d'un temps long. Pour les IRES HCV et EMCV, il n'existe pas ce premier événement de translocation lent. De fait, nous nous attendions à ce que le temps long mesuré soit inférieur pour les IRES HCV et EMCV, ce qui n'est pas le cas.

Pour autant, ces deux IRES sont des séquences d'ARNm très structurées qui interagissent également de façon forte avec le ribosome, et le ribosome doit dans tous les cas être recruté sur l'IRES. Il n'est donc pas absurde de mesurer un temps long de l'ordre de plusieurs dizaines de secondes pour les IRES HCV et EMCV.

La seule conclusion probante que nous pouvons faire à ce stade est que l'existence d'un

temps long pour trois structures IRES issues de types différents et caractérisées par des modes de fonctionnement différents va dans le sens d'une propriété conservée au sein de l'initiation IRES dépendante. **Ce mode d'initiation implique des interactions fortes entre le ribosome eucaryote et la structure IRES qui sont à l'origine d'une initiation cinétiquement lente.**

Nous souhaitons bien sûr aller plus loin dans la description des mécanismes qui impliquent l'existence d'une phase d'initiation lente pour les structures IRES, ce qui nous amène à définir des perspectives sur le court terme pour ce travail de thèse.

5.2.2.5 Perspective pour l'étude comparative des structures IRES

Évolution de la loi d'ajustement $\mathcal{D}(t)$ Bien que la loi d'ajustement $\mathcal{D}(t)$ ait été un outil utile pour extraire les paramètres cinétiques de nos acquisitions, des améliorations de cette loi s'avèrent nécessaires pour les expériences ultérieures.

D'abord nous nous interrogeons sur la prise en compte du photoblanchiment dans nos expériences. Actuellement, nous soustrayons le photoblanchiment en renormalisant les expériences de traduction par des expériences de contrôle sans IRES. Seulement dans le contrôle sans IRES, 100% des ARNm sont soumis au photoblanchiment (et aux départs instantanés dont la cinétique est inconnue), tandis que dans les expériences de traduction, seule une proportion des ARNm sont traduits, un certain nombre sont uniquement soumis au photoblanchiment. Nous considérons donc une seule population homogène tandis qu'il y en a en réalité deux : une population d'ARNm pour lesquels la traduction est en concurrence avec le photoblanchiment et une population d'ARNm qui ne sera de toute façon pas traduite, et qui n'est donc soumise qu'au photoblanchiment .

Pour mieux prendre en compte ces deux populations, nous avons commencé à réfléchir à un modèle qui inclurait un paramètre α correspondant à la part d'ARNm qui ne sont soumis qu'au photoblanchiment ($(1 - \alpha)$ correspond à la proportion du reste de la population d'ARNm), ainsi qu'un paramètre correspondant à la durée de vie avant photoblanchiment dans les conditions de l'expérience que nous évaluons à partir des expériences de contrôle. Nous sommes actuellement en train de tester ce modèle sur les résultats de nos expériences pour éprouver sa viabilité.

Identification des différentes étapes qui entourent l'initiation par le marquage du ribosome Pour définir plus spécifiquement quelle est l'étape cinétiquement limitante entre les trois étapes décrites dans le paragraphe 5.2.2.4, il nous serait particulièrement utile de pouvoir suivre directement le mouvement du ribosome. L'équipe de biologistes de l'I2BC vient de parvenir à produire et purifier des ribosomes eucaryotes marqués. Nous pouvons donc envisager des expériences où nous pourrions discriminer les étapes de diffusion et de recrutement des sous-unités par les IRES puisque le signal de fluorescence du ribosome n'apparaîtra que lorsque celui-ci sera recruté sur l'ARN messager.

Par colocalisation, nous pourrions également déterminer quels sont les ARNm qui sont effectivement traduits et quels sont ceux qui ne sont soumis qu'au photoblanchiment et à l'instabilité thermodynamique. C'est une seconde façon de répondre à la problématique des deux populations d'ARNm exposée dans le paragraphe précédent. La proportion d'ARNm sur leur nombre

5.3. Conclusion

total qui seront colocalisés avec un ribosome nous donnera accès immédiatement à l'efficacité de recrutement de l'IRES considérée.

Bien sur, une telle innovation dans notre approche peut demander un important travail d'optimisation de notre protocole expérimental. Une première série d'expériences aura pour seul but de prouver notre capacité à observer le signal des ribosomes marqués en molécule unique, et de vérifier que ces ribosomes sont en mesure de s'initier et de traduire nos ARN messagers.

5.3 Conclusion

Nous avons exposé dans ce chapitre deux grandes étapes de ce projet de recherche qui ont récompensé l'ensemble des optimisations minutieuses apportées à notre approche expérimentale. D'abord, confrontés à la faible efficacité globale pour nos expériences avec les ribosomes du RRL, nous avons exposé dans ce chapitre les pistes explorées pour améliorer ce point essentiel pour la viabilité de nos mesures. Nous avons exploré deux pistes principales. Nous avons dans un premier temps essayé de modifier l'ARN messager avec IRES CrPV pour faciliter l'accès du ribosome au site d'initiation. Puis, cette stratégie n'ayant pas fonctionné, nous nous sommes tournés vers le site d'initiation lui-même et avons testé l'initiation par une IRES HCV. Cette seconde piste nous a effectivement permis d'augmenter l'efficacité d'initiation et de fait l'efficacité globale de traduction dans le RRL.

Encouragés par ce résultat, nous avons identifié dans la littérature une troisième IRES, l'IRES EMCV, choisie pour son efficacité d'initiation optimale dans l'extrait cellulaire RRL lors de mesures biochimiques. Cette IRES présente également l'avantage d'être d'un type différent des IRES HCV et CrPV étudiées précédemment. En produisant un ARNm initié par l'IRES EMCV, nous avons donc décidé de réaliser une étude comparative en molécule unique, tant de l'efficacité d'initiation des systèmes IRES que de la cinétique associée à l'initiation par ces structures.

Cette étude a amené à la conclusion que la cinétique d'initiation des IRES CrPV, HCV et EMCV est associée à l'existence d'un temps long de plusieurs dizaines de secondes qui traduit des interactions fortes entre le ribosome et la séquence IRES très structurée. Nous avons également établi que nous étions en mesure de transposer le principe de notre expérience dans le cadre de différentes problématiques biologiques. En effet, nous parvenons à mesurer pour des systèmes rapporteurs divers, des vitesses d'élongation cohérentes entre elles et avec la littérature.

Malgré tout, à la suite de cette étude, des interrogations demeurent, en particulier sur les mécanismes exacts qui permettent de justifier la présence d'un temps long lors de l'initiation IRES dépendante. Pour répondre à ces problématiques, nous comptons en particulier sur l'utilisation dans le court terme de ribosomes eucaryotes marqués, pour mettre en perspective les résultats de notre étude comparative.

