

THÈSE

présentée à
l'Université De Strasbourg

Pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université De Strasbourg

Discipline SCIENCES DU VIVANT
Domaine ASPECTS MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

par

Maria PROKUDIN LUDWIG

Etude de l'initiation de la traduction des ARNm
des histones H2A, H2B, H3 et H4

Soutenue publiquement le 4 octobre 2010 devant le jury composé de :

Dr. **Florence Baudin**
Dr. **Rémy Bordonné**
Pr. **Bruno Chatton**
Dr. **Gilbert Eriani**

Rapporteur externe
Rapporteur externe
Rapporteur interne
Directeur de thèse

Remerciements

Cette thèse a été réalisée à l'Université de Strasbourg et financée par une bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Je tiens d'abord à remercier les membres de mon jury, Dr. Florence Baudin, Dr. Rémy Bordonné et Pr. Bruno Chatton, d'avoir accepté de juger mon travail et d'avoir apporté de nombreuses corrections au présent manuscrit.

Je remercie également Pr. Bruno Chatton et Dr. Lyubov Ryabova d'avoir accepté d'être les référents de ma thèse.

Je remercie les membres de l'UPR pour leurs conseils lors de mes présentations orales et pour m'avoir prêté du matériel. Je tiens en particulier à remercier notre secrétaire Isabelle pour sa grande disponibilité.

Je remercie chaleureusement Jessica Diring pour ses conseils scientifiques et pour son soutien tout au long de nos études universitaires, et plus particulièrement durant la rédaction de ma thèse.

I'm very grateful to Dr. Natasha, for her help with my experiments, discussions, and above all for her moral support during my thesis. Thank you so much Natasha.

Je remercie tous mes amis Degausseurs pour leur soutien, leur bonne humeur et les conseils qu'ils m'ont prodigués durant ma thèse vis à vis de la biologie, la chimie et l'informatique. Merci Dr. Emy pour l'aide que tu m'as apportée dans le domaine de la chimie. Merci Dr. Aktarus de m'avoir ouvert certaines portes. Merci, Duncan pour ton aide informatique. Je remercie également Dr. Em, Tite Nélène, Dr. Gromito, La Fouine, Dr. Kynes, Dr. Jabba, Dr. Dude, Iomm, Fanny, Dr. Poulet et Poulette.

Je remercie la famille Ludwig pour leur chaleureux accueil et leur soutien.

От всего сердца благодарю мою семью за обеспечение моего образования, за вашу заботу и за поддержку в самые трудные моменты моей жизни. Большое вам спасибо за ваше присутствие и одобрительные слова в течении моей докторской диссертации. Передаю привет Даше, Наде, Кенгуру, Зае, Ниблэт, Тику и Таку...

Je dédie ce travail à Dr. Maok qui m'a guidé, soutenu et encouragé tout au long de ma thèse.

Table des matières

1	Introduction générale	1
1.1	Initiation de la traduction des ARNm chez les eucaryotes	1
1.1.1	Éléments <i>cis</i> des ARNm importants à l'initiation de la traduction	4
1.1.1.1	La coiffe à l'extrémité 5' des ARNm des eucaryotes .	4
1.1.1.2	Les éléments en <i>cis</i> dans la région 5' non codante . .	6
1.1.1.3	Les éléments en <i>cis</i> dans la région 3' non codante . .	9
1.1.2	Mécanisme de l'initiation de la traduction eucaryotique par la voie classique, « <i>initiation coiffe dépendante</i> »	11
1.1.3	Mécanisme alternatif de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes : exemple de l'initiation de la traduction « <i>coiffe indépendante</i> »	15
1.1.3.1	IRES du groupe 1 : exemple du CrPV	17
1.1.3.2	IRES du groupe 2 : exemple de HCV	20
1.1.3.3	IRES du groupe 3 : exemple du virus de la fièvre aphteuse (FMDV)	25
1.1.3.4	IRES des picornaviridae du groupe 4 : exemple du poliovirus (PV)	30
1.1.3.5	IRES rencontré au sein des ARNm cellulaires	33
1.2	Histones	37
1.2.1	Structure et fonctions des histones	37
1.2.1.1	Structure des histones	38
1.2.1.2	Premier rôle des histones : Compaction de l'ADN génomique néosynthétisé	40
1.2.1.3	Deuxième rôle des histones : Régulation de l'expression génétique	45
1.2.2	Expression des histones réplication-dépendants	50
1.2.2.1	Organisation des gènes d'histones canoniques	52

1.2.2.2	Transcription des gènes d’histones canoniques	54
1.2.2.3	Maturation des ARN pré-messagers d’histones canoniques	57
1.2.2.4	Traduction des ARNm des histones réplication-dépendants	60
1.3	Avant-propos de ma thèse	64
2	Etude de l’initiation de la traduction de l’ARNm de l’histone H4	69
2.1	Introduction	69
2.2	Etudes du site de fixation du facteur eIF4E sur l’ARNm de l’histone H4	71
2.2.1	Présentation de la problématique	71
2.2.2	Approche expérimentale utilisée	72
2.2.3	Résultats et discussions	74
2.3	Étude de l’influence de la coiffe sur la structure secondaire de l’ARNm de l’histone H4	86
2.3.1	Présentation de la problématique	86
2.3.2	Approche expérimentale utilisée	86
2.3.3	Résultats et Discussions	88
2.4	Conclusions	91
3	Etude de l’initiation de la traduction des ARNm codant pour les histones H2A, H2B et H3	97
3.1	Introduction	97
3.2	Choix et préparation du matériel génétique utilisé pendant la thèse	98
3.3	Etude de l’efficacité de la traduction des ARNm d’histones	101
3.3.1	Présentation de la problématique	101
3.3.2	Approche expérimentale utilisée	101
3.3.3	Résultats et discussions	102
3.4	Etude de l’influence des UTR dans la traduction des ARNm d’H2A, H2B et H3	107
3.4.1	Présentation de la problématique	107
3.4.2	Approche expérimentale utilisée	107
3.4.3	Résultats et discussions	108
3.5	Etude de l’influence de la structure coiffe dans la traduction des ARNm d’H2A, H2B et H3	112
3.5.1	Présentation de la problématique	112

3.5.2	Approche expérimentale utilisée	113
3.5.3	Résultats et discussions	114
3.6	Test d'intégrité	117
3.7	Conclusions	118
4	Etude fonctionnelle de la traduction de l'ARNm codant pour l'histone H3	123
4.1	Introduction	123
4.2	Étude du mode de recrutement du ribosome sur l'ARNm de l'histone H3	124
4.2.1	Caractérisation des complexes ribosomiques sur l'ARNm de l'histone H3	124
4.2.1.1	Présentation de la problématique	124
4.2.1.2	Approche expérimentale utilisée	125
4.2.1.3	Résultats et discussions	127
4.2.2	Localisation du complexe initiateur formé sur l'ARNm de l'histone H3	131
4.2.2.1	Présentation de la problématique	131
4.2.2.2	Approche expérimentale utilisée	132
4.2.2.3	Résultats et discussions	133
4.3	Étude des éléments agissant en <i>trans</i> dans la traduction de l'ARNm d'H3	137
4.3.1	Étude du facteur eIF4G et de son implication dans la traduction de l'ARNm de l'histone H3	137
4.3.1.1	Présentation de la problématique	137
4.3.1.2	Approche expérimentale utilisée	139
4.3.1.3	Résultats et discussions	140
4.3.2	Recherche de sites internes de fixation du facteur eIF4E sur l'ARNm de l'histone H3	143
4.3.2.1	Présentation de la problématique	143
4.3.2.2	Approche expérimentale utilisée	144
4.3.2.3	Résultats et discussions	144
4.4	Conclusions	148
5	Etude structurale de l'ARNm de l'histone H3	153
5.1	Introduction	153
5.2	Prédiction de la structure secondaire par l'approche bioinformatique . .	155
5.2.1	Présentation de la problématique	155

5.2.2	Résultats et discussions	157
5.3	Prédiction de la structure secondaire par une approche expérimentale . .	165
5.3.1	Présentation de la problématique	165
5.3.2	Approche expérimentale utilisée	165
5.3.3	Résultats et discussions	169
5.4	Étude du site de fixation du facteur eIF4E au regard de la structure secondaire de l'ARNm de l'histone H3	183
5.4.1	Présentation de la problématique	183
5.4.2	Approche expérimentale utilisée	184
5.4.3	Résultats et discussions	184
5.5	Conclusions	188
6	Conclusions générales et perspectives	191
A	Matériel et méthodes	201
A.1	Tampons et solutions couramment utilisés	201
A.2	Matériel biologique	202
A.3	Techniques couramment utilisées	203
A.3.1	Précipitation des acides nucléiques	203
A.3.2	Extraction au phénol et phénol/chloroforme	204
A.3.3	Amplification en chaîne par polymérisation (PCR « <i>Polymerase Chain Reaction</i> »)	204
A.3.4	Transcription par la T7 ARN polymérase	205
A.3.5	Purification des ARN transcrits	206
A.3.6	Marquage radioactif des acides nucléiques	207
A.3.6.1	Marquage radioactif de l'extrémité 5' par la T4 polynucléotide kinase	207
A.3.6.2	Marquage radioactif de l'extrémité 3' par la T4 ARN ligase	208
A.4	Traduction des transcrits	208
A.4.1	Traduction dans le lysat du réticulocyte de lapin (RRL, « <i>Rabbit Reticulocyte Lysate</i> »)	208
A.4.2	Traduction dans les extraits du germe de blé (WGE, « <i>Wheat Germ Extract</i> »)	209
A.4.3	RT-PCR « <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i> »	209
A.5	Sondage en solution des ARN	210

A.5.1	Sondage enzymatique	210
A.5.2	Sondage chimique	211
A.5.3	Détection des coupures ou des modifications obtenues au cours des expériences sondages en solutions	212
A.5.3.1	Détection directe des coupures des ARN radioactifs .	212
A.5.3.2	Détection indirecte des coupures ou modifications . .	213
A.6	Étude des interactions ARN/protéines	214
A.6.1	Gel de retard (EMSA, « <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> »)	214
A.6.2	Empreinte de la protéine sur l'ARN	214
A.7	Expériences de « <i>toe-printing</i> »	215
A.8	Séparation des complexes ribosomiques sur gradient de sucrose	216
B	Abbréviations	219
	Bibliographie	227

Table des figures

1.1	Vue globale des éléments en <i>cis</i> des ARNm importants à l'initiation de leur traduction	3
1.2	Maturation de l'extrémité 5' des ARNm des eucaryotes	5
1.3	Interaction entre la coiffe des ARNm et le facteur eIF4E	6
1.4	Représentation schématique de la maturation de l'extrémité 3' des ARNm des métazoaires	10
1.5	Les facteurs d'initiation de la traduction des eucaryotes	12
1.6	La voie classique de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes	13
1.7	La structure des IRES des dicistroviridae	19
1.8	Structure de l'IRES d'HCV	22
1.9	Comparaison entre les modèles des complexes 40S/eIF3/IRES d'HCV et 40S/eIF3/eIF4G, obtenus par cryo-EM	24
1.10	Initiation de la traduction via l'IRES du FMDV	28
1.10	Initiation de la traduction via l'IRES du FMDV	29
1.11	Initiation de la traduction via l'IRES du poliovirus	31
1.12	Exemples de modèles d'action de certains ITAF dans le recrutement du ribosome sur les IRES cellulaires	36
1.13	Structure tridimensionnelle du nucléosome	39
1.14	Organisation de l'ADN génomique dans les cellules eucaryotiques	41
1.15	Anatomie des nucléosomes et des chaperonnes d'histones.	43
1.16	Représentation de différents types de modifications post-transcriptionnelles observées au sein d'un octamère d'histone.	46
1.17	Modèles du dépôt des histones lors de la réplication.	49
1.18	Représentation globale du métabolisme des ARNm des histones canoniques au sein des cellules des mammifères.	51
1.19	Représentation de l'organisation des gènes d'histones réplication-dépendant de la souris.	54

1.20	Modèle de la régulation de la transcription des gènes d'histones.	56
1.21	Structure et maturation des ARNm des histones canoniques.	58
1.22	Régulation des ARNm des histones canoniques en fonction du cycle cellulaire	61
2.1	Représentation schématique de la structure secondaire de 4E-SE et de la séquence minimale de fixation de eIF4E	70
2.2	Principe de l'expérience d'empreinte de la protéine par voie indirecte .	73
2.3	Identification des concentrations optimales pour l'expérience d'empreinte du facteur eIF4E	76
2.4	Résultats d'empreinte du facteur eIF4E sur l'ARNm d'H4	77
2.4	Résultats d'empreinte du facteur eIF4E sur l'ARNm d'H4	78
2.5	Coupures par les RNases V1 et S1 sur le modèle de la structure secondaire de l'ARNm d'H4	80
2.5	Coupures par les RNases V1 et S1 sur le modèle de la structure secondaire de l'ARNm d'H4	81
2.6	Empreintes du facteur eIF4E sur le modèle de la structure secondaire de l'ARNm d'H4	82
2.6	Empreintes du facteur eIF4E sur le modèle de la structure secondaire de l'ARNm d'H4	83
2.7	Représentation schématique des éléments structuraux pouvant participer à la fixation du facteur eIF4E	83
2.8	Remaniements structuraux de la jonction à trois hélices par le facteur eIF4E	85
2.9	Variations d'intensité dans la réactivité aux RNases V1 et S1 entre les ARNm coiffés et non coiffés de l'histone H4	88
2.9	Variations d'intensité dans la réactivité aux RNases V1 et S1 entre les ARNm coiffés et non coiffés de l'histone H4	89
2.10	Représentation simplifiée du modèle d'initiation de la traduction de l'ARNm d'H4	92
2.10	Représentation simplifiée du modèle d'initiation de la traduction de l'ARNm d'H4	93
3.1	Tableau résumant les gènes d'histones réplication-dépendants de H2A, H2B et H3, provenant de <i>Mus musculus</i>	99
3.2	Comparaison d'efficacité de traduction <i>in vitro</i> entre les ARNm des quatre classes d'histones et l'ARNm conventionnel (GFP)	103

3.3	Comparaison de l'efficacité de la traduction de l'ARNm de l'histone H3 par rapport à des ARNm conventionnels, CP (coat protein) et <i>fLuc</i> (firefly Luciferase)	106
3.4	Comparaison de l'efficacité de traduction des ARNm des histones H2A, H2B et H3 délétés de leurs UTR.	109
3.5	Courbe d'efficacité de la traduction des histones H2A, H2B et H3 en présence d'analogue de la coiffe	116
3.6	Trois gels représentatifs de l'expérience de RT-PCR, vérifiant l'intégrité des ARNm des histones H2A, H2B et H3	118
4.1	Représentation schématique des étapes de l'expérience de gradient de sucrose	126
4.2	Blocage des complexes d'initiation aux inhibiteurs	127
4.3	Séparation des complexes d'initiation formés sur l'ARNm d'H3 en absence ou en présence d'inhibiteur	128
4.3	Séparation des complexes d'initiation formés sur l'ARNm d'H3 en absence ou en présence d'inhibiteur	129
4.4	Principe de l'expérience de « <i>toe-print</i> » du ribosome sur un ARNm	134
4.5	Localisation des complexes d'initiation formés sur l'ARNm d'H3	135
4.6	Rôle du facteur eIF4G dans l'initiation de la traduction conventionnelle	138
4.7	Étude du facteur eIF4G dans la traduction de l'ARNm d'H3	141
4.8	Trois gels représentatifs d'EMSA issus d'une étude des interactions entre le facteur eIF4E et l'ARNm de l'histone H3	145
4.9	La mise en évidence de trois domaines internes de l'ARNm de l'histone H3 fixant le facteur de la coiffe eIF4E	148
4.9	La mise en évidence de trois domaines internes de l'ARNm de l'histone H3 fixant le facteur de la coiffe eIF4E	149
5.1	Représentation schématique de la structure secondaire d'un ARN	154
5.2	Comparaison de neuf séquences d'ADN génomique d'histones H3 du <i>Mus musculus</i>	158
5.2	Comparaison de neuf séquences d'ADN génomique d'histones H3 du <i>Mus musculus</i>	159
5.3	Prédiction par l'approche bioinformatique du repliement du 5'UTR des ARNm de l'histone H3, provenant du <i>Mus musculus</i>	160
5.4	Alignement de vingt-trois séquences codantes d'ARNm d'histone H3	162
5.4	Alignement de vingt-trois séquences codantes d'ARNm d'histone H3	163
5.5	Sondage enzymatique de l'ARNm de l'histone H3 par voie indirecte	170

5.5	Sondage enzymatique de l'ARNm de l'histone H3 par voie indirecte . . .	171
5.6	Sondage chimique de l'ARNm de l'histone H3 par voie indirecte	172
5.6	Sondage chimique de l'ARNm de l'histone H3 par voie indirecte	173
5.7	Mise en évidence d'une seule conformation de l'ARNm d'H3	175
5.8	Sondages chimique et enzymatique de l'ARNm de l'histone H3 par voie directe	177
5.9	Modèle de la structure secondaire de l'ARNm de l'histone H3	178
5.9	Modèle de la structure secondaire de l'ARNm de l'histone H3	179
5.10	Annotation de la structure secondaire de l'ARNm de l'histone H3	182
5.11	Identification des motifs structuraux impliqués dans la fixation interne du facteur eIF4E	185

Chapitre 1

Introduction générale

1.1 Initiation de la traduction des ARNm chez les eucaryotes

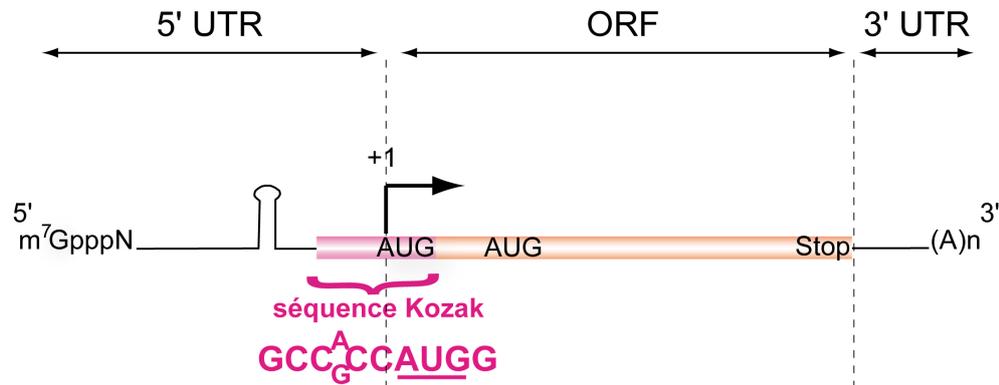
La synthèse des protéines est un processus universellement conservé, s'intégrant comme l'une des étapes cruciales de l'expression génétique. Elle consiste à décoder l'information génétique, inscrite sous forme d'ARN messagers (ARNm), en protéines structurales et fonctionnelles, nécessaires au bon fonctionnement cellulaire. Cette traduction des ARNm en protéines est assurée grâce aux complexes ribonucléoprotéiques, également appelés ribosomes, et aux ARN de transfert (ARNt), faisant le lien entre les codons du messenger et les acides aminés qui leur correspondent. Chez les eucaryotes, les ribosomes sont des complexes de 80S, composés d'une petite (40S) et d'une grande (60S) sous-unité ribosomique, et comprenant trois sites de fixation des ARNt : le site A (Aminoacyl), le site P (Peptidyl) et le site E (Exit). Le processus de la synthèse des protéines est coordonné par de nombreux facteurs protéiques, permettant également la régulation de l'expression d'une protéine donnée au cours du cycle cellulaire.

Le déroulement de la traduction des ARNm en protéines peut être divisé en quatre étapes majeures. La première est l'étape de l'initiation, qui consiste au recrutement du ribosome sur l'ARNm et en son positionnement sur le bon codon initiateur. La seconde est l'étape de l'élongation, durant laquelle l'ARNm est décodé en protéine. Durant la troisième étape de la traduction, appelée terminaison, la protéine néosynthétisée est libérée et le ribosome peut éventuellement se détacher du messenger et se dissocier en deux sous-unités ribosomiques. Enfin, la quatrième étape est observée lorsque le ribosome n'est pas détaché de l'ARN, mais recyclé du codon de terminaison vers le codon d'initiation, c'est l'étape du recyclage. Cette réutilisation du ribosome permet de contourner l'étape de l'initiation, qui constitue une étape critique et limitante de la traduction, rendant ainsi la synthèse protéique plus efficace (Groppo and Richter, 2009).

En effet, l'initiation est l'étape la plus complexe et la plus régulée de la traduction. Son contrôle s'effectue au niveau des interactions se produisant entre les éléments agissant en *cis* et en *trans*, qui sont spécifiques pour chaque ARNm. Les éléments agissant en *cis* sont des éléments propres aux ARNm, tandis que les éléments en *trans* correspondent aux facteurs protéiques tels que les eIF « *eukaryotic Initiation Factor* » ou les ITAF « *IRES Trans-Acting Factors* ». Le rôle de ces facteurs protéiques est de reconnaître les éléments en *cis* des ARNm et de gérer des interactions avec les partenaires nécessaires au démarrage de la synthèse protéique.

L'étude de l'initiation de la traduction représentant ainsi une étape incontournable dans la compréhension de l'expression d'une protéine, elle constitue le principal sujet de ma thèse. Dans la première partie de l'introduction générale, je décrirai donc les éléments en *cis* des ARNm et les stratégies les plus fréquemment employées dans l'initiation de la traduction chez le système eucaryotique. Après avoir décrit la voie classique du mode de recrutement des ribosomes, je présenterai une voie alternative très étudiée, appelée « *voie coiffe indépendante* ».

A ARNm classique



B ARNm contenant un IRES



C ARNm contenant un CITE



FIG. 1.1 – Vue globale des éléments en *cis* des ARNm importants à l'initiation de leur traduction

(A) Les éléments en *cis* des ARNm conventionnels. De l'extrémité 5' vers 3' sont indiquées : la « *structure-coiffe* » (m^7GpppN) ; la région 5' non codante (5'UTR) ; la séquence Kozak ; la région 3' non codante (3'UTR) ; la queue poly(A). (B) Exemple de l'ARN du poliovirus, représentant les ARNm contenant un IRES dans leur 5'UTR. Les éléments en *cis*, impliqués dans l'initiation de la traduction, sont constitués d'une structure très complexe dans la région 5' non codante. La séquence riche en pyrimidines, impliquée dans les interactions avec les ITAF et caractéristique des picornavirus, est surlignée en bleu. (C) Exemple de l'ARN viral de la « *jaunisse nanisante de l'orge* », représentant les ARNm contenant un CITE dans leur 3'UTR. Les éléments en *cis* cruciaux au démarrage de la traduction sont constitués d'une structure très complexe dans la région 3' non codante (3'UTR), capable d'interagir avec les facteurs eIF et avec la structure secondaire dans la partie 5'UTR. La séquence codante (ORF) est délimitée par les traits en pointillés. La position (+1) correspond au premier résidu traduit (adénosine du codon initiateur).

1.1.1 Éléments *cis* des ARNm importants à l'initiation de la traduction

La régulation de l'initiation de la traduction nécessite un certain nombre d'éléments localisés au sein de la séquence des ARNm. L'importance de ces éléments agissant en *cis* réside dans le fait qu'ils vont dicter la voie et le site de recrutement du ribosome sur l'ARNm. Leur perturbation peut donc conduire en une diminution de l'efficacité et en une perte de la fidélité de la traduction. Ces éléments peuvent être de différents types, assurant l'expression d'ARNm particuliers à des moments spécifiques du cycle cellulaire. Le rôle de certains d'entre eux est présenté dans les paragraphes qui suivent (*cf. Fig. 1.1*).

1.1.1.1 La coiffe à l'extrémité 5' des ARNm des eucaryotes

L'un des éléments importants à l'initiation de la traduction est la structure coiffe, $m^7G(5')ppp(5')N$ située à l'extrémité 5' des ARNm eucaryotiques (m^7G signifiant 7-méthylguanosine, p représentant un groupement phosphate et N étant le premier ribonucléotide de la chaîne d'ARN). Ce lien 5'-5' contraste avec la liaison phosphodiester 3'-5', qui relie les ribonucléotides de la chaîne d'ARN (*cf. Fig. 1.2-B*).

Cette structure est ajoutée au moment de la maturation des ARN néosynthétisés lors de la transcription, par l'action de trois enzymes (*cf. Fig. 1.2-A*). La première est une ARN-triphosphatase (RTase) qui hydrolyse l'extrémité 5', produisant l'ARN-diphosphate ($pp(5')N(pN)n$). La seconde est une ARN-guanylyltransférase (GTase), qui catalyse l'ajout de GMP à l'ARN-diphosphate afin de produire la $G(5')ppp(5')N(pN)n$ via une réaction réversible en deux étapes. D'abord, la guanylyltransférase réagit avec l' α -phosphate du GTP, formant un intermédiaire enzyme-GMP, (EpG) et libérant du pyrophosphate (PPi). Le GMP est ensuite transféré de l'EpG au $pp(5')N(pN)n$ pour créer $G(5')ppp(5')N(pN)n$, et l'enzyme est régénérée. Enfin, une ARN-(guanine-7)-

1.1 Initiation de la traduction des ARNm chez les eucaryotes

méthyltransférase (MTase) catalyse la méthylation à la position N7 de la guanosine de la coiffe, afin de produire la $m^7G(5')ppp(5')N(pN)n$. La S-adénosylméthionine (SAM) est utilisée comme donneur du groupement méthyle.

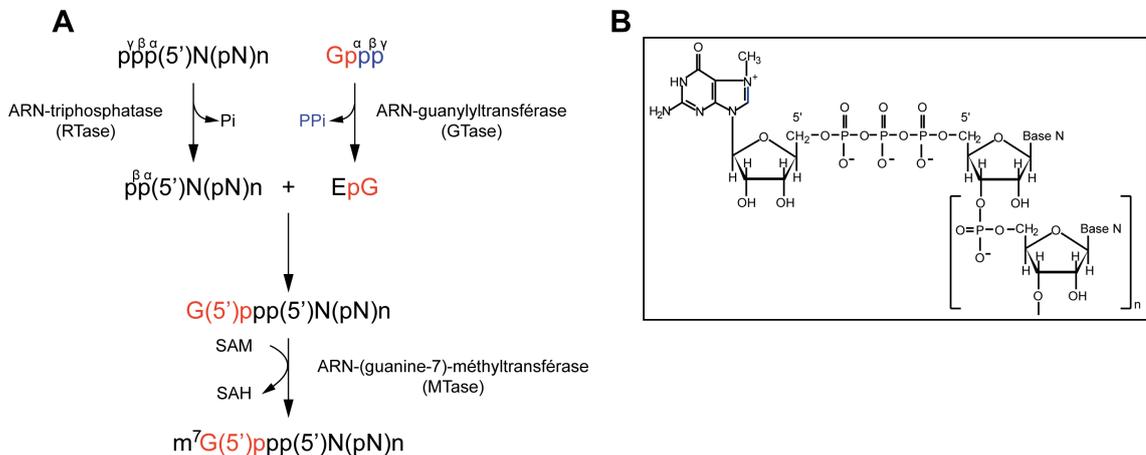


FIG. 1.2 – Maturation de l'extrémité 5' des ARNm des eucaryotes

(A) Une succession de trois réactions enzymatiques, aboutissant à une addition de la structure coiffe à l'extrémité 5' de l'ARN, dont la formule chimique est représentée en (B). Figure adaptée d'après (Gu and Lima, 2005).

La coiffe joue un rôle crucial dans le métabolisme des ARN. Ainsi, elle permet le prolongement de la demi-vie des ARNm en les protégeant des hydrolyses par les exonucléases. De plus, elle participe à l'épissage et au transport des ARN du noyau vers le cytoplasme. Enfin, des essais de traduction *in vitro* ont montré que cette structure augmentait l'efficacité de la synthèse protéique, du fait de sa grande importance pour l'initiation de la traduction (Cowling, 2009). En effet, elle favorise le recrutement des ribosomes par l'intermédiaire du facteur de la coiffe eIF4E. La spécificité de l'interaction entre ce facteur et la coiffe résulte principalement de l'empilement des liaisons cation- π entre Trp₅₆ et Trp₁₀₂ et des liaisons hydrogènes entre Glu₁₀₃ et les protons N1 et N2 de la 7-méthylguanine. (*cf.* Fig. 1.3).

Le facteur eIF4E appartient au complexe protéique eIF4F, qui est capable d'interagir avec le complexe de 43S, comprenant la petite sous-unité ribosomique 40S, du Mét-ARNt^{Met} et les facteurs eIF1, eIF1A, eIF2 et eIF3. Ce mode de recrutement

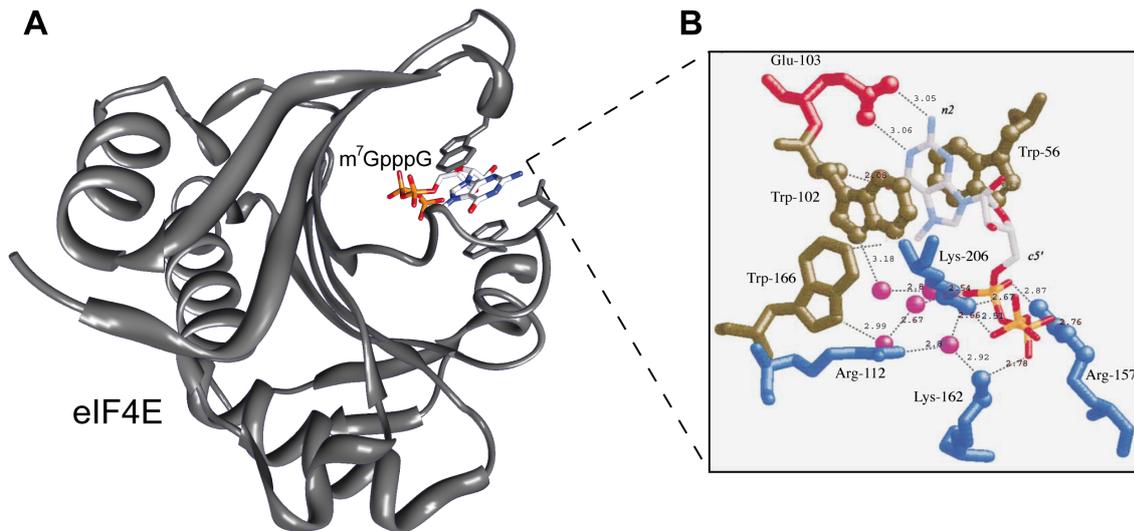


FIG. 1.3 – Interaction entre la coiffe des ARNm et le facteur eIF4E

(A) Représentation de la structure du complexe eIF4E/m⁷GpppG résolu à 1,8Å par la méthode de cristallographie par diffraction de rayons X. (B) Détails des interactions se produisant au sein de ce complexe. Les liaisons hydrogènes, les ponts salins ainsi que les interactions de Van der Waals, dont les longueurs sont exprimées en Å, sont indiqués par des lignes pointillées. Les molécules d'eau, piégées et supportant le réseau des liaisons hydrogènes, sont symbolisées par des sphères en magenta. Les résidus d'eIF4E, dont la distance à la coiffe est inférieure à 4Å, sont présentés sous forme de sphères (Niedzwiecka et al., 2002).

des ribosomes est appelé voie « *coiffe dépendante* » et représente la voie classique empruntée par la plupart des ARNm cellulaires (Jackson et al., 2010).

1.1.1.2 Les éléments en *cis* dans la région 5' non codante

Une fois recruté, le ribosome doit être positionné sur le codon initiateur AUG, localisé en 5' de l'ARNm, afin d'entrer dans l'étape d'élongation. De nombreux éléments peuvent influencer ce positionnement, parmi lesquels on retrouve le contexte du codon initiateur, situé dans la région 5' non traduite (5'UTR « *UnTranslated Region* »). Dans le cas des ARNm dont la traduction est coiffe-dépendante, le codon initiateur doit être localisé dans une séquence favorable, appelée séquence Kozak. Celle-ci permet de ralentir la petite sous-unité ribosomique, lorsqu'elle « *glisse* » le long du 5' UTR à la recherche du codon initiateur, afin que l'interaction entre le codon AUG

1.1 Initiation de la traduction des ARNm chez les eucaryotes

et l'anticodon du Mét-ARNt^{Met} puisse se faire. La séquence Kozak est caractérisée par la présence d'une purine, de préférence A, à la position -3 et d'une guanine à la position +4 (la position +1 correspondant au résidu A de l'AUG et les positions étant données relativement à ce nucléotide dans le sens 5' vers 3'). Il a également été suggéré que ces deux positions affectaient la sélection du codon d'initiation par la stabilisation des changements conformationnels qui se produisent au moment de l'appariement codon-anticodon, en interagissant avec la sous-unité du facteur eIF2 (eIF2- α) et les nucléotides A₁₈₁₈A₁₈₁₉ de l'hélice de l'ARNr 18S, qui font partie du site A du ribosome. La séquence Kozak augmente donc l'efficacité de la traduction à partir de l'AUG qu'elle entoure (Jackson et al., 2010)(Kozak, 1987). Le ralentissement qui permet la reconnaissance du codon initiation par la petite sous-unité ribosomique peut également être facilitée par la présence d'un élément structural localisé 13-17nt en aval de cet AUG, même si ce dernier se trouve dans un contexte peu favorable (Kochetov, 2008). De plus, la position du codon initiateur AUG par rapport aux autres AUG est également importante. En effet, il a été montré que la traduction était initiée préférentiellement sur le codon initiateur, se trouvant dans une séquence favorable, localisé le plus près du site de recrutement du ribosome (Jackson et al., 2010)(Kozak, 1987).

Par ailleurs, d'autres éléments agissant en *cis* peuvent également influencer le choix du codon initiateur, c'est le cas notamment de la coiffe, de la queue poly(A) ou de la région 5'UTR (Preiss and Hentze, 1998), dont la délétion résulte en une initiation de la traduction sur l'AUG suivant (Kozak, 1991b).

La présence d'uORF « *upstream Open Reading Frames* » dans le 5'UTR de certains ARNm cellulaires, et plus particulièrement de ceux appartenant au groupe des proto-oncogènes, permet la régulation de la traduction de ces messagers. Ces séquences codantes sont caractérisées par une courte phase de lecture et se retrouvent très souvent juxtaposées les unes aux autres. En règle générale, leur présence permet de modérer l'expression de la protéine, comme c'est le cas de l'ARNm codant pour la protéine BACE1 (principale β -secretase du système nerveux central). Le contournement de ce

mécanisme inhibiteur conduit à une stimulation de la synthèse de cette protéine, laquelle est associée dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer (Chatterjee and Pal, 2009).

La longueur de la région 5' non codante est également un élément en *cis* important dans l'initiation de la traduction. En effet, elle va dicter l'efficacité et la voie de recrutement du ribosome. Chez les eucaryotes, la taille du 5'UTR varie entre 20 et 100nt, et chez les humains elle est en moyenne de 210nt (Kozak, 1987) (Chatterjee and Pal, 2009). Toutefois, l'efficacité de la traduction pour un ARNm classique par la voie coiffe-dépendante nécessite une longueur d'environ 50nt. L'augmentation ou la diminution de la taille du 5'UTR résulte en une perte d'efficacité dans la traduction (Chappell et al., 2006). Cependant, les ARNm contenant un 5'UTR dont la taille n'est pas optimale au regard de l'efficacité de la traduction peuvent contourner ce problème par des mécanismes alternatifs de recrutement du ribosome.

Dans le cas des ARNm dépourvus de région 5' non codante ou possédant une séquence très courte, deux mécanismes peuvent être employés. Le premier mécanisme est le « *leaky scanning* », dans lequel la petite sous-unité ribosomique va glisser jusqu'au codon initiateur suivant et initier la traduction d'une protéine tronquée de sa partie N-terminale (Kozak, 1991b)(Kochetov, 2008). Le second mécanisme est employé par les ARNm naturellement « *leaderless* », il s'agit d'un recrutement du ribosome 80S déjà préassemblé et contenant le Mét-ARNt^{Met} faisant office d'ancrage sur l'ARNm par son interaction avec le codon initiateur (Andreev et al., 2006). À l'inverse des ARN *leaderless*, les ARNm possédant de grandes régions 5' non codantes, peuvent contenir dans celles-ci des régions appelées IRES, « *Internal Ribosome Entry Sites* ». Ces régions adoptent une structure secondaire très complexe et créent une affinité pour le ribosome et les facteurs protéiques. Les ribosomes peuvent ainsi être recrutés de façon interne, à proximité du codon initiateur (Balvay et al., 2009) (*cf.* §1.1.2).

1.1.1.3 Les éléments en *cis* dans la région 3' non codante

La région 3' non codante des ARNm présente également un certain nombre d'éléments agissant en *cis* dans la régulation de l'initiation de la traduction. Dans le cas des ARNm classiques, l'extrémité 3' est polyadénylée au moment de la maturation des ARN pré-messagers. Tout comme la structure coiffe, cette queue poly(A) des ARNm matures peut remplir de multiples fonctions. Elle contribue par exemple à stabiliser l'ARNm, en procurant une protection de l'extrémité 3' contre une dégradation précoce par des nucléases. Elle participe également au transport nucléo-cytoplasmique des ARN. Enfin, son rôle est essentiel dans le mécanisme d'initiation de la traduction (Millevoi and Vagner, 2010). En effet, il a été montré que dans le lysat de réticulocytes de lapin (RRL), les ARNm possédant une queue poly(A) étaient plus efficacement traduits que ceux dépourvus de cette séquence. Cette séquence d'adénosines en 3'UTR est reconnue par des protéines appelées PABP « *Poly(A) Binding Protein* », qui possèdent un site d'interaction avec le facteur eIF4G du complexe de la coiffe. L'interaction entre la protéine PABP et le facteur eIF4G permet la circularisation de l'ARNm et le recyclage des ribosomes du codon de terminaison vers le codon d'initiation, augmentant ainsi l'efficacité de la traduction (Jackson et al., 2010). La maturation de l'extrémité 3' des ARN pré-messagers s'effectue dans le noyau cellulaire, durant l'étape de transcription. Elle consiste en la reconnaissance des signaux poly(A), localisés au sein de ces ARN, par la machinerie du clivage/polyadénylation (*cf. Fig. 1.4*) et joue un rôle important dans l'expression des gènes. En effet, il a été montré que plus de la moitié des gènes humains pouvaient présenter plusieurs signaux fonctionnels de polyadénylation. En variant le site de clivage à l'extrémité 3' des ARN pré-messagers, des motifs de séquence additionnels peuvent être inclus ou au contraire exclus de l'extrémité 3' des ARNm matures, ce qui peut par exemple affecter la stabilité du transcrit ou sa localisation. Ainsi, dans certains cas, les ARNm dont la région non codante est « *tronquée* » peuvent être plus efficacement traduits, grâce à l'absence de site de fixation de microARN (Jackson et al., 2010). Une exception à ce mécanisme

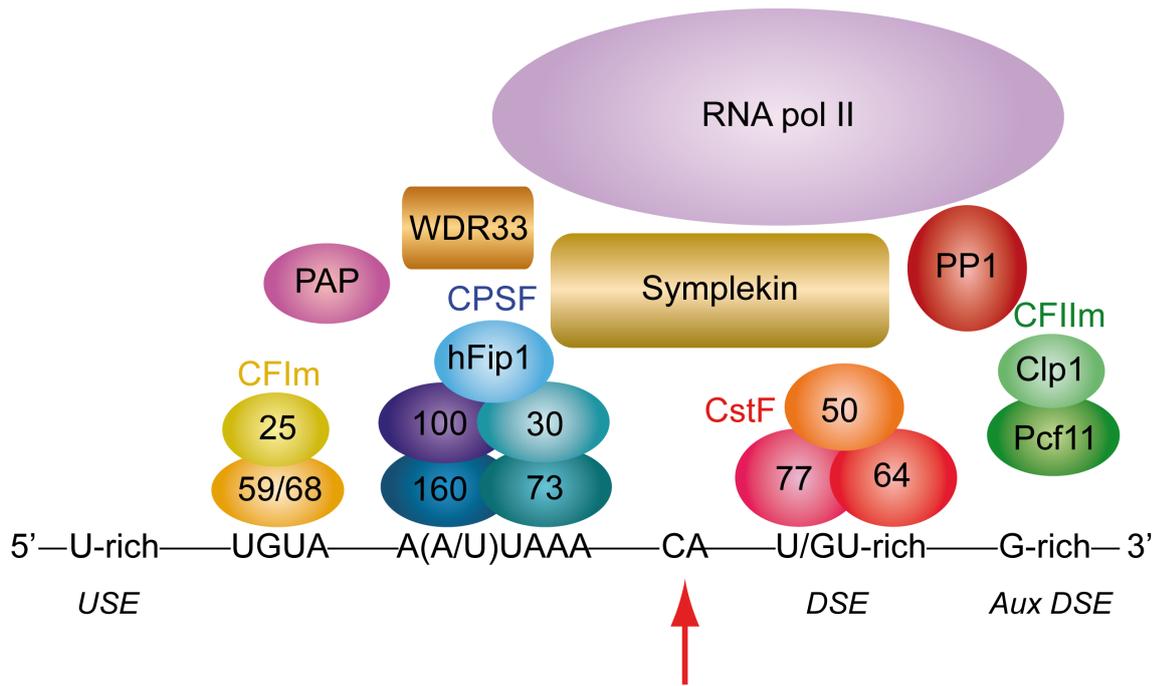


FIG. 1.4 – Représentation schématique de la maturation de l'extrémité 3' des ARNm des métazoaires

Le signal de polyadénylation est défini par deux éléments primaires de séquence : l'hexamère A(A/U)UAAA, localisé 10-30nt en amont du site de clivage (indiqué par une flèche rouge), qui fixe le complexe CPSF « *cleavage and polyadenylation specificity factor* », et la région riche en U/GU (DSE « *downstream sequence élément* »), située 30nt en aval du site de clivage, reconnue par CstF « *cleavage stimulation factor* ». La reconnaissance du signal poly(A), en absence de l'élément primaire canonique A(A/U)UAAA, dépend de la présence du motif de séquence UGUA, en amont de celui-ci, qui fonctionne en association avec CFIIm « *cleavage factor I* ». Le site optimal de clivage est généralement un dinucléotide CA et cette coupure est catalysée du côté 3' du résidu adénosine par la sous-unité de 73kDa de CPSF. Ce processus requière plus de 50 protéines (~85 chez l'humain) parmi lesquelles sont retrouvées WDR33 « *WD repeat domain 33* » et la phosphoprotéine phosphatase 1 (PP1). L'efficacité de la maturation de l'extrémité 3' est modulée par des éléments de séquence additionnels localisés en amont (USE « *upstream sequence element* ») ou en aval (AuxDSE « *auxiliary downstream sequence element* ») du site de coupure. Les séquences USE sont généralement riches en résidus U et servent d'ancrage additionnel pour la machinerie de maturation du 3' des ARN en recrutant les facteurs auxiliaires ou essentielles à ce processus. Les séquences AuxDSE sont généralement riches en résidus G et fixent les facteurs de régulation, qui stimulent la maturation de l'extrémité 3' des ARNm. L'addition de la queue poly(A) est catalysée par la poly(A) polymérase (PAP) en utilisant l'ATP comme substrat. La longueur de cette queue poly(A) est contrôlée par la protéine PABP « *poly(A) binding protein* » via la régulation de l'interaction entre CPSF et PAP. Figure adaptée d'après (Millevoi and Vagner, 2010).

classique de la maturation de l'extrémité 3' des ARNm peut être illustrée par celle des ARNm codant pour les histones réplication dépendants, dont l'extrémité 3' se

termine par une tige-boucle qui joue un rôle analogue à la queue poly(A) (cf. §1.2.2) (Marzluff et al., 2008). Par ailleurs, les régions 3' non codantes peuvent également contenir des éléments atypiques agissant en *cis*, c'est le cas notamment de certains ARN viraux infectant les plantes. Ces éléments sont appelés CITE « *cap-independent translation element* ». Ils sont caractérisés par une structure secondaire très particulière, qui présente une affinité pour certains facteurs d'initiation de la traduction. Ainsi, ces éléments facilitent le recrutement du ribosome à l'extrémité 5' de l'ARN par la voie « *coiffe indépendante* » (Miller et al., 2007).

1.1.2 Mécanisme de l'initiation de la traduction eucaryotique par la voie classique, « *initiation coiffe dépendante* »

La voie classique est la stratégie principale d'initiation de la traduction employée par la plupart des ARNm cellulaires d'eucaryotes, impliquant un certain nombre d'éléments propres à ces messagers monocistroniques, tels que la structure coiffe $m^7G(5')ppp(5')N$ en 5' et une queue poly(A) en 3'. L'ensemble de ces éléments en *cis* participent aux multiples interactions moléculaires avec une douzaine de facteurs d'initiation (eIF), assurant ainsi le positionnement correcte du ribosome, en même temps qu'une reconnaissance du codon d'initiation AUG par l'anticodon de l'ARNt initiateur chargé d'un résidu méthionine (Mét-ARNt^{Met}_i), situé dans le site P du ribosome (cf. Fig. 1.5).

Ce mécanisme très complexe peut être divisé en plusieurs étapes qui nécessitent la présence de deux sous-unités ribosomiques séparées (Jackson et al., 2010) (Lorsch and Dever, 2010)(Merrick, 2010)(Groppo and Richter, 2009). Cette séparation est assurée par les facteurs eIF1A et eIF3, lorsqu'ils sont fixés à la petite sous-unité 40S (Jackson et al., 2010)(Kolupaeva et al., 2005) (cf. Fig. 1.6).

Ainsi, la traduction débute par la formation du complexe ternaire (eIF2-GTP/Mét-ARNt^{Met}_i) par l'intermédiaire des interactions se produisant entre Mét-ARNt^{Met}_i et

CHAPITRE 1 : Introduction générale

Name	Number of subunits and their molecular mass (kDa)	Function
Core initiation factors		
eIF2	3 (36.1, 38.4 and 51.1)	Forms an eIF2-GTP-Met-tRNA _i ternary complex that binds to the 40S subunit, thus mediating ribosomal recruitment of Met-tRNA _i
eIF3	13 (800 total)	Binds 40S subunits, eIF1, eIF4G and eIF5; stimulates binding of eIF2-GTP-Met-tRNA _i to 40S subunits; promotes attachment of 43S complexes to mRNA and subsequent scanning; and possesses ribosome dissociation and anti-association activities, preventing joining of 40S and 60S subunits
eIF1	1 (12.7)	Ensures the fidelity of initiation codon selection; promotes ribosomal scanning; stimulates binding of eIF2-GTP-Met-tRNA _i to 40S subunits; and prevents premature eIF5-induced hydrolysis of eIF2-bound GTP and P _i release
eIF1A	1 (16.5)	Stimulates binding of eIF2-GTP-Met-tRNA _i to 40S subunits and cooperates with eIF1 in promoting ribosomal scanning and initiation codon selection
eIF4E	1 (24.5)	Binds to the m ⁷ GpppG 5' terminal 'cap' structure of mRNA
eIF4A*	1 (46.1)	DEAD-box ATPase and ATP-dependent RNA helicase
eIF4G [†]	1 (175.5)	Binds eIF4E, eIF4A, eIF3, PABP, SLIP1 and mRNA (see FIG. 3a) and enhances the helicase activity of eIF4A
eIF4F	3 (246.1 total)	A cap-binding complex, comprising eIF4E, eIF4A and eIF4G; unwinds the 5' proximal region of mRNA and mediates the attachment of 43S complexes to it; and assists ribosomal complexes during scanning
eIF4B	1 (69.3)	An RNA-binding protein that enhances the helicase activity of eIF4A
eIF4H	1 (27.4)	An RNA-binding protein that enhances the helicase activity of eIF4A and is homologous to a fragment of eIF4B
eIF5	1 (49.2)	A GTPase-activating protein, specific for GTP-bound eIF2, that induces hydrolysis of eIF2-bound GTP on recognition of the initiation codon
eIF5B	1 (138.9)	A ribosome-dependent GTPase that mediates ribosomal subunit joining
eIF2B	5 (33.7, 39.0, 50.2, 59.7 and 80.3)	A guanosine nucleotide exchange factor that promotes GDP-GTP exchange on eIF2
Auxiliary factors		
DHX29	1 (155.3)	A DEXH box-containing protein that binds 40S subunit and promotes ribosomal scanning on mRNAs with long, highly structured 5' UTRs
Ded1	1 (65.6)	A DEAD box-containing NTPase and RNA helicase that potentially promotes scanning in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
eIF6	1 (26.6)	An anti-association factor that binds 60S subunits and prevents them from joining to 40S subunits
p97	1 (102.4)	Closely related to the carboxy-terminal two-thirds of eIF4G; binds eIF4A and eIF3; and promotes initiation in a potentially mRNA-specific manner
PABP	1 (70.7)	Binds to the 3' poly(A) tail of mRNA, eIF4G and eIF3; enhances binding of eIF4F to the cap; and might facilitate recruitment of recycled post-termination 40S subunits back to the 5' end of mRNA

FIG. 1.5 – Les facteurs d'initiation de la traduction des eucaryotes

Tableau des facteurs d'initiation nécessaires au démarrage de la traduction des ARNm des eucaryotes (Jackson et al., 2010).

le facteur hétérotrimérique eIF2, possédant une activité GTPasique. Sous cette forme, l'ARNt initiateur est recruté sur la petite sous-unité ribosomique 40S. Cette interaction est stabilisée par les facteurs eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5, conduisant ainsi à la formation d'un complexe de préinitiation 43S (Lorsch and Dever, 2010)(Passmore et al., 2007) (Mitchell and Lorsch, 2008)(Majumdar et al., 2003).

Au même moment, le complexe de la coiffe eIF4F, composé de trois sous-unités (eIF4E, eIF4G et eIF4A), se fixe à l'extrémité 5' de l'ARNm, grâce à la reconnaissance de la structure coiffe par le facteur eIF4E. Par l'intermédiaire de sa

1.1 Initiation de la traduction des ARNm chez les eucaryotes

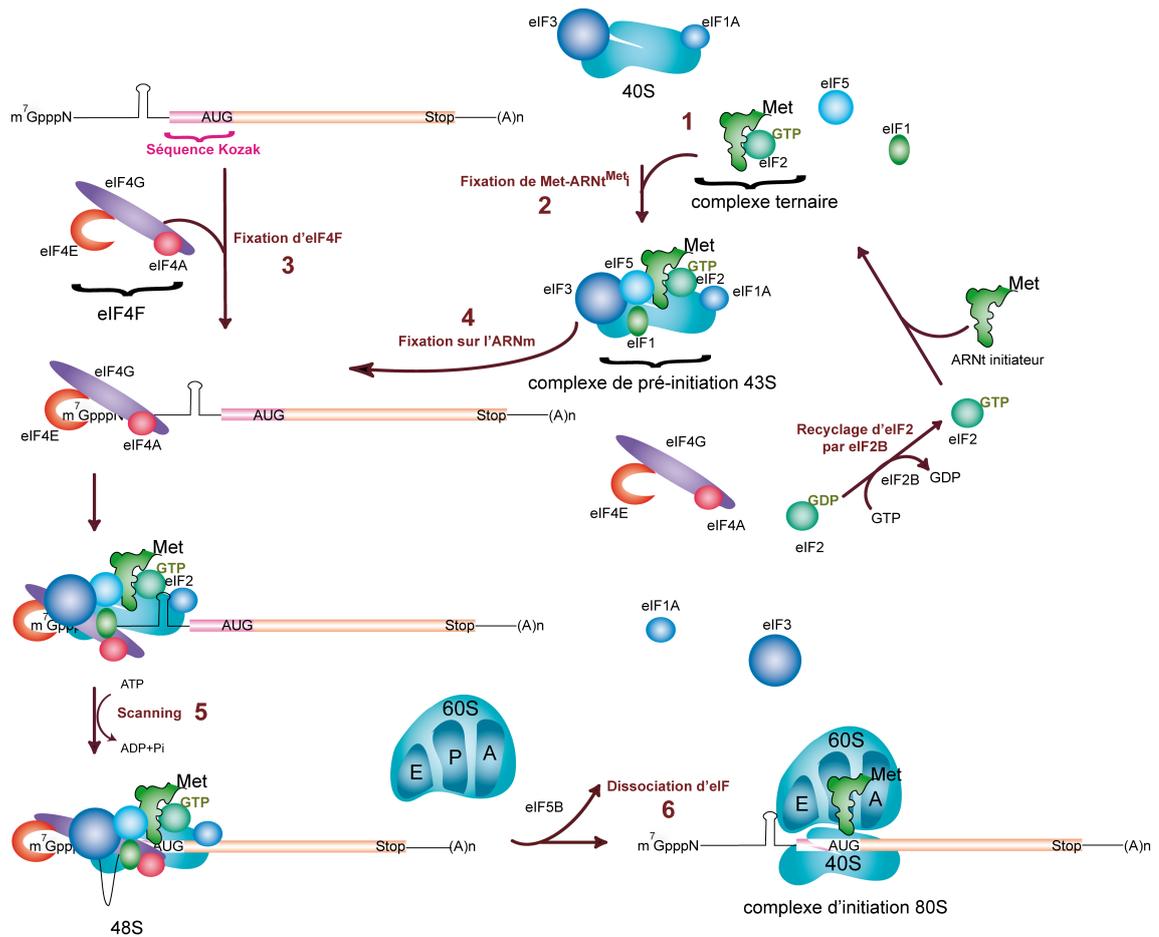


FIG. 1.6 – La voie classique de l’initiation de la traduction chez les eucaryotes

Six étapes peuvent être distinguées. 1) Assemblage du complexe ternaire, comprenant l’ARNt initiateur (Mét-ARNt^{Met}) et le facteur eIF2-GTP. 2) Fixation du complexe ternaire et des facteurs sur la petite sous-unité ribosomique pour former le complexe de préinitiation. 3) Fixation du complexe eIF4F à l’extrémité 5’ de l’ARN, grâce à l’interaction entre le facteur eIF4E et la coiffe du messager. 4) Recrutement du complexe de préinitiation 43S sur l’extrémité 5’ de l’ARNm, grâce aux interactions entre le facteur eIF4G et eIF3. 5) Balayage de la région 5’ non codante et sélection du codon initiateur. 6) Libération des facteurs et fixation de la grande sous-unité ribosomique 60S sur la petite, formant un complexe de 80S prêt à entrer dans l’étape d’élargissement de la traduction.

sous-unité eIF4G, ce complexe hétérotrimérique est également capable de former un adaptateur entre les multiples facteurs d’initiation, l’ARNm et la sous-unité ribosomique 40S. En effet, le facteur eIF4G sert de plateforme d’assemblage pour les facteurs tels que eIF1, eIF3, eIF4A, eIF4E et eIF5 (Lorsch and Dever, 2010)(Asano et al., 2001) (He et al., 2003)(Marintchev et al., 2009), ainsi que pour la protéine « *poly(A) binding protein* » (PABP), fixée sur les résidus A à l’extrémité 3’ (Jackson et al., 2010), et

d'autres protéines régulatrices comme Mnk1 « *MAP kinase-activated protein kinase* » (Belloso et al., 2006). L'interaction entre eIF4G et PABP conduit à la circularisation des ARNm, favorisant le recyclage des ribosomes, ce qui permet la stimulation de la traduction, tandis que Mnk1 sert à activer le facteur eIF4E via sa phosphorylation. Enfin, la troisième fonction du complexe eIF4F est assurée par la sous-unité eIF4A, dont l'activité ARN-hélicase a pour but de déplier les éventuelles structures secondaires présentes sur l'ARNm en aval de la coiffe. Son action, dépendante de l'ATP, peut être stimulée par les facteurs eIF4B et eIF4H (Rozovsky et al., 2008).

Une fois le complexe eIF4F fixé sur la coiffe, l'interaction se produisant entre les facteurs eIF4G et eIF3 permet le recrutement du complexe de préinitiation 43S sur l'extrémité 5' du messager. Ce complexe 43S va ensuite parcourir la région 5' non traduite dans la direction 5' vers 3', jusqu'au premier codon d'initiation (AUG) se trouvant dans un contexte favorable, appelé « *séquence Kozak* » (Jackson et al., 2010) (Kozak, 1991c)(Kozak, 1989). Il a été montré que ce mécanisme de balayage du 5'UTR impliquait les facteurs eIF1 et eIF1A, car leur absence aboutit à un blocage du complexe 43S au niveau de la coiffe en 5' (Pestova et al., 1998). Le rôle du facteur eIF1 est de favoriser un changement de conformation de la petite sous-unité ribosomique en une forme compétente, dite « *ouverte* », pour le mécanisme du balayage, tandis que celui du facteur eIF1A est de stabiliser cette dernière (Pestova and Hellen, 2000) (Pestova and Kolupaeva, 2002). D'autres études biochimiques ont révélé que le facteur eIF1 permettait également la discrimination des codons initiateurs localisés dans un environnement défavorable ou trop proches de l'extrémité 5' du messager (Pestova and Kolupaeva, 2002). Ce facteur prévient également l'hydrolyse précoce de la molécule de GTP par le facteur eIF2 (Jackson et al., 2010).

L'appariement des bases du codon initiateur AUG et de l'anticodon du Mét-ARNt^{Met} conduit à une nouvelle réorganisation de la structure, aboutissant à une conformation dite « *fermée* », à une libération du facteur eIF1 et à une hydrolyse de la molécule de GTP par le facteur eIF2 (Passmore et al., 2007). La consommation de

l'énergie sous forme de GTP est stimulée par le facteur eIF5, une « *GTPase-activating-protein* » (GAP), et permet la libération de Mét-ARNt^{Met}_i du facteur eIF2 dans le site P de la petite sous-unité ribosomique, formant ainsi le complexe 48S. Le facteur eIF2-GDP, généré par cette réaction, est ensuite recyclé en eIF2-GTP grâce au facteur eIF2B, prêt à effectuer un nouveau cycle de recrutement de Mét-ARNt^{Met}_i sur le ribosome (Mohammad-Qureshi et al., 2008).

Enfin, la liaison du facteur eIF5B-GTP au complexe de 48S et l'hydrolyse de sa molécule de GTP qui suit, favorisent la dissociation des facteurs restants et la fixation de la grande sous-unité ribosomique 60S à la petite. À ce stade, le facteur eIF5B-GDP, ayant peu d'affinité pour le complexe 80S formé, est libéré, générant la particule ribosomique prête à entrer dans l'étape d'élongation (Acker and Lorsch, 2008).

1.1.3 Mécanisme alternatif de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes : exemple de l'initiation de la traduction « *coiffe indépendante* »

En parallèle à la voie classique de l'initiation de la traduction, il existe plusieurs stratégies alternatives, permettant à certains ARNm d'initier la traduction en dépit de l'absence d'un des signaux canoniques (par exemple la coiffe) ou lorsqu'un des signaux est placé dans un contexte peu favorable (par exemple le codon initiateur). Dans la majorité des cas, les ARNm ayant recours à ces stratégies ont développé des signaux non conventionnels, capables de manipuler ou de remplacer certains éléments de la machinerie traductionnelle nécessaires au démarrage de la traduction. L'une des stratégies les mieux connues concerne les ARNm capables de recruter le ribosome, à proximité immédiate du codon initiateur, indépendamment de la coiffe. L'exemple le plus étudié est celui des ARNm possédant un IRES, pour « *Internal Ribosome Entry Sites* », localisé le plus souvent dans la région 5' non codante. Il s'agit de régions très structurées, qui peuvent recruter le ribosome en absence de certains facteurs classiques

habituellement mis en jeu. Cette stratégie peut être employée par certains ARN viraux dépourvus de coiffe aussi bien que par des ARNm cellulaires, dont l'expression est souvent nécessaire à des moments spécifiques de la vie cellulaire, ne permettant pas l'initiation de la traduction par la voie coiffe dépendante.

En raison de l'importance des IRES dans l'expression des virus hautement pathogènes, parmi lesquels on retrouve le virus de l'hépatite C (HCV, « *Hepatitis C Virus* »), le poliovirus (PV), le virus de la fièvre aphteuse (FMDV, « *Foot-and-Mouth Disease Virus* ») et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), de nombreux efforts ont été fournis afin de mieux comprendre le fonctionnement de ces régions dans l'initiation de la traduction. Ainsi, de nombreuses études biochimiques et structurales de ces régions ont révélé une grande diversité dans leurs mécanismes d'action au moment du recrutement du ribosome.

Toutefois, malgré ces fortes divergences, les mécanismes d'action des IRES peuvent être classés en quatre groupes majeurs (Kieft, 2008), établis en fonction de leur besoin en facteurs, de leur structure secondaire et de la localisation du codon initiateur par rapport à ces régions. Le premier groupe concerne les IRES des dicistroviridae, capables de fixer directement le ribosome en absence de toute participation des facteurs classiques (eIF) et même de l'ARNt initiateur. Le membre le plus étudié de ce groupe est le virus de la paralysie du cricket (CrPV « *Cricket Paralysis Virus* »). Le deuxième groupe concerne les IRES fixant la petite sous-unité ribosomique 40S, mais utilisant également un nombre restreint d'eIF et un ARNt initiateur. L'exemple le mieux connu de ce groupe est l'IRES de HCV. Le troisième groupe concerne des IRES nécessitant un certain nombre de facteurs d'initiation canoniques (eIF), un ARNt initiateur, ainsi que d'autres facteurs supplémentaires, appelés les ITAF « *IRES Trans-Acting Factor* ». Les membres les mieux connus de ce groupe sont les virus de l'encéphalomyocardite (EMCV, « *encephalomyocarditis virus* ») et le virus de la fièvre aphteuse (FMDV). Enfin, le quatrième groupe d'IRES est proche du précédent, du fait que ses membres nécessitent également un certain nombre d'eIF, un ARNt initiateur, ainsi que des ITAF.

Toutefois, contrairement aux IRES du groupe trois, leur activité dans le RRL est dépendante d'un ajout d'extrait provenant d'autres types cellulaires. Le représentant le mieux étudié de ce groupe est le poliovirus (PV).

Notons que la conformation spatiale des ARN occupant une place primordiale dans le fonctionnement des IRES, les études de ces régions ont été principalement orientées vers leur analyse structurale. Toutefois, bien que la structure secondaire ait été déterminées pour la plupart des IRES, la structure tridimensionnelle a été essentiellement étudiée pour ceux fixant directement le ribosome (CrPV et HCV). Ainsi, en passant par les études de cryo-microscopie électronique (Cryo-EM) et de cristallographie aux rayons X (X-ray crystallography), la résolution de la conformation 3D de ces IRES a été effectuée à la fois pour la forme libre de ces régions ainsi que celle complexée aux particules ribosomiques (Hellen, 2009). Combinées à des approches biochimiques, ces études ont permis de mettre en lumière des informations cruciales sur leur mode d'action, que je vais décrire dans les paragraphes qui suivent.

1.1.3.1 IRES du groupe 1 : exemple du CrPV

Le premier groupe d'IRES est retrouvé dans le génome des dicistroviridae. Il est constitué d'une molécule d'ARN simple brin de polarité positive et composé de deux grandes phases de lecture (ORF), qui codent respectivement pour les protéines non structurales et les protéines de la capsid. Ces deux ORF sont séparées par des régions intergéniques de 190-220 nucléotides, contenant les IRES. La plus remarquable propriété de ces IRES est leur capacité à initier la traduction de manière très atypique. En effet, les ORF des protéines structurales ne contenant pas de codon d'initiation AUG, l'initiation se produit sur le codon alanine GCU dans le site A du ribosome plutôt que dans le site P conventionnel. De plus, ce processus ne nécessite aucun facteur d'initiation classique (eIF), ni même de complexe ternaire eIF2-GTP/Mét-ARNt^{Met}i (Deniz et al., 2009). Par ailleurs, les études réalisées *in vitro* ont révélé que l'ajout du

facteur eIF2 inhibait la traduction à partir de l'IRES de CrPV, montrant que l'IRES de CrPV et eIF2 du complexe ternaire entraînent en compétition pour le même site de la sous-unité 40S (Hellen, 2009)(Pisarev et al., 2005).

L'ensemble des travaux réalisés sur les IRES des dicistroviridae a révélé que la conformation qu'ils adoptent était capable de remplacer des facteurs classiques (eIF), montrant que la structure secondaire joue un rôle primordial dans le recrutement du ribosome. L'examen biochimique et biophysique des différents membres des dicistroviridae a montré une structure tridimensionnelle similaire, malgré une forte variation de séquence, confirmant davantage l'importance de la structure de ces régions dans le mécanisme de l'initiation de la traduction (Hellen, 2009).

La structure de ces régions s'est révélée très complexe, composée de trois pseudonœuds (PK1, PK2 et PK3) et deux tiges boucles très conservées (SL IV et SL V). Parmi ces trois pseudonœuds, deux se retrouvent entremêlés (PK2 et PK3), tandis que le troisième (PK1) se montre plutôt indépendant. Des études structurales ont révélé que PK1 mimait de façon très précise les interactions intermoléculaires se produisant entre l'anticodon de l'ARNt initiateur et le codon initiateur AUG dans le site P du ribosome (Costantino and Kieft, 2005) (*cf. Fig. 1.7*).

La résolution de la structure de ces IRES complexées aux particules ribosomiques a apporté des données cruciales dans la compréhension du mécanisme emprunté par ces régions. Ainsi, la structure résolue par Cryo-EM a montré que l'IRES de CrPV adoptait une structure allongée, interagissant avec la sous-unité 40S au niveau des sites A, P et E (Spahn et al., 2004). La liaison de cet IRES à la petite sous-unité ribosomique est assurée principalement via PK2 et PK3, qui interagissent avec la plateforme et le site E du complexe ribosomique 40S (Hellen, 2009). La structure plus récente, résolue à $\sim 7,3\text{\AA}$, a révélé des contacts supplémentaires se produisant entre les tiges boucles SL V et SL IV et une protéine ribosomale (rp) S5, localisée au niveau de la petite sous-unité ribosomique (Schüler et al., 2006), ainsi qu'avec une autre protéine ribosomale (rpSX) (*cf. Fig. 1.7*). Des études récentes ont suggéré qu'il pourrait s'agir de Rps25

1.1 Initiation de la traduction des ARNm chez les eucaryotes

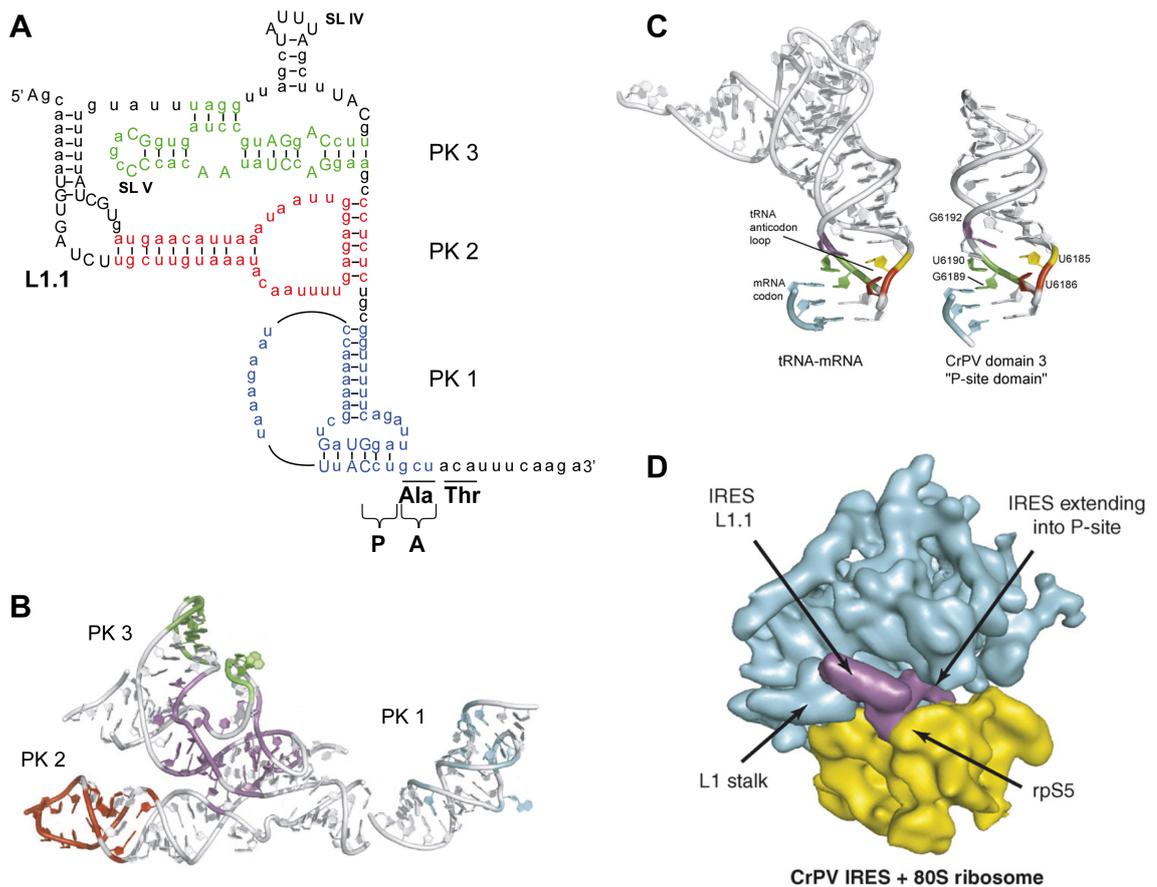


FIG. 1.7 – La structure des IRES des dicistroviridae

(A) Modèle de la structure secondaire de l'IRES du CrPV, composé de trois pseudonœuds (PK1, PK2 et PK3) et présentant deux tiges boucles très conservées (SL IV et SL V). Le pseudonœud PK1 est placé dans le site P, tandis que le premier codon à être traduit (Ala, alanine) est placé dans le site A du ribosome. (B) Modèle de la structure tertiaire de l'IRES du CrPV, montrant entrelacement de deux pseudonœuds PK2 et PK3 et un repliement indépendant du PK1. (C) Comparaison des appariements de bases entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de l'ARNt (figure de gauche) et les appariements de bases créés par le pseudonœud PK1 de l'IRES du CrPV, (figure de droite). Cette forte similarité structurale entre les deux types d'appariements a été proposée afin d'expliquer le remplacement de l'ARNt initiateur, habituellement nécessaire, par une structure secondaire qu'adopte la région intergénique des dicistrovirus au cours du mécanisme de l'initiation de leur traduction. (D) Structure du complexe de l'IRES du CrPV (magenta) et du ribosome 80S humain (40S en jaune et 60S en cyan), résolu par cryo-EM, montrant la position de cette région intergénique au sein d'une particule ribosomique apte à entrer en phase d'élongation (Kieft, 2009) (Spahn et al., 2004).

qui, contrairement à ce qui a été montré dans le cas du mécanisme classique d'initiation de la traduction, joue un rôle important dans l'initiation de la traduction de cet IRES (Landry et al., 2009). Dans le cas de PK1, la structure tertiaire a révélé que celui-ci

interagissait avec les sites P et E simultanément, suggérant que ce pseudonœud pourrait mimer l'ARNt dans un état hybride P/E, habituellement rencontré lors de l'élongation de la traduction classique (Dorner et al., 2006). Associés avec les données obtenues par des études biochimiques, ces résultats ont suggéré que ce mimétisme de PK1 permettrait la première translocation, appelée également « *pseudotranslocation* », effectuée en absence de la formation d'une liaison peptidique (Yamamoto et al., 2007).

Il a été proposé qu'une interaction entre le domaine PK2/3 et la sous-unité 60S induisait un changement conformationnel, se propageant à travers l'IRES jusqu'au domaine PK1, afin de positionner correctement le ribosome. Cette hypothèse est étayée par le fait que des mutations dans la région conservée L1.1 de PK2/3 pouvait réduire l'interaction entre codon et anticodon au sein de PK1, suggérant un lien fonctionnel entre les deux domaines. Toutefois, les domaines PK2/3 et PK1 pouvant se replier et agir indépendamment, des études récentes ont démontré que le domaine liant le ribosome et celui imitant l'anticodon de l'ARNt sont généralement fonctionnellement interchangeables et donc modulaires (Jang and Jan, 2010).

Pour conclure, grâce à leur architecture originale, les IRES des dicistroviridae ont pu parfaitement s'adapter aux besoins du processus de l'initiation de leur traduction sans faire intervenir les facteurs habituellement mis en jeu, ni même l'ARNt initiateur. La manipulation du ribosome par ces régions très structurées est également bien visible au niveau du mécanisme de « *pseudotranslocation* », lequel, dans les conditions classiques de la cellule, ne peut se faire en absence d'une liaison peptidique.

1.1.3.2 IRES du groupe 2 : exemple de HCV

Le deuxième groupe d'IRES peut être illustré par l'IRES du virus de l'hépatite C (HCV). Tout comme CrPV, le génome viral de HCV est une molécule d'ARN simple brin de polarité positive, non coiffée et traduite par les ribosomes cellulaires dès les premiers stades de l'infection. Le contournement du mécanisme classique de

la traduction se fait grâce à un mécanisme atypique, présentant deux particularités. Premièrement, la sous-unité 40S se fixe directement et avec une forte affinité sur les séquences d'IRES, à proximité immédiate du codon initiateur. Cette interaction apparaît très stable et ne nécessite aucune intervention des facteurs d'initiation. Deuxièmement, l'initiation dépendante des IRES de HCV ne nécessite que le complexe ternaire eIF2-GTP/Mét-ARNt^{Met}_i et les facteurs eIF3 et eIF5B (Hellen, 2009).

L'originalité du mécanisme d'initiation de la traduction, rencontré chez HCV, tient à une architecture de son IRES très complexe, composé de 341 nucléotides, qui constitue la majeure partie de la région 5' UTR du génome viral (Pisarev et al., 2005). Cette région peut être subdivisée en une partie 5' peu structurée qui inclue la courte tige boucle du domaine I, et une partie 3' plus structurée et plus importante au mécanisme de l'initiation de la traduction (*cf. Fig. 1.8-A*). La partie 3' de l'IRES se replie en trois domaines supplémentaires :

1. le domaine II, contenant une tige avec plusieurs boucles internes
2. le domaine III, plus complexe, comprenant un pseudonœud, plusieurs hélices et structures en tige boucle, ainsi qu'une jonction à quatre hélices (Boehringer et al., 2005), dont le repliement est dépendant des concentrations physiologiques en ions métalliques divalents (Pisarev et al., 2005). Le pseudonœud, composé de deux hélices SI et SII, joint les domaines II et III et s'apparie également avec la séquence située directement en amont du domaine IV.
3. le domaine IV, constitué d'une petite tige boucle, comprenant le codon d'initiation AUG.

La fixation de la petite sous-unité ribosomique 40S est assurée par une partie du domaine III, comprenant un pseudonœud ainsi qu'une tige boucle III_d (Boehringer et al., 2005). Les données obtenues par cryo-EM montrent que l'IRES de HCV forme une structure étendue, avec un domaine III fixé sur le « *dos* » de la sous-unité 40S (face exposée au solvant), derrière la plateforme du ribosome, et place le codon d'initiation au voisinage du site P (*cf. Fig. 1.8-B et -C*).

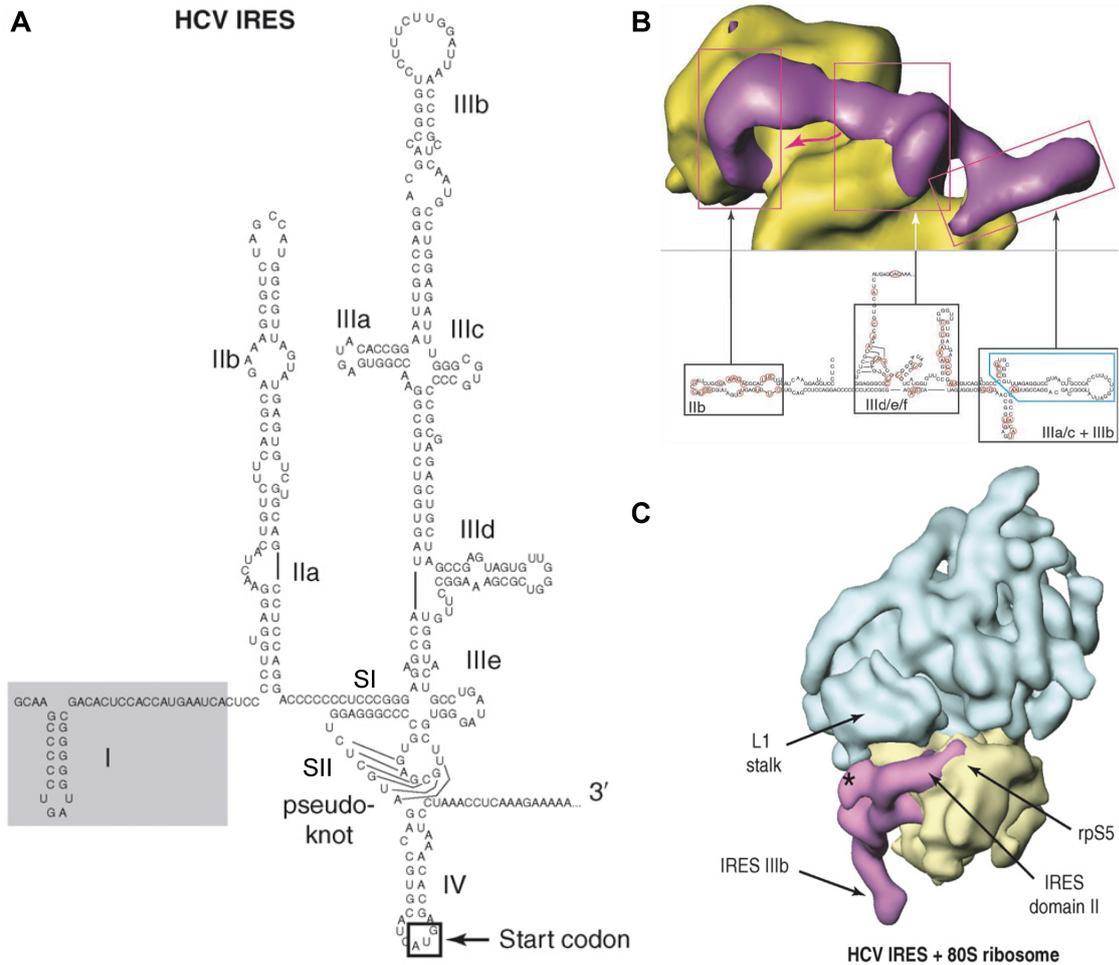


FIG. 1.8 – Structure de l’IRES d’HCV

(A) Modèle de la structure secondaire de l’IRES d’HCV, comportant quatre domaines (annotés de I à IV). Le codon initiateur AUG, localisé dans la boucle de la structure en « épingle à cheveux » du domaine IV, est encadré et indiqué par une flèche. Les deux hélices (SI et SII) composant le pseudonœud sont indiquées. (B) Corrélation entre la structure secondaire obtenue par le sondage chimique de l’IRES d’HCV et sa structure tridimensionnelle (magenta) complexée à la petite sous-unité ribosomique (40S, jaune), résolue par cryo-EM. Les résidus encerclés en rouge, au sein de la structure secondaire, ont été précédemment montrés inaccessibles lorsque l’IRES d’HCV est fixé au complexe de 40S, ce qui concorde avec les contacts intermoléculaires observés dans le modèle obtenu par la cryo-EM. Le site de fixation du facteur eIF3 (domaines IIIa et IIIb) est entouré en bleu sur le modèle de la structure secondaire de l’IRES d’HCV. (C) Structure tridimensionnelle du complexe de l’IRES d’HCV (magenta) et du ribosome 80S humain (40S en jaune et 60S en cyan) résolue par la cryo-EM. (Spahn et al., 2001)(Boehringer et al., 2005)

La particularité de cet IRES est que sa fixation à la petite sous-unité ribosomique 40S induit des changements de conformation dans cette dernière, qui peuvent concerner des changements d’orientation de la tête par rapport aux corps, ou ceux localisés

au niveau de la plateforme de la sous-unité 40S (Spahn et al., 2001). Il a été montré que ces changements de conformation au niveau de la particule 40S n'étaient pas observées pour les IRES de HCV délétés de leur domaine II, suggérant ainsi que les changements observés résultent d'une interaction entre le domaine II et la petite sous-unité ribosomique (Spahn et al., 2001). Ainsi, le domaine II de l'IRES interagit avec la sous-unité 40S au niveau de la tête et le bord de la plateforme, chevauchant partiellement son site E (*cf. Fig. 1.8-B et -C*). A ce niveau, ce domaine interagirait également avec les protéines ribosomales Rps5, ainsi que Rps25 dont l'importance cruciale dans le démarrage de la traduction via cet IRES a récemment été montrée (Landry et al., 2009). Ce contact est le seul du complexe IRES/40S qui soit près du site actif du ribosome et près de la face de la fixation de la sous-unité 60S. Ainsi, ce domaine II place le codon initiateur dans la sous-unité 40S et participe à l'assemblage des deux sous-unités ribosomiques, en maintenant l'ARN codant dans le site de décodage, jusqu'à ce que le reste de la machinerie traductionnelle soit assemblée et que l'élongation puisse commencer (Spahn et al., 2001). Des études plus récentes suggèrent que la formation du pseudonœud dans l'IRES de HCV conduit également au positionnement correct du codon initiateur sur la petite sous-unité ribosomique 40S. De plus, l'hélice SII s'est révélée nécessaire à une traduction efficace de cet ARN viral, en particulier via certaines paires de bases. Il a été suggéré que la participation de ces dernières était probablement due à leur proximité du codon AUG ou de leur interaction avec la sous-unité 40S (Berry et al., 2010).

Une fois que la petite sous-unité ribosomique est fixée sur l'IRES de HCV, celui-ci recrute le facteur eIF3 ainsi que le complexe ternaire eIF2-GTP/Mét-ARNt^{Met} pour former un complexe de « 48S » (Kieft, 2008).

Contrairement à l'initiation classique, la fixation du facteur eIF3 sur l'IRES de HCV se produit indépendamment de la fixation de la petite sous-unité ribosomique 40S. En effet, elle est assurée par les interactions se produisant entre la partie apicale du domaine III de l'IRES (via la jonction à quatre hélices et la tige boucle

IIIb) (Boehringer et al., 2005)(Siridechadilok et al., 2005) et le motif RRM, « RNA Recognition Motif », localisé dans la partie N-terminale de la sous-unité 3b du facteur eIF3 (Perard et al., 2009). La résolution du complexe 40S/eIF3/IRES de HCV, par les expériences de cryoEM, a montré que cet IRES interagissait avec le facteur eIF3, par l'intermédiaire d'un site commun de fixation au facteur eIF4G, localisé sur le facteur eIF3. De plus, la comparaison des modèles des complexes 40S/eIF3/IRES et 40S/eIF3/eIF4G a également montré que l'IRES de HCV pourrait mimer le facteur eIF4F, suggérant qu'il pourrait remplacer la fonction de ce facteur durant l'initiation de sa traduction (*cf. Fig. 1.9*) (Siridechadilok et al., 2005). Enfin, le rôle du facteur eIF3 dans l'assemblage des deux sous-unités ribosomiques a également été rapporté (Boehringer et al., 2005).

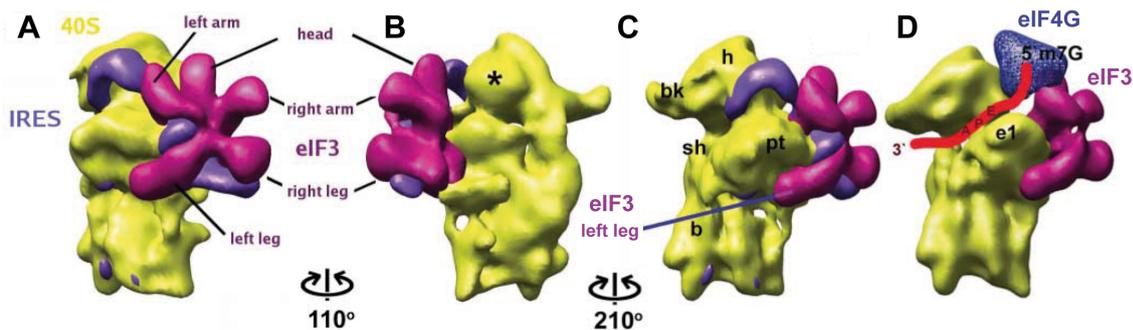


FIG. 1.9 – Comparaison entre les modèles des complexes 40S/eIF3/IRES d'HCV et 40S/eIF3/eIF4G, obtenus par cryo-EM

(A), (B) et (C) Analyse de l'interaction entre l'IRES d'HCV (violet), la petite sous-unité ribosomique 40S (jaune) et le facteur eIF3 (magenta), montrant certaines interactions communes, retrouvées au sein du complexe de préinitiation classique 40S/eIF3/eIF4G, indiqué en (D). e1 correspond à la position du facteur eIF1 au sein du complexe de préinitiation classique, tandis que la position de l'ARNm classique est présentée sous la forme d'une ligne rouge, s'étendant dans les sites A, P et E de la petite sous-unité ribosomique 40S (jaune). Dans le complexe classique (D), le facteur eIF4G, retrouvé à proximité immédiate de la coiffe (5' m⁷G), est indiqué en bleu. Les différentes parties du 40S sont annotées : h (head) tête ; bk (beak) bec ; sh (shoulder) épaule ; pt (platform) plateforme et b (body) corps (Siridechadilok et al., 2005).

Le complexe de « 48S » ainsi formé, peut s'associer à la grande sous-unité ribosomique 60S, grâce à l'intervention de deux facteurs eIF5 et eIF5B (Pestova et al., 1998). Lors de ce processus, le facteur eIF5 (GTPase-activating protein)

participerait à l'hydrolyse d'une molécule de GTP du facteur eIF2, provoquant ainsi la dissociation de ce dernier du complexe de « 48S » (Terenin et al., 2008). À ce niveau, le facteur eIF3 pourrait stabiliser le complexe du ribosome contenant le Mét-ARNt^{Met} dans le site P (Pisarev et al., 2005). Une fois le facteur eIF2 libéré, le facteur eIF5B faciliterait l'assemblage des deux sous-unités ribosomiques et la libération du facteur eIF3. Enfin, la formation d'un ribosome compétent pour l'étape d'élongation se produirait après hydrolyse d'une seconde molécule de GTP par eIF5B et la dissociation de ce facteur du complexe 80S. Par ailleurs, il a été récemment montré qu'en plus du mécanisme dépendant du facteur eIF2, l'IRES de HCV était tout à fait capable de former un complexe d'initiation 80S en absence de participation du facteur eIF2. Cette voie alternative de recrutement du ribosome par l'IRES de HCV ne nécessite que les deux facteurs eIF3 et eIF5B, qui seraient impliqués dans l'assemblage du complexe d'initiation 80S actif (Terenin et al., 2008).

1.1.3.3 IRES du groupe 3 : exemple du virus de la fièvre aphteuse (FMDV)

Les deux derniers groupes d'IRES sont retrouvés dans le génome des picornaviridae et partagent des caractéristiques communes dans leur mode de démarrage de la traduction. Le génome des picornaviridae, constitué d'une molécule d'ARN de polarité positive, non coiffée en 5', polyadénylée en 3' et codant pour un seul polypeptide qui est ensuite clivé en plusieurs protéines virales. La première étape du cycle infectieux des picornavirus est la synthèse des protéines virales, dont l'étape de l'initiation est entièrement dépendante de leur IRES, situé dans leur 5'UTR.

Le recrutement de la petite sous-unité ribosomique 40S sur les IRES des picornavirus, nécessite tous les facteurs canoniques, à l'exception du facteur de la coiffe eIF4E, et ne requiert que deux tiers du facteur eIF4G, encore appelé p100 (correspondant au domaine central et C-terminal). Cette particularité est d'ailleurs exploitée par les picornavirus dès les premiers stades de l'infection. En effet, ces

virus synthétisent une protéase qui clive le facteur eIF4G (2Apro dans le cas du poliovirus, et L dans le cas du virus de la fièvre aphteuse) en deux parties (N-terminale et p100), résultant en une inhibition de la voie coiffe dépendante, utilisée par les ARNm endogènes. Cette inhibition sélective de l'initiation de la traduction permet aux ARN viraux, l'utilisation exclusive de la machinerie traductionnelle cellulaire, pour la synthèse efficace des protéines virales (Belsham, 2009). Une autre stratégie, permettant le contournement du contrôle de la machinerie traductionnelle cellulaire, peut être observée chez le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV, « *encephalomyocarditis virus* ») et consiste en une déphosphorylation du facteur 4E-BP1, qui se fixe au facteur eIF4E et empêche son interaction avec la coiffe (Gingras et al., 1996). Enfin, outre les facteurs d'initiation classiques, le recrutement de la petite sous-unité ribosomique nécessite un certain nombre de facteurs protéiques supplémentaires appelés les ITAFs, « *IRES trans-acting factors* ». Les IRES des différents picornavirus en utilisent un nombre variable. Le taux d'expression des différents ITAFs est corrélé à la pathogénie et à la spécificité tissulaire des picornavirus (Belsham, 2009)

Enfin, malgré une forte variabilité entre les séquences nucléotidiques au sein de ces deux groupes d'IRES, leur structure secondaire est relativement conservée, grâce aux mutations compensatoires qui restaurent les appariements de bases de type Watson-Crick. On retrouve également quelques caractéristiques communes entre ces deux types d'IRES, dont une concerne la présence d'une séquence riche en pyrimidines (appelée Y_n, avec n=5 à 7 nt), localisée environ 20nt en aval (séparation désignée par X_m, avec m≈20nt) du codon initiateur AUG. Au sein du motif Y_n-X_m-AUG, la longueur de Y_n et de X_m joue un rôle important dans le mécanisme employé par les IRES des picornavirus. Enfin, il a été montré que la séquence nucléotidique entre la séquence riche en pyrimidine (Y_n) et le codon initiateur (AUG) pouvait varier entre ces deux groupes d'IRES, sa longueur restant toutefois constante (de Breyne et al., 2009) (Balvay et al., 2009).

Ainsi, l'initiation de la traduction par les IRES du groupe 3, peut être illustrée par l'exemple du FMDV. L'IRES du FMDV (d'environ 462nt de long) est organisé en cinq domaines structuraux numérotés dans le sens 5' → 3' de 1 à 5 ou de H à L (*cf. Fig. 1.10-A*).

Les 21 premiers nucléotides du domaine 1 font partie de la séquence *cre*, impliquée dans la réplication, et semblent stabiliser la structure du domaine 2 qui est essentielle à l'activité de l'IRES.

Le domaine 2 forme une tige boucle conservée. Sur la partie apicale de cette boucle se trouve la séquence riche en pyrimidines de type UCUUU qui fixe la protéine PTB (Niepmann, 2009).

Le domaine 3 est le plus étendu de l'IRES, et est organisé en une structure très complexe et flexible (Fernández-Miragall and Martínez-Salas, 2003). On peut distinguer dans sa structure secondaire différentes régions. En effet, sa partie apicale contient un motif structural de type « *jonction à quatre hélices* » et présente deux motifs de séquence conservés GNRA et RAAA. Le premier motif semble dicter l'organisation et la stabilité du domaine 3 (Fernández-Miragall and Martínez-Salas, 2003). Une seconde partie dite proximale contient une longue tige, interrompue par des bulles internes. Le domaine 3 possède une séquence riche en cytosines, laquelle fixe une protéine PCBP. Dans ce domaine, on trouve également des interactions de type ARN-ARN entre les domaines fonctionnels, ce qui suggère que ce domaine agit comme un échafaudage pour maintenir l'assemblage des différents domaines de l'IRES (Fernández-Miragall and Martínez-Salas, 2003).

Dans le domaine 4, un motif riche en adénosines fixe le facteur d'initiation eIF4G, alors que le domaine 5 interagit avec le facteur eIF3 ainsi qu'avec le facteur eIF4B, qui comme le PTB et un ITAF de 45 kDa stimule la formation du complexe 48S. En résumé, la région 3' de l'IRES de FMDV (domaines 4 et 5) interagit avec les facteurs d'initiation canoniques nécessaires à la formation du complexe 48S, alors que la région 5' et la région centrale (domaines 1, 2 et 3) sont plutôt

impliquées dans l'organisation structurale de l'IRES par un jeu d'interactions ARN-ARN (Martínez-Salas and Fernández-Miragall, 2004)(Niepmann, 2009).

Il a été montré que la formation du complexe 48S nécessitait uniquement les facteurs eIF4G, eIF4A, eIF2, eIF3 et une molécule d'ATP, tandis que les facteurs eIF1 et eIF1A ne semblent pas être requis (Kolupaeva et al., 1998). Dans le cas du facteur eIF4G, son interaction avec le domaine 4, sous forme d'un complexe eIF4G/eIF4A, est assurée via son domaine central (aa 613-1090), contenant le site de fixation des facteurs eIF3 et eIF4A (Lomakin et al., 2000). La spécificité de cette interaction est assurée par le facteur eIF4A, mais n'exige l'activité « *ARN hélicase* » et la consommation d'une molécule d'ATP qu'au moment de la formation du complexe 48S (Lomakin et al., 2000). Les étapes suivantes ressemblent à celles ayant lieu au cours de l'initiation coiffe dépendante de la traduction, dans lesquelles le facteur eIF4G interagit avec le facteur eIF3, fixé à la petite sous unité ribosomique, amenant ainsi l'ARN viral dans la fente du 40S (*cf. Fig. 1.10-B*).

FIG. 1.10 – Initiation de la traduction via l'IRES du FMDV

(A) Modèle de la structure secondaire de l'IRES de FMDV, caractérisée par cinq domaines (annotés de H à L ou de 1 à 5), une séquence riche en pyrimidines (site de fixation du PTB), une séquence riche en résidus C (site de fixation du PCBP) ainsi que des motifs GNRA et RNAA (impliqués dans les interactions ARN/ARN à longue distance). Les sites de fixation de certains facteurs d'initiation canoniques (eIF3, eIF4G et eIF4B) au sein du domaine 4 à 5 sont également indiqués. Deux codons d'initiation AUG (dont le second est principalement utilisé) sont soulignés en magenta. (B) Simulation de l'interaction entre l'interface de la sous-unité 40S et l'IRES de FMDV, localisé dans le site de décodage, dans la fente entre la tête et la plateforme de la petite sous-unité ribosomique. La séquence riche en pyrimidines de l'IRES de FMDV est amenée à proximité de l'hélice 45 (H45) de l'ARNr 18S. Les domaines 4 et 5 de cet IRES interagissent avec le facteur eIF4G (ainsi qu'avec eIF4B et eIF3, non représentés sur cette figure). La partie non-conservée du domaine 3 de l'IRES sert d' « *espaceur flexible* », à l'aide de ces nombreuses courtes hélices et de ses bulles non appariées, alors que la partie conservée comprenant la jonction à quatre hélices et ressemblant à la structure de l'ARNt pourrait interagir avec le côté solvant de la petite sous-unité ribosomique, à proximité du site E. PTB, à l'aide de ses quatre domaines RRM (orange), est amené à agir avec les domaines 4 et 5 de l'IRES de FMDV par son domaine IV C-terminal et avec le domaine 2 de l'IRES par son domaine RRM III, stabilisant ainsi la structure tridimensionnelle de l'IRES. Les domaines II et I de PTB ne se fixent pas fortement à l'ARN. Les régions de la petite sous-unité ribosomique sont annotés : h (head) tête ; bk (beak) bec ; sh (shoulder) épaule ; pt (platform) plateforme et b (body) corps. (Niepmann, 2009)

1.1 Initiation de la traduction des ARNm chez les eucaryotes

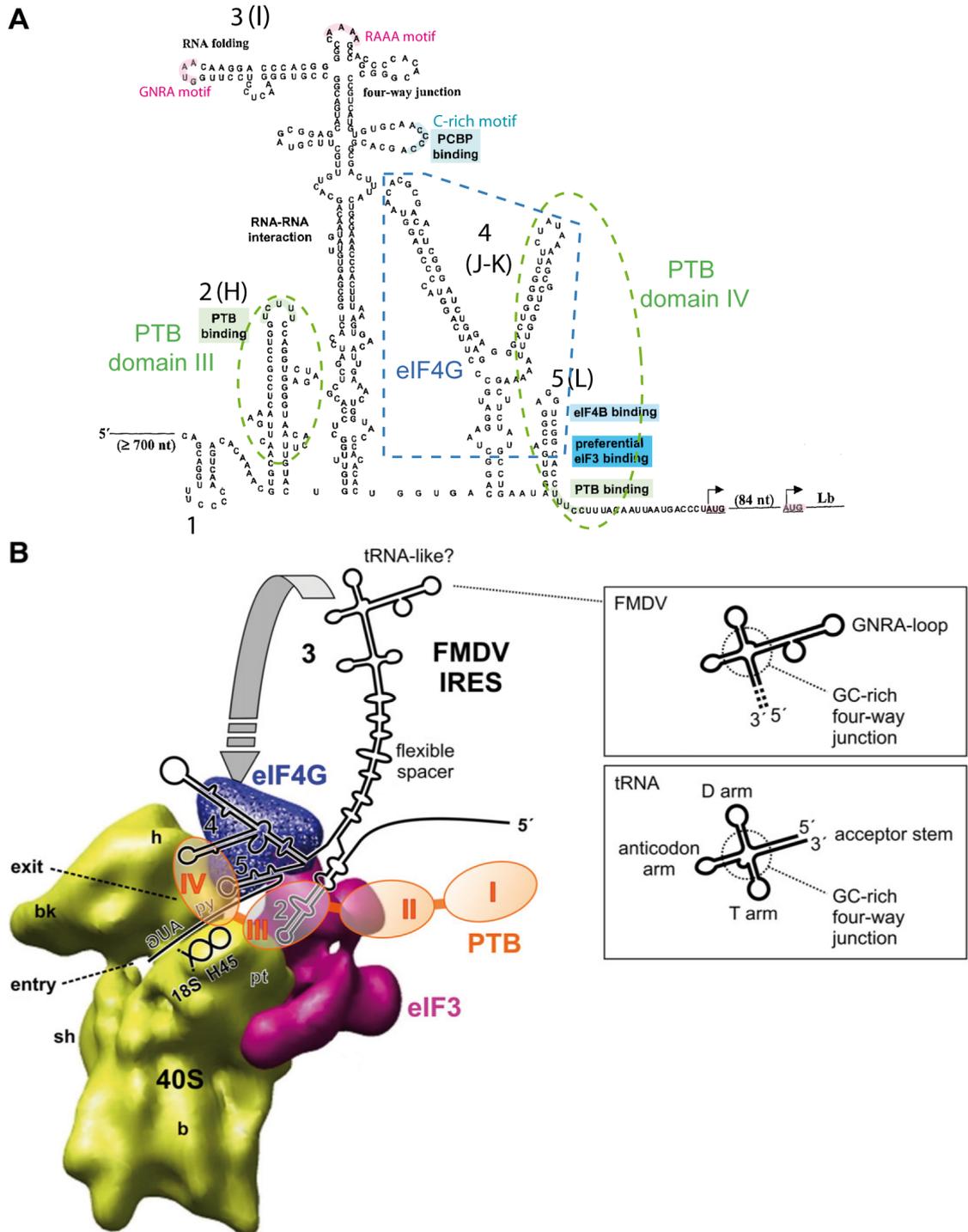


FIG. 1.10 – Initiation de la traduction via l’IRES du FMDV

Enfin, l’IRES de FMDV utilise deux codons d’initiation séparés de 84 nucléotides. Il est très probable que l’entrée de la petite sous-unité 40S se fasse au niveau du premier

AUG, mais l'initiation de la traduction sur ce codon étant très faible, la sous-unité 40S glisse jusqu'au second AUG, où elle initie la traduction (Niepmann, 2009).

1.1.3.4 IRES des picornaviridae du groupe 4 : exemple du poliovirus (PV)

Le mécanisme de l'initiation de la traduction des IRES du groupe 4 peut être illustré par l'exemple du poliovirus (PV). Parmi les caractéristiques structurales de cet IRES d'environ 750nt de long, on peut distinguer, au niveau de sa structure primaire, 9 codons AUG, dont le dernier (AUG₇₄₃) est le véritable codon initiateur, ainsi qu'un motif de type Yn-Xm-AUG₅₈₆, situé en amont du codon AUG₇₄₃. Le repliement secondaire de cet IRES est caractérisé par 7 structures en tige boucle, localisées également en amont du codon initiateur (AUG₇₄₃). La suppression des différentes tiges boucles par mutagenèse dirigée montre que les boucles III à VI sont essentielles et servent de plateforme d'amarrage aux ribosomes, « *Ribosome Landing Pad* » (Niepmann, 2009). Un grand domaine central (hélice IV), possédant une jonction à quatre hélices, conservée, stable et similaire à celle d'un ARNt, constitue le cœur de l'IRES. La similarité de cette jonction à quatre hélices avec celle de l'ARNt a été mise en évidence expérimentalement par le clivage de celle-ci par la RNase P, qui intervient dans la maturation de l'extrémité 5' des ARNt (Niepmann, 2009).

Ainsi, l'entrée de la petite sous-unité ribosomique 40S se fait sur un AUG silencieux, situé à la position 586, (~160nt en amont de l'AUG initiateur) et atteint ce dernier par un mécanisme encore non élucidé, pouvant être le « *scanning* » ou le « *shunting* » (de Breyne et al., 2009)(Niepmann, 2009)

La fixation de la sous-unité 40S sur la région du « *Ribosome Landing Pad* » nécessite, en plus d'un certain nombre d'ITAFs, tous les facteurs d'initiation classiques, excepté eIF4E (*cf. Fig. 1.11*). En effet, au moins six ITAF sont connus pour leur participation à la régulation de cet IRES, il s'agit de La, PTB, PCBP, SRp20, unr et DRBP76.

1.1 Initiation de la traduction des ARNm chez les eucaryotes

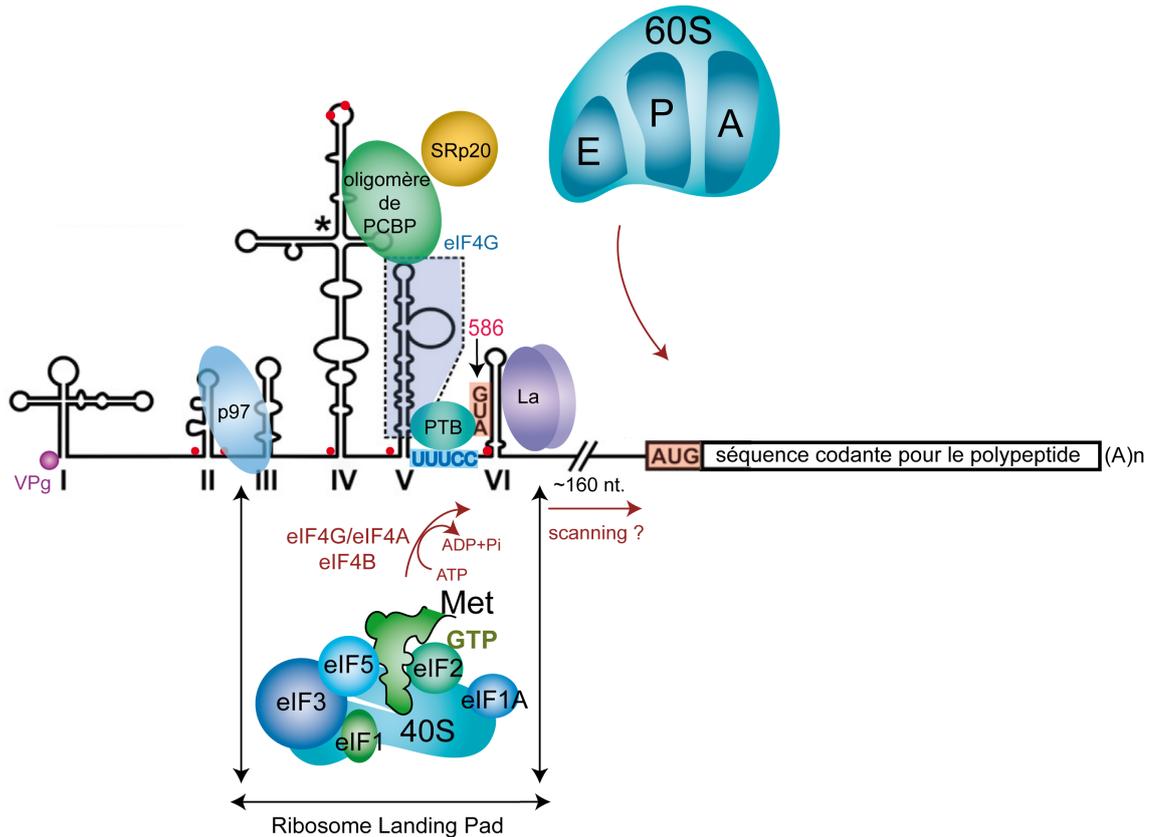


FIG. 1.11 – Initiation de la traduction via l'IRES du poliovirus

Une représentation schématique de la structure secondaire de l'IRES du Poliovirus (PV) ainsi que de quelques étapes de recrutement du ribosome. La structure secondaire de l'IRES du PV est caractérisée par 7 structures en tige boucle (les structures I à VI sont annotées sur le schéma), 9 codons d'initiation (points rouges, dont le véritable, localisé à la position 743, est indiqué par AUG) et une séquence riche en pyrimidines (UUUCC). La jonction à quatre hélices, similaires à celle d'un ARNt, est marquée par un astérisque. La fixation des ITAF tels que : p97, La, PCBP, SRp20 et PTB va permettre le recrutement de la petite sous-unité ribosomique, à l'aide de la plupart des facteurs classiques (eIF), excepté le facteur eIF4E, qui atteindrait le codon d'initiation (localisé ~160nt en aval de son site de fixation) par un mécanisme encore non élucidé (scanning ou shunting), où se fixera la grande sous-unité ribosomique 60S, formant un complexe d'initiation 80S, prêt à entrer en phase d'élongation.

La protéine La, « *Lupus Antigen* », est un autoantigène de 52kDa, qui possède un motif de reconnaissance de l'ARN. Le rôle de cette protéine dans la cellule est d'intervenir dans la maturation des transcrits obtenus à partir de l'ARN polymérase III. Lors de l'infection de la cellule par le poliovirus, elle se fixe sur l'IRES du PV (à la position 559-664) sous forme de dimère et stimule son activité. Elle est également importante dans la détermination du vrai codon d'initiation de l'ARN viral

(Meerovitch et al., 1993)(Meerovitch et al., 1989). La protéine PTB, « *Polypyrimidine-Tract-Binding Protein* », de 57 kDa, possède quatre motifs de reconnaissance de l'ARN et intervient dans les réactions d'épissage des ARN pré-messagers. Lors de l'infection par le poliovirus, elle se fixe sur la séquence riche en pyrimidines et maintient l'IRES du poliovirus dans une conformation active capable ensuite de fixer les facteurs canoniques et le complexe 43S (Wollerton et al., 2001)(Hellen et al., 1993) (Hunt and Jackson, 1999). La protéine PCBP, « *Poly(C)-Binding Protein* », se fixe sur une région de l'IRES riche en cytosines, et joue un rôle dans la stabilité des ARNm cellulaires, ainsi que dans la régulation de la traduction. Dans le cas de l'ARN du poliovirus, il a été montré que cette protéine, se fixant sous forme d'oligomère sur la partie apicale du domaine central IV, était impliquée dans sa stabilité, dans l'initiation de sa traduction et dans sa réplication (Walter et al., 2002). De plus, PCBP interagit avec le facteur d'épissage SRp20, impliqué dans la stimulation de l'activité de cet IRES au moyen de son domaine RRM (le motif de reconnaissance de l'ARN). Cependant, les mécanismes sous-jacents à cette stimulation ne sont pas encore compris. Il a été suggéré que l'interaction de PCBP avec SRp20 et d'autres protéines pouvait indirectement favoriser un recrutement plus efficace du ribosome (Niepmann, 2009). La protéine p97, encore appelée un « *upstream of N-ras* », est une protéine cellulaire cytoplasmique qui joue un rôle important dans l'embryogenèse. Elle augmente également l'efficacité de la traduction des IRES des picornavirus, mais uniquement ceux du groupe 4 (Hunt and Jackson, 1999)(Boussadia et al., 2003) (Boussadia et al., 1997). Enfin, la protéine DRBP76 « *double-stranded RNA binding protein 76* » régule spécifiquement l'activité de certains IRES, en fonction du tissu. Par exemple, sa présence massive dans les cellules du système nerveux y stimule l'expression de l'IRES du PV et inhibe celle d'HRV « *human rhinovirus* », appartenant également au groupe 4 des IRES des picornaviridae (Niepmann, 2009).

Ces 4 protéines vont modeler l'ARN génomique du poliovirus afin de le préparer à l'arrivée des facteurs classiques de la traduction, qui eux-mêmes préparent la fixation

de la sous-unité 40S (Niepmann, 2009). Le rôle des facteurs canoniques dans le recrutement du ribosome n'a pas encore été compris, mais il semblerait que, comme dans le cas des IRES des picornavirus du groupe 3 (cf. §1.1.3.3), le complexe eIF4G/eIF4A se fixerait sur la tige boucle V de l'IRES de PV, permettant ainsi un remodelage de l'ARN de telle manière que le complexe 43S puisse être recruté efficacement (de Breyne et al., 2009).

1.1.3.5 IRES rencontré au sein des ARNm cellulaires

Il a été proposé que le mode d'initiation de la traduction impliquant le recrutement des ribosomes indépendamment de la coiffe pouvait également être rencontré chez certains ARNm cellulaires. Au moment de leur découverte, une question s'est posée : « *Pourquoi des ARNm cellulaires coiffés en 5' emploieraient la traduction par la voie coiffe indépendante ?* ». L'une des hypothèses a suggéré que cette stratégie permettrait à la cellule d'assurer la synthèse protéique à certains moments de la vie cellulaire, au cours desquels la voie d'initiation classique serait compromise. Cet événement peut en effet se produire pendant un stress cellulaire (par exemple, lors d'une infection virale) ou au cours de certaines étapes contrôlant la prolifération, la différenciation ou la croissance cellulaire. En effet, ces changements de conditions cellulaires sont souvent accompagnés d'un clivage d'un des facteurs d'initiation classiques indispensables au recrutement du ribosome (par exemple, le clivage du facteur eIF4G par la protéase des picornavirus ou des facteurs eIF4B, eIF3, eIF2 α par les caspases cellulaires au moment de l'apoptose cellulaire). L'inhibition du démarrage de la traduction par la voie classique peut également résulter d'une phosphorylation de la sous-unité α du facteur eIF2, lors d'une infection virale ou de l'apoptose cellulaire. Suite à cette modification, le facteur eIF2, faisant partie du complexe ternaire, reste piégé au niveau de son recyclage par le facteur eIF2B, et n'est par conséquent plus disponible pour le recrutement du ribosome par la voie classique (Fitzgerald and Semler, 2009)(Graber and Holcik, 2007)

(Gonzalez-Herrera et al., 2006). Notons que, bien qu'il soit généralement admis que les IRES des ARNm cellulaires agissent indépendamment de la coiffe, les études récentes ont montré que contrairement aux IRES viraux, la coiffe influencerait à un certain degré leur activité (Andreev et al., 2009).

Les ARNm cellulaires détenteurs d'IRES sont retrouvés de plus en plus fréquemment et on estime qu'ils représenteraient ~10% de la population globale des ARNm cellulaires (Komar and Hatzoglou, 2005). Ces ARN appartiennent au groupe des messagers codant pour des protéines régulatrices, incluant les proto-oncogènes, les facteurs de croissance cellulaires, d'apoptose et d'angiogenèse. Ce sont donc des produits de gènes impliqués dans le contrôle de la croissance et la prolifération cellulaire, dont l'expression aberrante est souvent corrélée à une transformation cellulaire ou à une progression de tumeurs cancéreuses (Fitzgerald and Semler, 2009) (Graber and Holcik, 2007).

Du fait de la diversité de changements physiologiques de la cellule conduisant à l'inhibition de la traduction par la voie classique, différents types d'IRES peuvent coexister et opérer selon un mode distinct. Cette particularité des IRES cellulaires permet ainsi d'assurer la synthèse protéique en réponse à un stimulus spécifique de la cellule. Contrairement aux IRES viraux, leur mode d'action est encore peu connue, toutefois en règle générale, leur mécanisme semble être régulé par leur structure tridimensionnelle et nécessiterait un certain nombre de facteurs supplémentaires, appelés les ITAF. Tout comme pour les IRES des picornavirus, il est également admis que le ribosome serait recruté en amont du codon initiateur et atteindrait celui-ci lors de la seconde étape d'initiation de la traduction en glissant le long de l'ARN du 5' vers 3' (Komar and Hatzoglou, 2005)(Pickering et al., 2004).

Malgré l'importance de la structure de ces IRES dans leur mode de fonctionnement, à ce jour, relativement peu de structures secondaires ont été proposées pour ces régions d'ARN. La comparaison entre ces séquences d'ARN très structurées n'a révélé que très peu de similitudes. Parmi ces similitudes, un motif de type

« *Y-stem loop* », dont la fonction reste encore à déterminer, a été proposé par comparaison *in silico* des séquences homologues des IRES de Bip (« *immunoglobulin heavy chain binding protein* », une protéine de choc thermique) et de FGF-2 (« *Fibroblast growth factor 2* », une protéine impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaires) (Gonzalez-Herrera et al., 2006). Les études biochimiques sur l'IRES de Gtx (« *Gtx homeodomain transcription factor* ») et FGF-2 ont révélé une séquence de 9nt, complémentaire à 100% à la séquence nucléotidique de l'ARN ribosomique (ARNr) 18S, rappelant un mode de recrutement des ribosomes procaryotes (Chappell et al., 2000)(Hu et al., 1999)(Panopoulos and Mauro, 2008). Enfin, certains IRES cellulaires peuvent posséder des séquences consensus communes reconnues par des ITAF, parmi lesquelles on retrouve les séquences riches en pyrimidines (site de fixation du facteur PTB) ou encore riches en résidus C (site de fixation du facteur PCBP), également contenus au sein des IRES des picornavirus.

Les ITAF les plus fréquemment rencontrés chez les IRES cellulaires sont de types PTB, PCBP, hnRNP et La, et semblent agir comme des chaperonne pour maintenir ou créer une structure tridimensionnelle active de l'IRES, capable d'assembler le complexe de 48S (*cf. Fig. 1.12*) (Pickering et al., 2004)(Mitchell et al., 2003). Ils peuvent également avoir un effet activateur ou inhibiteur d'un groupe d'IRES cellulaire à un moment particulier de la vie de la cellule. Par exemple, dans le cas de l'IRES du FGF-2, le facteur ayant un effet inhibiteur sur cet IRES est une protéine p53, tandis que le facteur hnRNAI au contraire stimule son activité (Bonnal et al., 2003) (Gonzalez-Herrera et al., 2006). Enfin, il est intéressant de noter qu'en règle générale, des facteurs supplémentaires interagissent spécifiquement avec un certain nombre de transcrits au cours de changements de conditions physiologiques de la cellule, suggérant qu'ils pourraient également jouer un rôle dans la corégulation de la synthèse d'un groupe de protéines, rappelant en quelque sorte la corégulation via les opérons des bactéries (Keene and Tenenbaum, 2002).

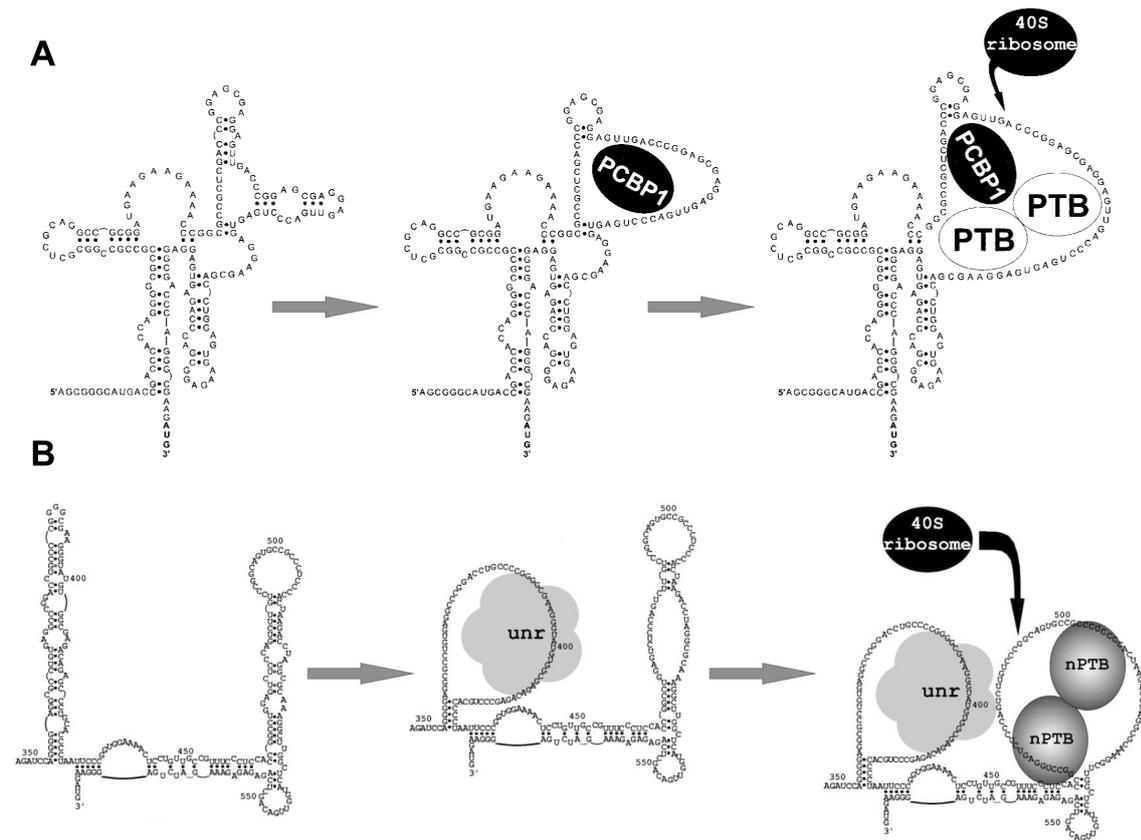


FIG. 1.12 – Exemples de modèles d’action de certains ITAF dans le recrutement du ribosome sur les IRES cellulaires

(A) Cas de l’IRES de Bag-1 « *Bcl2 associated athanogene-1* ». Le facteur PCBP1 semble interagir en premier lieu sur la région de ~27nt (entre 320 et 347nt) provoquant des remaniements structuraux et une ouverture d’une région de ~40nt, à laquelle se fixerait un autre facteur, PTB-1, qui à son tour faciliterait le recrutement du ribosome (Pickering et al., 2004). (B) Cas de l’IRES d’Apaf-1 « *Apoptotic protease activating factor 1* ». Le facteur unr se fixe en premier lieu sur deux structures en tige boucle, permettant ainsi la fixation de nPTB. Enfin, l’ensemble de ces interactions permet la formation d’une conformation active de l’IRES, capable de recruter la petite sous-unité ribosomique (Mitchell et al., 2003).

Pour conclure, les IRES au sein des ARNm cellulaires sont des éléments de régulation de l’expression génétique, qui permettent à la cellule de fournir une réponse rapide et adaptée à des stimuli exogènes, que peut recevoir une cellule au cours de sa vie. Enfin, la réaction de la cellule au changement des ses conditions physiologiques est généralement accompagnée d’une stimulation coordonnée d’une famille de messagers ayant des fonctions complémentaires.

1.2 Histones

Dans notre laboratoire, les ARNm codant pour les histones constituent un modèle d'étude d'initiation non conventionnelle de la traduction par la machinerie eucaryotique. En effet, une forte régulation de l'expression des histones, ainsi que la présence de multiples éléments non canoniques au sein de leurs ARNm, nous ont amené à étudier le mécanisme d'action de l'initiation de leur traduction. Ainsi, afin de mieux comprendre la régulation et l'expression des messagers des histones au niveau traductionnel, dans la deuxième partie de l'introduction de ma thèse, je présenterai brièvement les principales caractéristiques de ces protéines.

1.2.1 Structure et fonctions des histones

Les histones sont des protéines nucléaires, dont le rôle principal est l'empaquetage de l'ADN génomique sous forme de chromatine, nécessaire pour maintenir environ deux mètres d'ADN dans le noyau cellulaire. Ce sont de petites protéines très riches en acides aminés basiques, et qui sont parmi les protéines les plus conservées chez les eucaryotes. L'importance des histones pour la survie cellulaire a été largement répertoriée, car outre la compaction de l'ADN génomique, ces protéines participent également aux mécanismes de régulation de l'expression génétique. Ainsi, il a été montré que l'absence de la synthèse des histones durant la réplication génomique, effectuée pendant la phase S du cycle cellulaire, conduisait à la mort de la cellule, et que la répression modérée de son expression pouvait affecter la transcription ainsi que le bon fonctionnement cellulaire (Singh et al., 2009b).

1.2.1.1 Structure des histones

Cinq classes d'histones peuvent être distinguées : H1, H2A, H2B, H3 et H4, dont deux copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4 interagissent pour former un octamère, encore appelé le « cœur d'histone ». La caractéristique principale de cet octamère est sa capacité à enrouler autour de lui ~ 146 pb d'ADN, donnant ainsi naissance au nucléosome, l'unité fondamentale de la chromatine (*cf. Fig. 1.13*).

La structure des quatre histones d'octamère est caractérisée par un domaine central structuré et très conservé, comprenant un motif « *histone fold* », et des extrémités N- et C-terminales, qui sont restées plus variables au cours de l'évolution. Le motif « *histone fold* », composé de trois hélices ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$) séparées par deux boucles (L1 et L2), assure que les interactions intermoléculaires se produisent entre les histones. Ainsi, les monomères de chacune de ces quatre histones dimérisent dans une orientation antiparallèle pour former les dimères (H2A-H2B) et (H3-H4) via une forte interaction hydrophobe le long de l'hélice $\alpha 2$ qui se retrouve à l'interface des dimères formés. Ce processus s'effectue à partir des monomères non structurés, qui se replient partiellement (état non directement observé des monomères) et dimérisent pour former un intermédiaire dimérique I_2 qui se transforme en un dimère natif N_2 . Les études récentes, réalisée sur les dimères (H2A-H2B), ont montré que les résidus qui stabilisent les monomères isolés d'H2A et H2B acquièrent un repliement correct via leur interaction formant l'intermédiaire I_2 . La structure qui se développe au sein de l'intermédiaire dimérique comprend des résidus qui couvrent la majorité d' $\alpha 2$ dans H2B et la moitié C-terminale d' $\alpha 2$ dans H2A. De plus, les résidus d' $\alpha 1$ d'H2B ainsi que ceux d' $\alpha 3$ et αC d'H2A contribuent à la stabilité de I_2 . Enfin, les auteurs ont suggéré que cet intermédiaire favoriserait un repliement efficace du dimère natif (H2A-H2B) (Stump and Gloss, 2010).

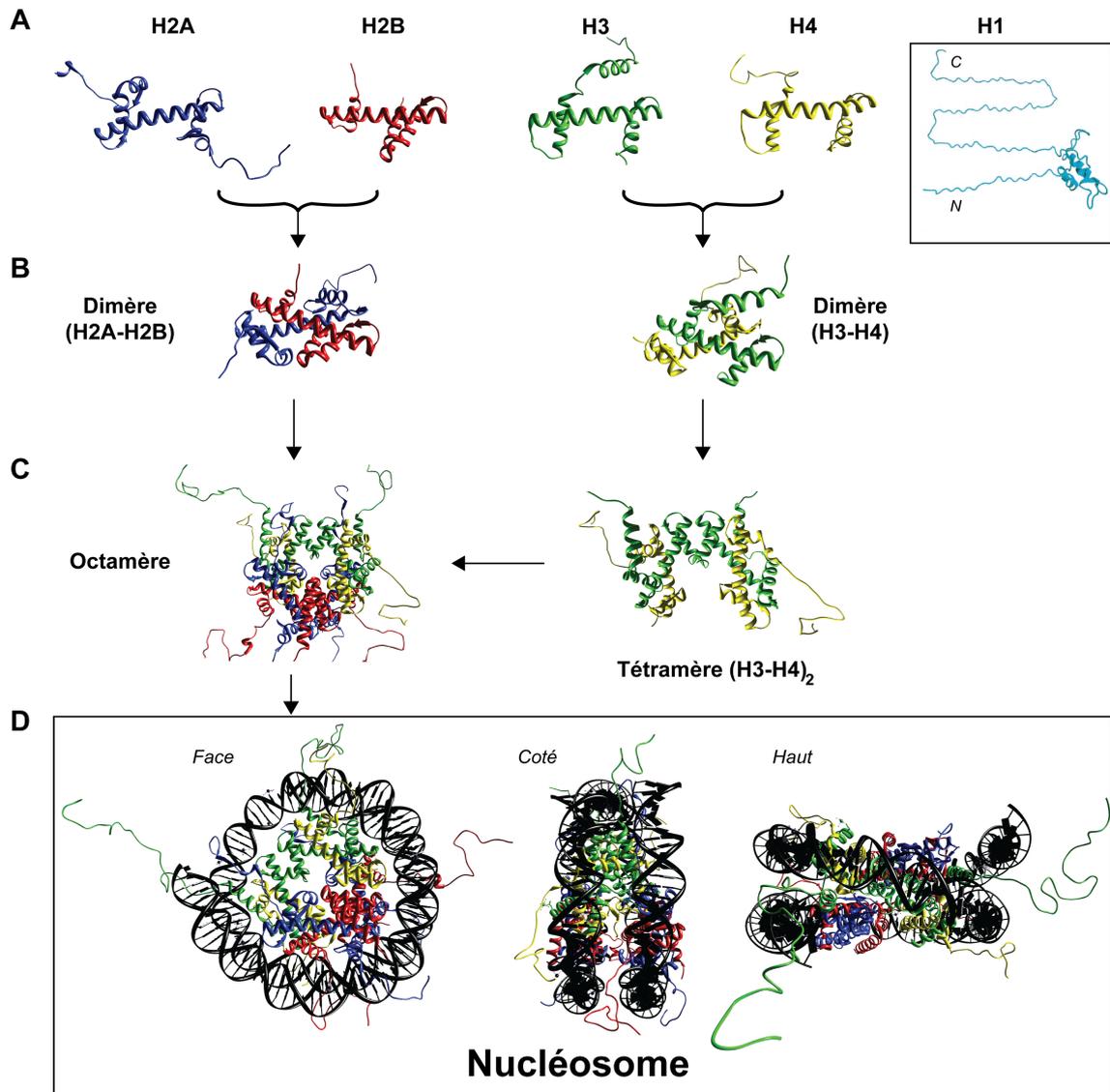


FIG. 1.13 – Structure tridimensionnelle du nucléosome

(A) Structures tridimensionnelles des histones d'octamère H2A, H2B, H3 et H4, ainsi que de l'histone internucléosomale H1 (McBryant et al., 2010). (B) Les monomères d'H2A, H2B, H3 et H4 s'assemblent deux à deux pour former les dimères (H2A-H2B) et (H3-H4). (C) Les deux dimères (H3-H4) s'assemblent et constituent le tétramère (H3-H4)₂, puis, rejoint par les deux dimères (H2A-H2B) de part et d'autre, forment l'octamère d'histone. (D) Le nucléosome est formé par l'enroulement de ~146pb d'ADN autour de l'octamère (~1,7 tours). Trois vues du nucléosome sont montrées sur cette figure (de gauche à droite, la face, le côté et le haut), sur lesquelles on peut constater la symétrie du nucléosome (PDB :1KX5) (Davey et al., 2002).

Contrairement au domaine central des histones d'octamère, les extrémités N- et C- terminales, qui ont une longueur comprise entre 14 et 38 acides aminés, sont très basiques (riches en résidus lysines et arginine) et dépourvus de structure particulière. Ces extrémités peuvent être soumises à de nombreuses modifications post-traductionnelles, ce qui peut affecter leur charge, l'accessibilité à l'ADN, ainsi que les interactions impliquant les protéines du nucléosome (Ransom et al., 2010).

Les histones H1 sont des protéines internucléosomales d'environ 90aa, qui se montrent moins bien conservées que les histones de l'octamère. La structure de cette histone est constituée d'un domaine globulaire, assez conservé, ainsi que d'une courte et une longue extrémité, respectivement, N- et C-terminale. Le domaine globulaire de cette histone présente un motif de type « *winged helix-turn-helix* » avec un repliement de type $\alpha\beta\alpha\beta\beta$, et joue un rôle crucial dans l'interaction avec l'ADN. L'extrémité C-terminale de cette histone est riche en résidus lysines et joue un rôle important de par sa capacité à interagir fortement avec l'ADN, ainsi qu'avec plusieurs protéines nucléaires et cytosoliques (McBryant et al., 2010)(Füllgrabe et al., 2010).

1.2.1.2 Premier rôle des histones : Compaction de l'ADN génomique néosynthétisé

L'assemblage de l'ADN en chromatine suit un processus hiérarchique, commençant par la formation d'une suite de nucléosomes tout au long de l'ADN, jusqu'à un établissement des domaines nucléaires fonctionnels (*cf. Fig. 1.14-A*). Ce processus nécessite l'intervention de nombreuses chaperonnes d'histones, qui interagissent avec les histones et favorisent leur dépôt sur l'ADN.

Ainsi, la compaction de l'ADN en chromatine peut être divisée en différentes étapes (*cf. Fig. 1.14-A*). La première étape consiste en l'assemblage du nucléosome par le dépôt sur l'ADN d'un tétramère (H3-H4)₂, autour duquel s'enroule ~120pb, suivi

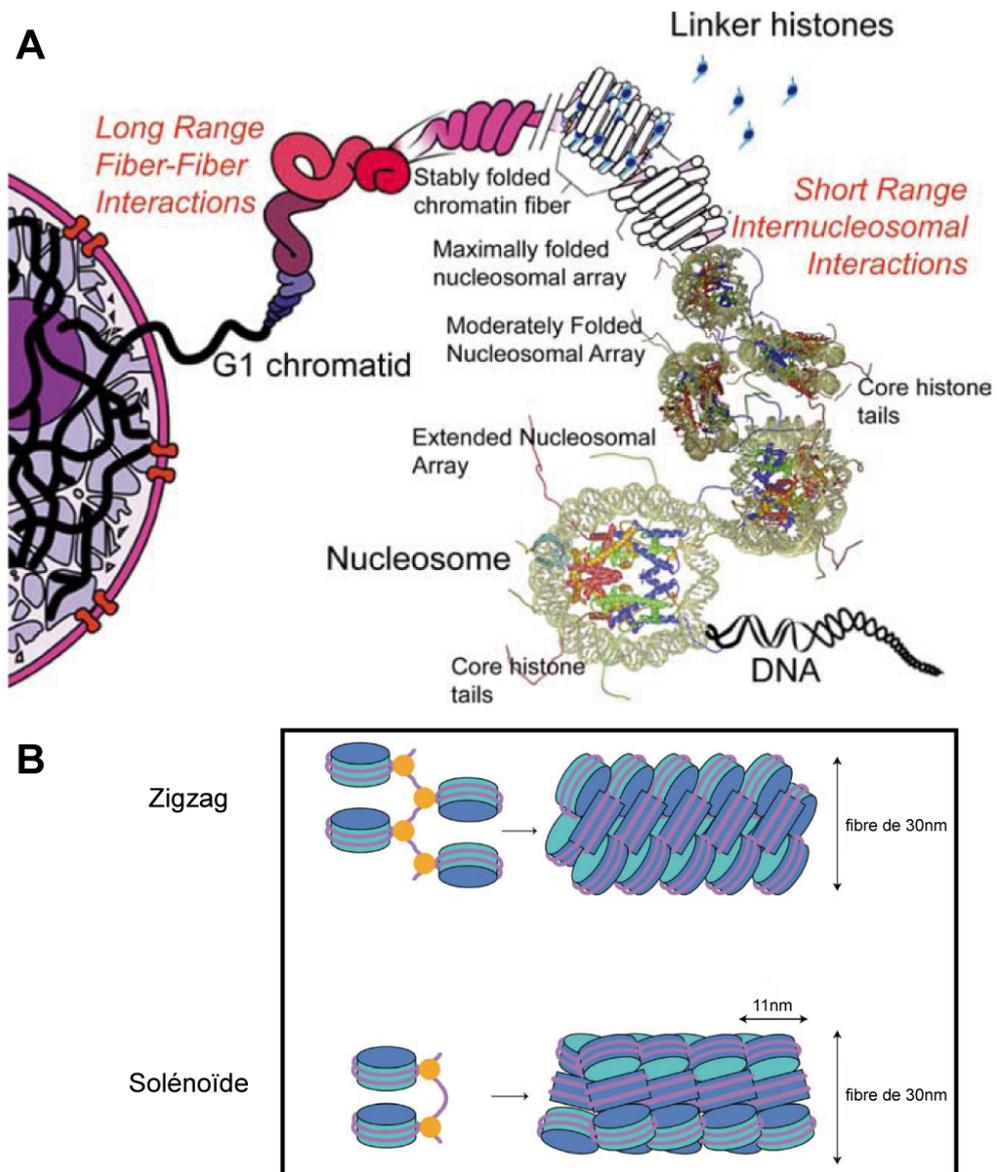


FIG. 1.14 – Organisation de l'ADN génomique dans les cellules eucaryotiques

(A) Représentation schématique de l'organisation de l'ADN génomique dans les cellules des eucaryotes. La compaction de l'ADN génomique en chromatine est un processus hiérarchique, commençant par la formation de plusieurs nucléosomes (l'unité de base de la chromatine, entourant ~ 146 pb de l'ADN), qui s'enchainent comme les perles d'un collier tout au long de l'ADN. Le second niveau de compaction de l'ADN est caractérisé par la formation du nucléofilament de 30nm, dépendant des histones internucléosomales (H1, linker histones), qui peut se replier davantage sur lui-même grâce aux interactions à longue distance (Chakravarthy et al., 2005). (B) Deux modèles de structure du nucléofilament de 30nm. Le modèle de « zigzag » (en haut), dans lequel les nucléosomes sont disposés de manière alternée et le modèle de « solénoïde » (en bas), dans lequel les nucléosomes sont disposés de façon adjacente. Les octamères d'histones sont représentés en bleu, l'ADN en magenta et les histones internucléosomales (H1) en jaune (Khorasanizadeh, 2004).

d'une incorporation de deux dimères (H2A-H2B) de part et d'autre de ce tétramère (*cf. Fig. 1.13*). Ce processus se produit aussitôt que la longueur d'ADN nécessaire pour entourer l'octamère d'histone est synthétisée par la machinerie de réplication.

La mise en place du tétramère est facilitée par deux chaperonnes CAF-1 « *Chromatin Assembly Factor 1* » et ASF-1 « *Anti-Silencing Function-1* », tandis que la fixation des deux dimères est stimulée par la chaperonne NAP-1 « *Nucleosome Assembly Protein 1* » (Ransom et al., 2010). Le mécanisme aboutissant à la formation du tétramère (H3-H4)₂, à partir de deux dimères, n'a pas encore été élucidé. Il pourrait être assemblé soit au niveau de l'ADN soit avant son incorporation dans cette molécule. En effet, la chaperonne Asf1 se fixe à l'interface du dimère (H3-H4), empêchant ainsi la formation prématurée du tétramère, puis transmet ces histones à une autre chaperonne, CAF-1, par un mécanisme jusqu'à présent non connu. La chaperonne CAF-1 est un complexe très conservé, composé de trois sous-unités, et est impliqué dans l'assemblage du nucléosome lors de la réplication, via son interaction avec la protéine PCNA « *Proliferating Cell Nuclear Antigen* », qui joue un rôle important dans la processivité de la réplication de l'ADN. Il a été montré que le facteur CAF-1 interagissait au niveau de l'hélice $\alpha 1$ de l'histone H4 (*cf. Fig. 1.15*) et n'empêchait pas la formation du tétramère, suggérant que cette chaperonne pourrait être capable d'interagir avec (H3-H4)₂ et de le déposer sur l'ADN (Ransom et al., 2010). Après l'assemblage du tétramère (H3-H4)₂ sur l'ADN, afin de prévenir la formation de complexes non productifs, la chaperonne NAP-1 empêche la fixation du dimère (H2A-H2B) sur l'ADN en dehors du tétramère, en diminuant son affinité pour l'ADN sans pour autant bloquer sa capacité à s'y fixer (Andrews et al., 2010)(Formosa, 2010).

Les chaperonnes d'histones déposent ces dernières sur l'ADN de manière aléatoire, formant irrégulièrement des nucléosomes, qui peuvent donc être très espacés ou au contraire trop proches des nucléosomes adjacents. L'étape suivante est assurée par des facteurs de remodelage de la chromatine ATP-dépendants, qui favorisent le

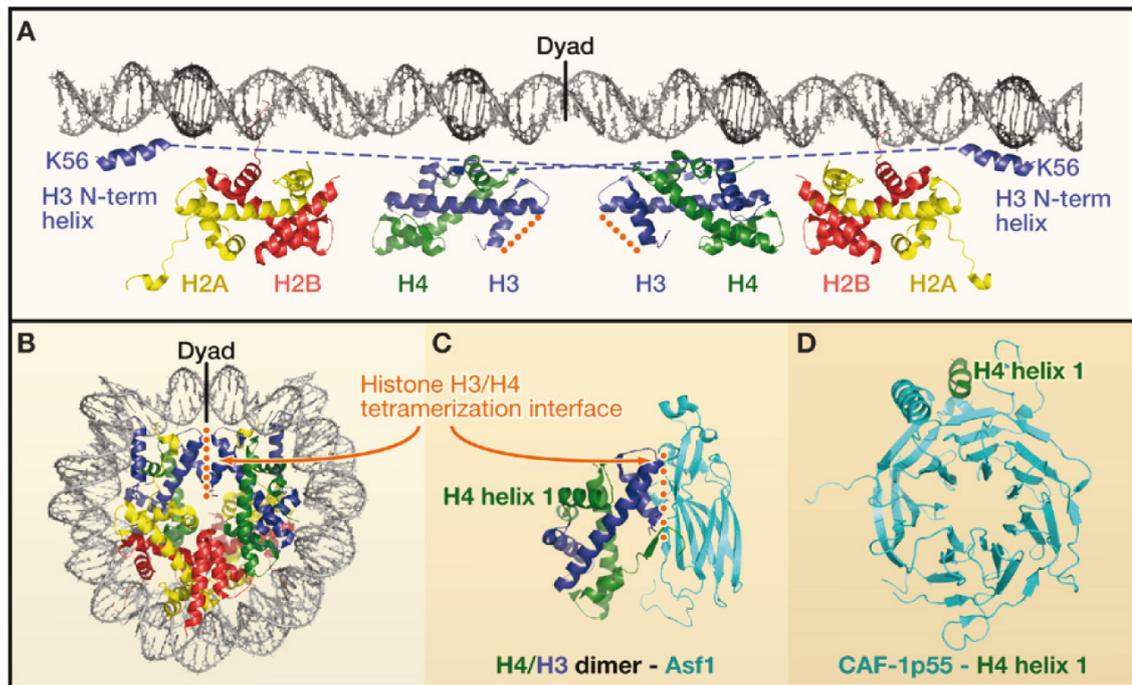


FIG. 1.15 – Anatomie des nucléosomes et des chaperonnes d’histones.

(A) Localisation de la position des histones sur 147pb de l’ADN déroulé (PDB 1KX5). (B) Structure du nucléosome (PDB 1KX5). (C) Interaction entre le dimère $(H3-H4)_2$ et la chaperonne Asf1 (PDB ID2Hue). (D) Interaction entre CAF-1 p55 et l’hélice alpha N-terminale de l’histone H4 (PDB 3C99). (Ransom et al., 2010)

déplacement des histones d’octamère le long de l’ADN à la recherche de la position idéale. Cette position est déterminée en fonction de la séquence de l’ADN, les motifs spécifiques des protéines fixant l’ADN et les répulsions électrostatiques des octamères d’histones adjacents (Wu et al., 2010). A ce niveau, la lysine en position 56 de l’histone H3, acétylée par l’acétyltransférase Rtt109, facilite le repositionnement des nucléosomes en interférant dans l’interaction se produisant entre cette histone (H3K56ac) et l’ADN. Enfin, dès que les nucléosomes sont régulièrement positionnés, H3K56 est déacétylée, stabilisant ainsi le nucléosome. Par ailleurs, il a également été montré que cette modification post-traductionnelle de l’histone H3 augmentait l’affinité pour la chaperonne CAF-1, ce qui favorise l’assemblage des nucléosomes. L’acétylation des extrémités N-terminales d’H4 (H4K5 et H4K12) et d’H3 (H3K9 et H3K14) sont également des modifications post-traductionnelles des histones essentielles à la

formation des nucléosomes. Bien que les rôles d'H4K5 et d'H4K12 n'aient pas encore été compris, il semblerait que les groupements acétyles ajoutés aux histones H3 par Gcn5 « *General control nonderepressable 5* » soient également requis pour une incorporation efficace des nouvelles histones par CAF-1, en augmentant leur affinité pour cette chaperonne (Burgess and Zhang, 2010). L'acétylation de la lysine 91 d'H4 (H4K91), située à l'interface des dimères (H2A-H2B) et du tétramère (H3-H4)₂ constitue un autre exemple de modifications nécessaires à la formation correcte des nucléosomes. Celle-ci joue un rôle en déstabilisant l'octamère, probablement dans le but de prévenir une interaction prématurée entre le dimère et le tétramère pendant l'assemblage de la chromatine, tandis que la déacétylation de H4K91 permettrait la formation de l'octamère (Ransom et al., 2010).

L'étape suivante de la formation de la chromatine est caractérisée par l'incorporation d'histones internucléosomales (H1), par la chaperonne NASP « *Nuclear Autoantigenic Sperm Protein* », permettant de joindre deux nucléosomes juxtaposés (McBryant et al., 2010). Ce processus est accompagné par un repliement du nucléofilament en fibre de 30nm, également appelé « *structure en collier de perles* », qui s'enroule davantage sous la forme d'une structure plus compacte. Bien que de nombreuses études suggèrent que cette structure serait de type « *zigzag* », agencement dans lequel les nucléosomes disposés de façon alternés sont physiquement plus proches que ceux disposés de façon adjacente, certains travaux proposent l'existence d'une structure alternative de type solénoïde, dans laquelle six nucléosomes consécutifs sont arrangés autour d'une hélice (*cf. Fig. 1.14-B*). Enfin, cette fibre de 30nm existe pendant l'interphase du cycle cellulaire, en revanche durant la mitose celle-ci peut se compacter encore davantage (d'un facteur 10 000 à 20 000), grâce aux interactions à longue distance du nucléofilament (Woodcock and Ghosh, 2010)(Scipioni et al., 2010).

Pour conclure, la structure de la chromatine est également influencée par l'espacement entre les nucléosomes ainsi que par la présence des variants d'histones

au sein de ces particules. Ainsi, la longueur entre deux nucléosomes est en général de 35pb (chez les vertébrés) et peut varier en fonction de l'espèce ou encore du tissu dans un même organisme (Woodcock and Ghosh, 2010). L'incorporation de variants d'histone au sein d'un octamère peut influencer la stabilité du nucléosome. Par exemple, une structure cristallographique récemment obtenue pour un nucléosome contenant un variant d'H3 (H3T, fortement exprimés dans les testicules) révèle un complexe beaucoup moins stable en comparaison au nucléosome conventionnel, contenant H3.1. Les auteurs suggèrent que la diminution de la stabilité de ce nucléosome pourrait favoriser la transition globale de l'architecture de la chromatine, nécessaire à la mise en œuvre des processus cellulaires relatifs à la méiose et/ou à la maturation post-méiotique (Tachiwana et al., 2010).

1.2.1.3 Deuxième rôle des histones : Régulation de l'expression génétique

La régulation de l'expression génétique est la deuxième fonction importante des histones, et s'effectue via leurs modifications post-traductionnelles, telles que : l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination, la polyADP-ribosylation et la sumoylation. Toutes ces modifications, pouvant être ajoutées de façon réversible, ciblent le plus souvent les extrémités N- et C-terminales mais également le domaine central des histones. Elles peuvent se former de manière séquentielle, selon laquelle la première modification influencerait la seconde, ou encore être ajoutées en combinaison avec plusieurs autres modifications (*cf. Fig. 1.16*) (Füllgrabe et al., 2010) (Zaidi et al., 2010).

De nombreuses études, montrant l'association des modifications à des processus biologiques spécifiques, ont conduit à l'hypothèse selon laquelle les différentes combinaisons de ces modifications formeraient un « *code d'histone* », qui serait lu par des protéines régulatrices et serait traduit en états chromatiniens particuliers, comptant un état actif, permissif, restrictif ou encore inactif (Sims and Reinberg, 2008). L'état

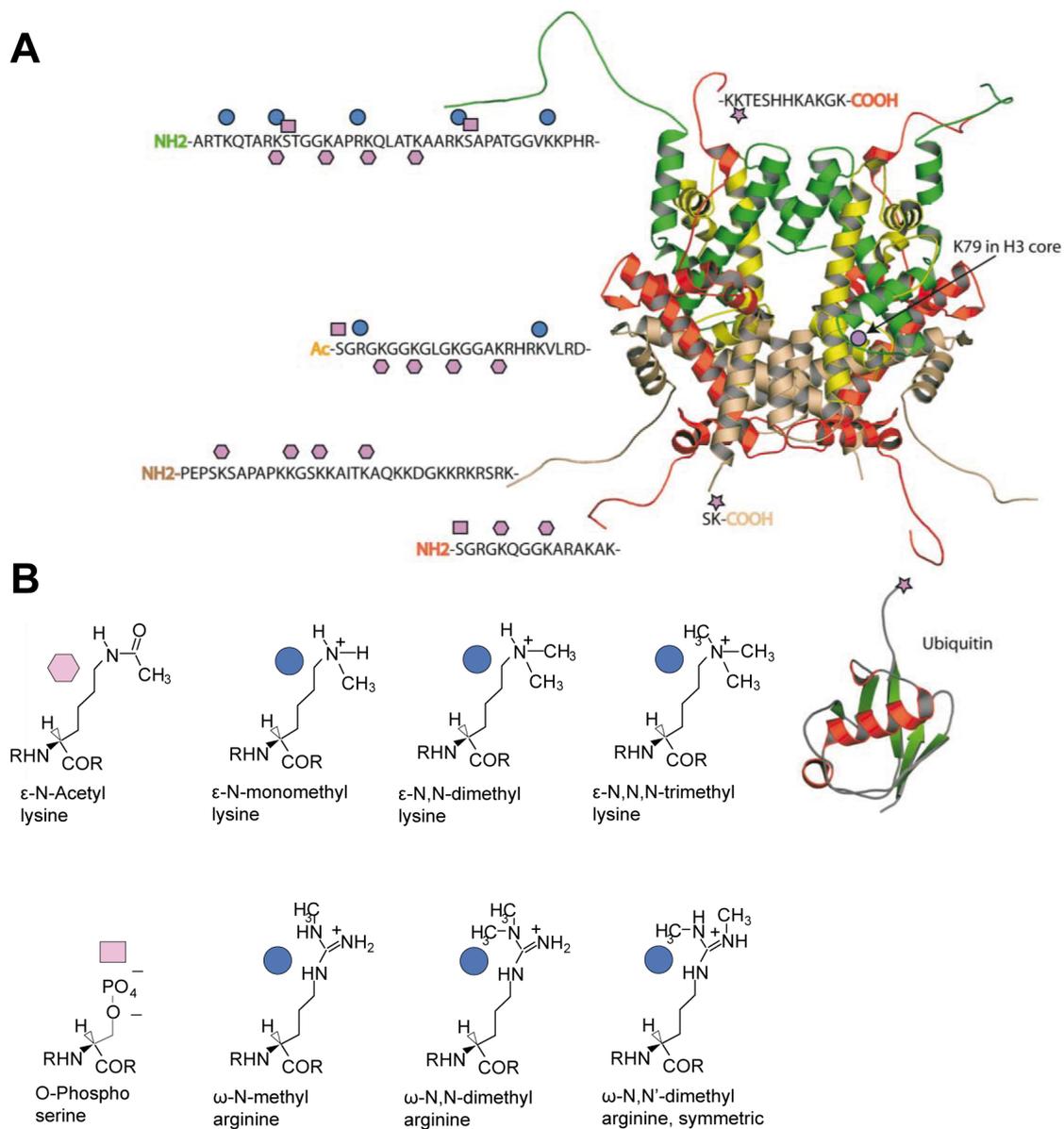


FIG. 1.16 – Représentation de différents types de modifications post-transcriptionnelles observées au sein d'un octamère d'histone.

(A) Illustration de certaines parties modifiées des quatre classes d'histones d'octamère (H2A est représenté en rouge, H2B en marron claire, H3 en vert et H4 en jaune), qui peuvent être localisées au niveau de l'extrémité N-terminale (NH₂) ou C-terminale (COOH). (B) Exemple de modifications covalentes rencontrées aux niveaux des résidus des histones (Khorasanizadeh, 2004).

chromatinien d'une région ainsi formée pourrait non seulement régler son expression, mais aussi être maintenu tel quel sur plusieurs générations.

Le « *code d'histone* » étant relativement complexe, dans le cadre de l'introduction de ma thèse, je ne me focaliserai que sur quelques exemples impliquant des modifications post-traductionnelles des histones dans divers processus du métabolisme cellulaires.

Ainsi, l'acétylation des résidus lysines des histones (*cf. Fig. 1.16*), localisés à des régions spécifiques du génome, peuvent neutraliser par leur charge positive des contacts se produisant entre les histones et l'ADN, favorisant ainsi l'accès à la machinerie transcriptionnelle et l'activation de la transcription de la région concernée. Comme mentionné dans le paragraphe précédent, cette modification des histones joue un rôle important dans l'assemblage des nucléosomes (*cf. §1.2.1.2*). De plus, il a été montré que l'acétylation des histones par l'acétyltransférase Tip60 était importante dans le processus de la réparation de l'ADN, en favorisant le relâchement de la chromatine et en permettant l'accès aux protéines réparatrices de l'ADN. A ce niveau les lysines triméthylés de l'histone H3 (H3K9me3 et H3K36me3) interviennent également par leur interaction avec le chromodomaine de Tip60 afin de stimuler l'activité de cette protéine (Vaissière and Herceg, 2010).

La phosphorylation des histones peut être illustrée par l'exemple de la sérine 14 phosphorylé de l'histone H2B (H2B-S14ph), connue pour son implication dans l'apoptose cellulaire. Cette modification est assurée par la kinase Mst1 « *mammalian sterile twenty* », qui est activée via son clivage par la caspase-3, un acteur majeur de l'apoptose, permettant ainsi sa translocalisation vers le noyau de la cellule. H2B-S14ph est reconnue par la protéine RCC1 « *regulator of chromosome condensation 1* », nécessaire pour catalyser la formation de RanGTP, et inhibe son activité. La réduction du taux de RanGTP provoque à son tour l'inhibition la machinerie du transport nucléaire, empêchant le déplacement vers le noyau cellulaire du facteur NF- κ B-p65, impliqué dans la survie de la cellule. Ainsi, au delà du rôle joué par H2B-S14ph dans l'apoptose, la

modification de cette histone contribue également au processus d'inactivation de la voie de survie cellulaire impliquant NF- κ B (Füllgrabe et al., 2010).

La méthylation des histones peut se produire sur les résidus lysines et arginines de façon réversible grâce à l'action de deux enzymes antagonistes. Par exemple, la méthylation de H3K4 est accomplie par les méthylases Set1 et MLL « *mixed lineage leukaemia* », et enlevée par les déméthylases LSD1 « *lysine-specific histone demethylase* » et JARID1 « *jumonji AT-rich interactive domain* ». Trois formes de méthylation des histones peuvent exister : les formes mono-, di- ou triméthylées (*cf. Fig. 1.16*) et sont fréquemment observées sur H3K4, K9, K27, K36 et K79 (Chi et al., 2010), pouvant parfois présenter des effets contraires. Par exemple, la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me₃) est associée à une forte activation de la transcription, à un taux élevé à proximité des sites de démarrage de la transcription de gènes fortement exprimés, alors que la triméthylation d'H3K27 (H3K27me₃) est fréquemment associée à l'extinction de gènes. Par ailleurs, il a été montré que le nombre de groupements méthyles, présents sur une même lysine, pouvait amener différents types de réponses, augmentant ainsi la complexité du code d'histone. Tout comme la méthylation des lysines, la méthylation des arginines cible le plus souvent les extrémités amino-terminales des histones H3 et H4. Cette modification des arginines est souvent associée à un état actif de la transcription, dont un exemple peut être illustré par la méthylation de l'arginine 3 de l'histone H4, qui facilite l'acétylation de cette même protéine et augmente l'activation de la transcription par l'intermédiaire des récepteurs des hormones nucléaires (Chi et al., 2010)(Sims and Reinberg, 2008).

Le métabolisme des histones méthylées étant relativement lent, durant les conditions habituelles de la cellule, la transmission de cette modification d'une cellule mère à des cellules filles peut être observée. Ce processus peut être illustré par la « *mémoire transcriptionnelle* » du régulon galactose (GAL) chez la levure. En effet, dans un milieu riche en glucose les gènes appartenant à ce régulon sont

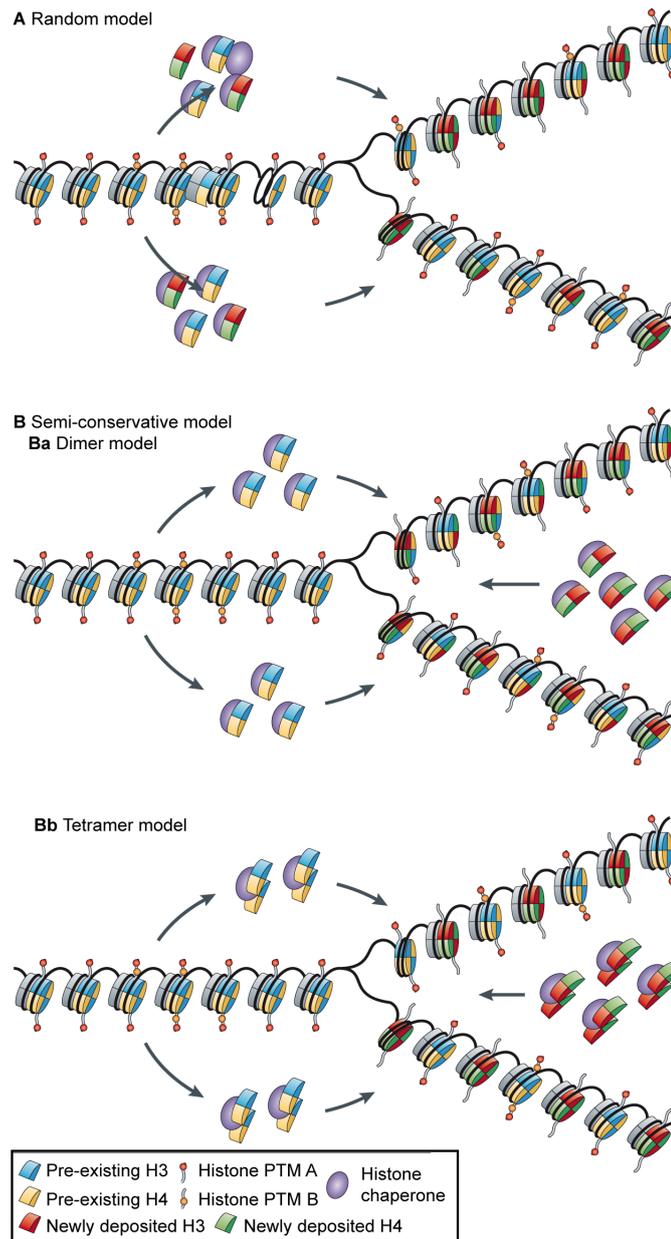


FIG. 1.17 – Modèles du dépôt des histones lors de la réplication.

(A) Modèle d'assemblage aléatoire, dans lequel les tétramères $(H3-H4)_2$ sont formés aléatoirement à partir d'histones recyclés et néosynthétisés (B) Modèle d'assemblage semi-conservatif des tétramères $(H3-H4)_2$. (Ba) Dans ce modèle, les tétramères $(H3-H4)_2$ sont divisés lors de la réplication, et les dimères s'assemblent chacun avec un dimère néosynthétisé pour former les tétramères. (Bb) Dans ce modèle, les tétramères $(H3-H4)_2$ sont entièrement recyclés et s'alternent sur l'ADN avec des tétramères néosynthétisés. (Margueron and Reinberg, 2010)

fortement réprimés, et fortement exprimés dans un milieu ne contenant que la galactose comme la source du carbone. Au sein des cellules, les gènes ayant une « *mémoire*

transcriptionnelle » sont activés beaucoup plus rapidement que ceux n'ayant pas de cette mémoire. Il a été proposé que cette capacité à réagir vite tient à la méthylation de la lysine de l'histone H3 en position 4 (H3K4me), ajoutée par la méthylase Set1, et qui persiste à travers le cycle activation/répression du régulon GAL. L'histone H3K4 triméthylée constitue donc un marqueur des gènes inactifs, mais dont la transcription a été relativement récente. Le mécanisme permettant la transmission des modifications post-traductionnelles des histones peut se produire au moment de la réplication de l'ADN, par le recyclage des dimères d'histones provenant de la chromatine parentale. En effet, l'un des modèles prévoit que le tétramère (H3-H4)₂ se dissocierait en deux dimères, dont l'un pourrait se déposer sur le brin d'ADN néo-synthétisé (*cf. Fig. 1.17*). De cette façon le dimère parentale pourrait servir de matrice pour les modifications post-traductionnelles des dimères nouvellement synthétisés et préserver la marque sur la même séquence d'ADN néosynthétisé (Probst et al., 2009) (Margueron and Reinberg, 2010).

1.2.2 Expression des histones réplication-dépendants

Les histones peuvent être réparties en deux groupes, en fonction de leur mode d'expression au cours du cycle cellulaire. Le premier concerne les histones impliquées dans l'empaquetage de l'ADN néosynthétisé et dont l'expression est étroitement coordonnée à la réplication du génome de la cellule. Ces histones sont dites « *réplication-dépendant* », ou « *canoniques* », et sont caractérisées par une expression massive, qui se limite à la phase S du cycle cellulaire. Le second groupe concerne les histones de remplacement, ou variants d'histones, qui peuvent remplir des rôles bien spécifiques tels que la régulation de la transcription des gènes (par exemple assurés par un variant de l'histone H3.3) ou encore l'inactivation du chromosome X par le variant MacroH2A. Les histones faisant partie de ce groupe sont appelées « *réplication-indépendant* », et contrairement au groupe des histones réplication-dépendants, leur

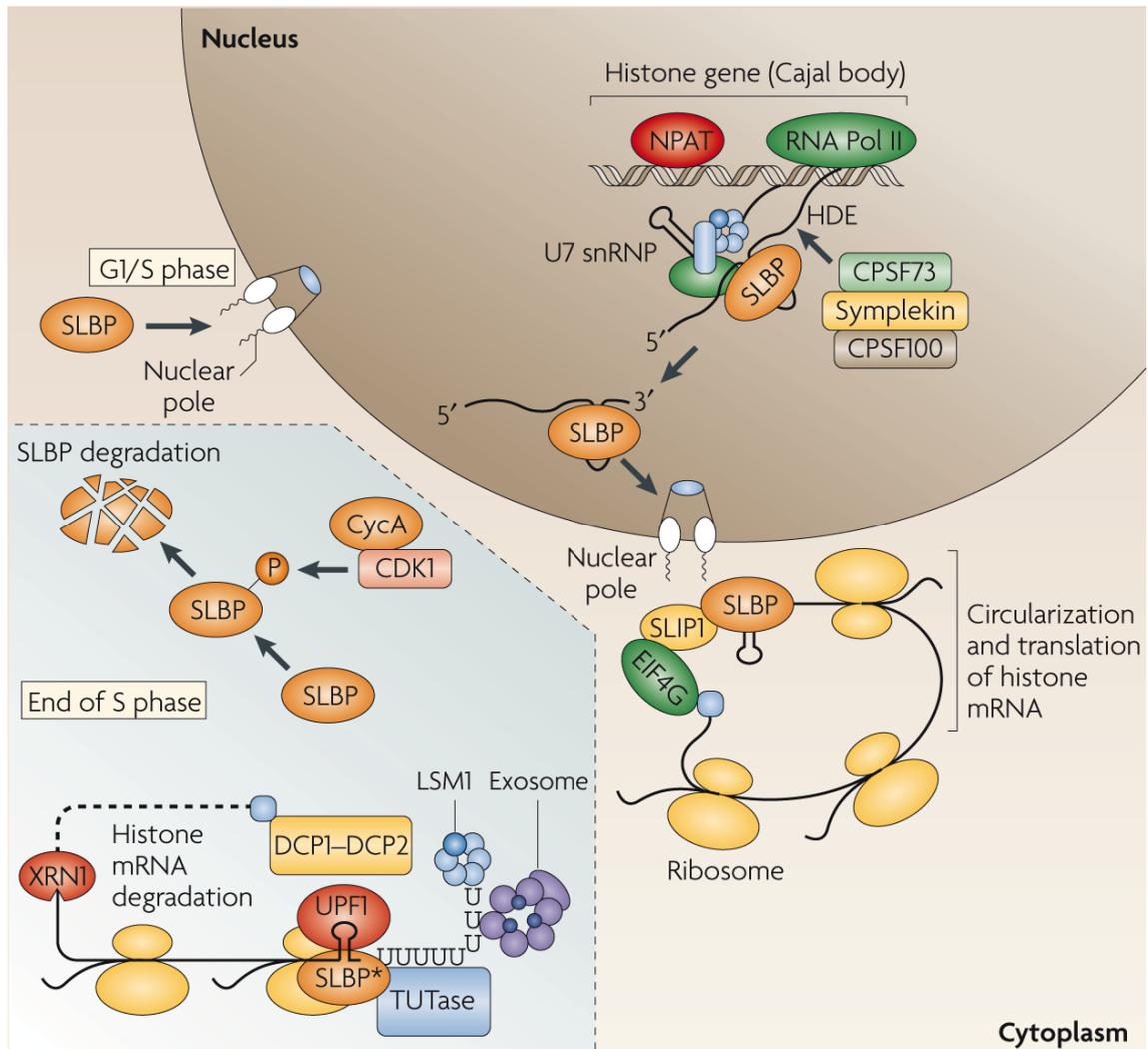


FIG. 1.18 – Représentation globale du métabolisme des ARNm des histones canoniques au sein des cellules des mammifères.

Les processus de transcription et de maturation des ARN pré-messagers des histones ont lieu au niveau des HLB (Histone Locus Bodies), recouvrant partiellement les corps de Cajal (Cajal body) pendant la phase S du cycle cellulaire. L'étape de maturation est spécifique aux histones et dépendante de la présence de U7snRNP, SLBP et d'un complexe de clivage (mécanisme détaillé dans la figure Fig. 1.21). Une fois matures, les messagers des histones, fixés à la protéine SLBP, sont conduits dans le cytoplasme, pour être traduits en protéines. Au ce niveau, un des modèles de traduction propose une circularisation des ARNm grâce aux interactions se produisant entre les protéines SLBP, SLIP1 et eIF4G, qui pourrait augmenter l'efficacité de traduction en favorisant le recyclage du ribosome du 3' vers 5'. À la fin de la phase S du cycle cellulaire, une suite de résidus U est ajoutée aux ARNm des histones, constituant ainsi un site de fixation du complexe LSM1, qui en coopération avec un complexe de « décoiffage » (decapping) et un exosome, dégrade cet ARN dans les deux sens (5' vers 3' et 3' vers 5'). Au même moment, cycline A (CycA)-CDK1 (cyclin-dependent kinase 1) induit la dégradation de la protéine SLBP par l'intermédiaire de sa phosphorylation (Marzluff et al., 2008).

synthèse n'est pas régulée en fonction du cycle cellulaire et elles sont donc exprimées à un niveau basal tout au long du cycle cellulaire.

Dans notre laboratoire, nous nous sommes intéressés à la régulation de l'expression des histones réplication-dépendants, et plus particulièrement au niveau de leur traduction. La particularité de ces histones est leur forte demande pendant la phase S du cycle cellulaire, afin de compacter tout l'ADN néosynthétisé. En effet, chaque fois qu'une cellule se divise, 10^8 molécules de chaque type d'histones doivent être rapidement synthétisées et déposées sur l'ADN, sous risque d'une perte de viabilité cellulaire, démontrée chez la levure par Han et al (Han et al., 1987). De plus, la réduction du taux de synthèse des histones au moment de la phase de réplication de l'ADN résulte en l'arrêt des cellules en phase S (Bongiorno-Borbone et al., 2010) D'un autre côté, les histones étant les protéines très basiques et chargées positivement, certaines interactions entre celles-ci et des composantes cellulaires chargées négativement peuvent se produire de façon non spécifiques, ce qui peut résulter en une toxicité cellulaire (Singh et al., 2009a)(Singh et al., 2009b). Ainsi, l'expression des histones réplication-dépendants doit suivre un processus bien coordonné, afin de maintenir un bon rapport entre ces protéines et l'ADN de cellule. Plusieurs stratégies de régulation peuvent être observées pour ces histones à différents niveaux de l'expression génétique, dont je décrirai les caractéristiques principales dans les paragraphes qui suivent (*cf. Fig. 1.18*).

1.2.2.1 Organisation des gènes d'histones canoniques

L'une des caractéristiques les plus remarquables dans l'organisation des gènes d'histones est le regroupement de multiples copies de gènes de chaque type d'histone en plusieurs clusters, localisés dans les compartiments nucléaires appelés HLB, « *Histone Locus Bodies* », qui en fonction de la phase du cycle cellulaire recouvrent partiellement les « *corps de Cajal* » (Cajal body) (Bongiorno-Borbone et al., 2010)

(Ghule et al., 2008)(Bongiorno-Borbone et al., 2008). Cette étroite liaison des gènes d'histones réplication-dépendants est unique chez les mammifères, et considérée comme une organisation très conservée au cours de l'évolution. De nombreuses hypothèses ont suggéré que la pression de sélection de cette organisation pourrait résulter d'une coordination entre la régulation et la biosynthèse de leurs ARNm, qui doit se faire uniquement au cours de la phase S du cycle cellulaire. D'autant plus que les HBP contiennent un ensemble de facteurs spécifiques et nécessaires à la synthèse des messagers matures des histones (exemple p220^{NPAT} « *nuclear protein ataxia-telanglectasia* », FLASH, Lsm 10, Lsm11 et SLBP) suggérant que la concentration de ces facteurs à proximité immédiate de ces gènes pourrait permettre une régulation plus efficace de la synthèse d'histones canoniques à un moment précis du cycle cellulaire (Nizami et al., 2010)(Ghule et al., 2008)(Marzluff et al., 2002). Cette hypothèse est davantage étayée par des études menées récemment sur l'expression des gènes d'histones durant un stress cellulaire induit par l'irradiation de la cellule aux UV. Ainsi, dans ces conditions, la structure d'HLB devient altérée et un certain nombre de ses composants, notamment FLASH et NPAT, sont dégradés, ce qui résulte en une diminution de l'expression des gènes d'histones et en l'arrêt des cellules en phase S du cycle cellulaire, permettant ainsi à la cellule de réparer l'ADN avant de progresser vers la phase de mitose (Bongiorno-Borbone et al., 2010).

Deux types de clusters peuvent être distingués pour les gènes codant pour ces histones. Le premier est caractérisé par un ensemble de gènes répétés en tandem, dont l'unité de base contient une copie de chacune des cinq classes d'histones. Le second est caractérisé par des clusters « *entremêlés* », dans lesquels il n'existe aucun ordre commun de gènes d'histones et pour lesquels les gènes pour chaque protéine d'histone ne sont pas identiques. Il a été montré que ces clusters pouvaient être spécifiques aux espèces. Par exemple chez les vertébrés, les clusters des gènes d'histones répétés en tandem sont retrouvés chez les grenouilles, tandis que les mammifères et les oiseaux possèdent des clusters « *entremêlés* » (Marzluff et al., 2008) (*cf. Fig. 1.19*).

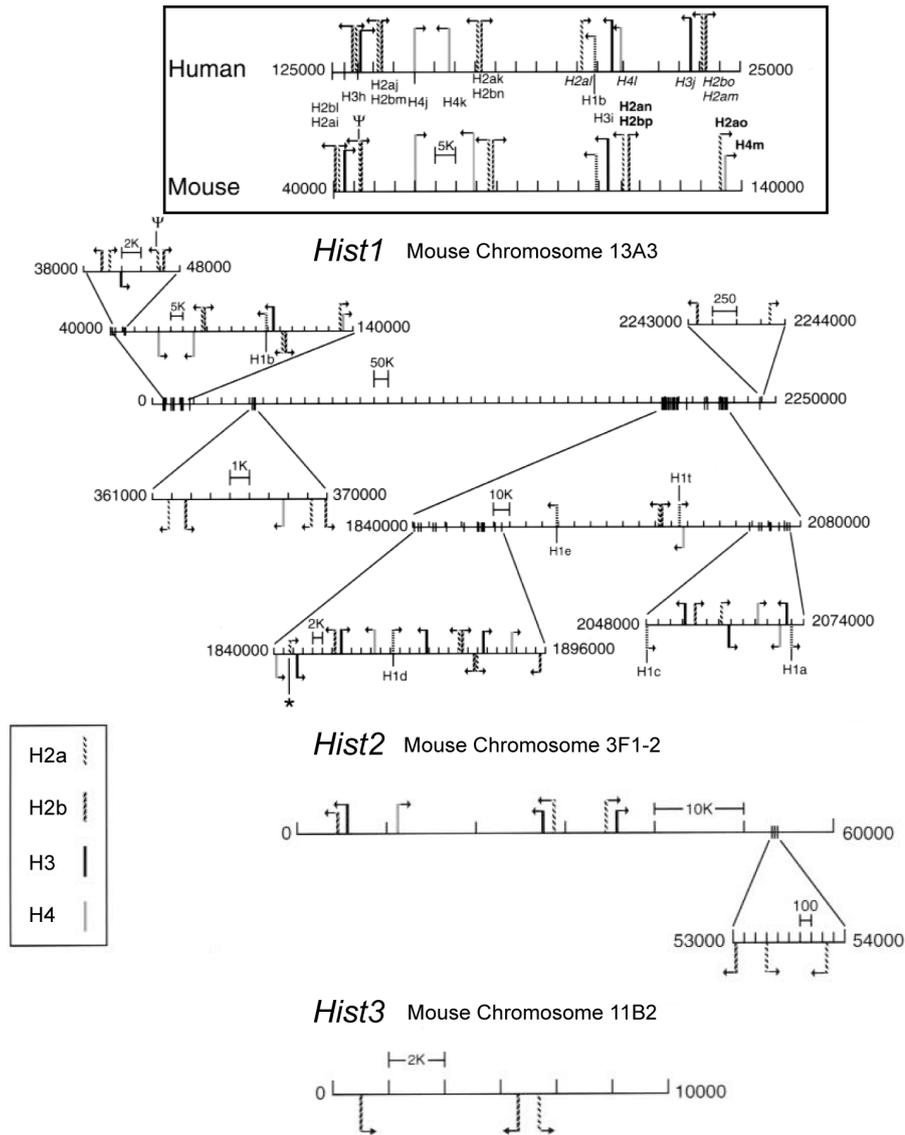


FIG. 1.19 – Représentation de l’organisation des gènes d’histones réplication-dépendant de la souris.

Sur le schéma sont montrés trois clusters : *Hist1* sur le chromosome 13, *Hist2* sur le chromosome 3 et *Hist3* sur le chromosome 11. Le centromère est montré à gauche, les pseudogènes sont indiqués par ψ , l’astérisque indique la position des gènes présents chez les souris et absents chez les humains. L’encart du haut présente la comparaison de l’organisation des gènes d’humain et de souris, montrant une forte similarité. (Marzluff et al., 2002)

1.2.2.2 Transcription des gènes d’histones canoniques

Tout comme l’organisation génétique, la transcription des gènes d’histones canoniques présente également les caractéristiques d’une régulation étroite de la

synthèse massive des histones et de la réplication de l'ADN génomique. En effet, il a été montré (Marzluff et al., 2008) que le taux d'ARNm codant pour les histones augmentait rapidement, d'environ 35 fois, au début de la phase S du cycle cellulaire et diminuait rapidement une fois la réplication de l'ADN terminée (cf. Fig. 1.22-C).

La transcription des gènes d'histones canoniques s'effectue par l'intermédiaire de l'ARN polymérase II, à partir de promoteurs spécifiques à chaque classe d'histones, et implique beaucoup de facteurs de transcription communs à tous les autres gènes cellulaires.

Les promoteurs de ces gènes sont caractérisés par des éléments appelés SSRE « *subtype-specific regulator element* » qui interagissent spécifiquement avec certaines protéines impliquées dans l'activation de ces gènes. Par exemple, c'est le cas de la protéine Oct-1 et de son coactivateur OCA-S « *Oct-1 coactivator in S-phase* » qui interagissent avec les SSRE au niveau des promoteurs des histones H2B, et de la protéine HiNF-P qui interagit avec ceux des histones H4. Récemment, un de ces motifs a été caractérisé chez la drosophile, *Drosophila melanogaster* (dm), partageant de nombreuses similarités dans l'expression des gènes d'histones avec les humains. Ce motif serait composé d'un ensemble d'octamères et serait reconnu par la protéine Pdm-1, « *POU-domain protein in D.melanogaster* », capable d'interagir avec le facteur dmOCA-S « *dm Oct-1 coactivator in S-phase* », activant ainsi la transcription des gènes d'histone H2A et H2B (cf. Fig. 1.20-B). Toutefois, le mécanisme exacte aboutissant à la stimulation de la transcription de ces gènes via Pdm-1 reste encore non élucidé (Lee et al., 2010).

Les protéines interagissant spécifiquement les éléments SSRE constituent la cible du facteur NPAT « *Nuclear Protein Ataxia-Telangiectasia* », activé uniquement pendant la phase S du cycle cellulaire, via sa phosphorylation par la cycline E-CDK2 « *cyclin-dependent kinase 2* ». De plus, les études menées sur NPAT ont révélé qu'il était capable d'interagir via son domaine très conservé (DLFD) avec le complexe

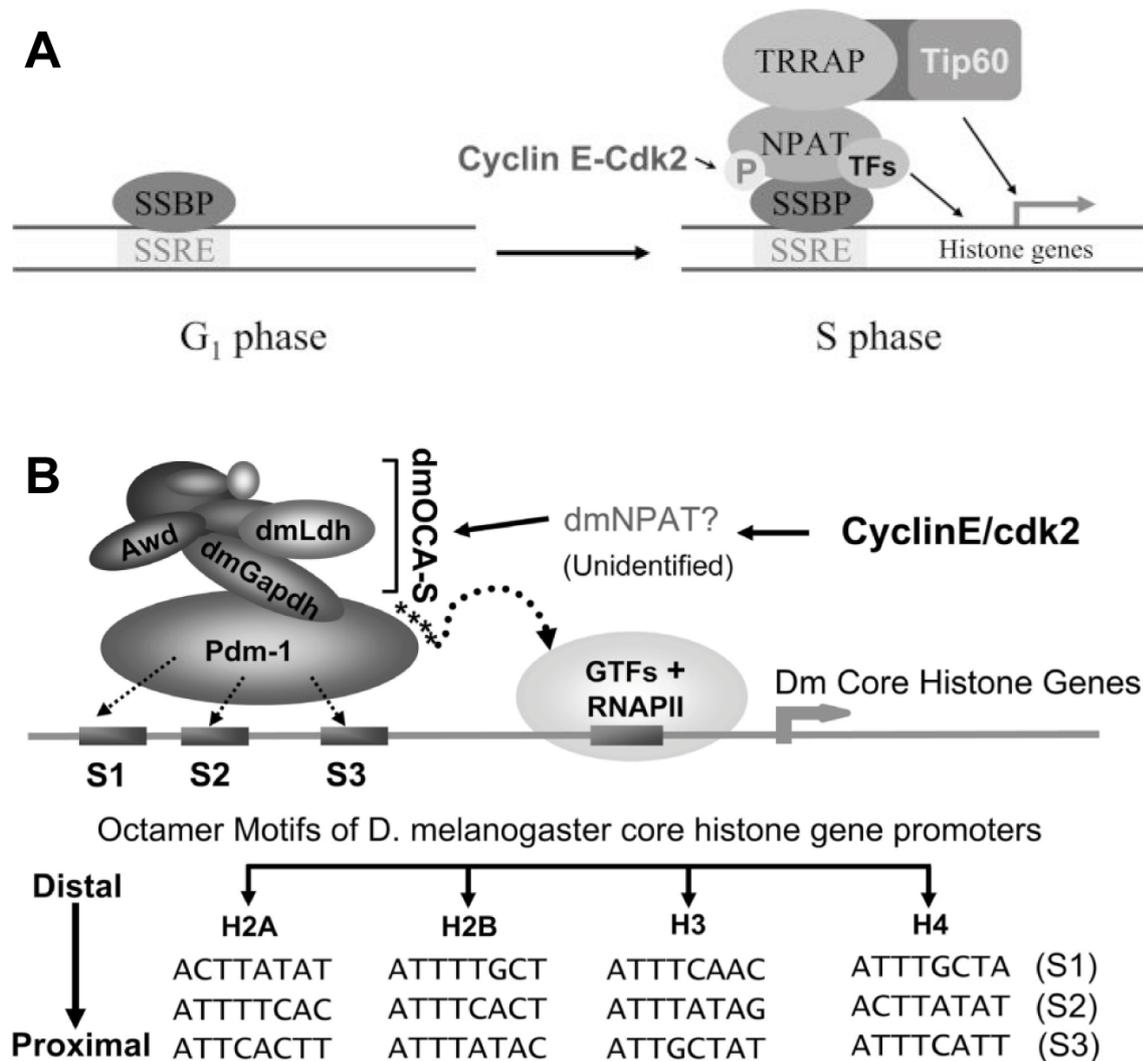


FIG. 1.20 – Modèle de la régulation de la transcription des gènes d’histones.

(A) Modèle d’une activation de la transcription coordonnée des gènes de chaque type d’histones par NPAT, substrat de la cycline E-Cdk2. SSRE « *subtype-specific regulator element* », SSBP « *subtype-specific binding protein* », tels que Oct-1 et HiNF-P pouvant se fixer directement sur SSRE, localisé au sein des promoteurs d’un type d’histone. TFs « *transcription factors* », P « *phosphorylation* » (DeRan et al., 2008). (B) L’exemple chez *D.melanogastere* de SSRE constitué d’une suite de motifs octamères recrutant un facteur Pdm-1 qui interagit avec dmOCA-S pour activer la transcription (Lee et al., 2010).

TRRAP/Tip60, « *transformation/transactivation domain associated protein* », qui permettrait l’acétylation des histones au niveau du promoteur, aboutissant ainsi à l’activation de la transcription de ces gènes (cf. Fig. 1.20-A) (DeRan et al., 2008).

Par ailleurs, au sein de la séquence codante des gènes des cinq classes d’histones on retrouve également un élément très conservé, appelée CRAS « *Coding Region-*

Activating Sequence », impliqué dans l'activation de ces gènes. Cette séquence est composée de deux éléments de sept nucléotides, appelés α et ω , capables d'interagir avec les protéines nucléaires (respectivement les facteurs α et ω des histones) et d'augmenter l'efficacité de la transcription de ces gènes. L'une des composantes du facteur α des histones, jouant un rôle très important dans le processus d'activation de la transcription des histones, est le facteur YY1 « *Ying Yang-1* », présentant à son extrémité C-terminale un domaine d'interaction avec une molécule d'ADN (Eliassen et al., 1998). Enfin, des facteurs additionnels tels que HIRA, FLASH, BZAP45 sont également impliqués dans l'activation des gènes, mais les mécanismes exactes de leur implication demeurent encore inconnus (Marzluff et al., 2008)(Marzluff et al., 2002).

1.2.2.3 Maturation des ARN pré-messagers d'histones canoniques

Le produit de la transcription des gènes d'histones réplication-dépendants, présente, quant à lui, des caractéristiques originales et spécifiques aux histones, permettant ainsi le contrôle de l'expression de ces gènes au niveau de la maturation de leurs ARN prémessagers. En effet, tout comme leurs gènes, les ARN prémessagers des histones canoniques ne présentent pas d'intron, et ne sont maturés qu'à leurs extrémités 5' et 3'. La maturation de l'extrémité 5' s'effectue de façon conventionnelle, par l'ajout d'une coiffe méthylée en position 7 de la guanosine (*cf.* §1.1.1.1). En revanche, les ARN prémessagers des histones réplication-dépendants sont dépourvus de signaux de polyadénylation, la maturation de leur extrémité 3' s'effectue selon un processus non conventionnel, impliquant un ensemble de facteurs spécifiques à ce processus. Ce mécanisme de maturation consiste en une coupure endonucléolytique entre deux éléments en *cis* de ces ARN prémessagers. Le premier élément est une structure en tige boucle, très conservée et située 5nt en amont du site de coupure, également reconnue par une protéine appelée SLBP « *Stem-Loop Binding Protein* », tandis que le second est une séquence riche en purines située ~10nt en aval du site de coupure, appelée

HDE « *Histone Downstream Element* », qui s'apparie avec l'extrémité 5' de U7 snRNA « *small nuclear RNA* » (cf. Fig. 1.21-B) (Marzluff et al., 2008).

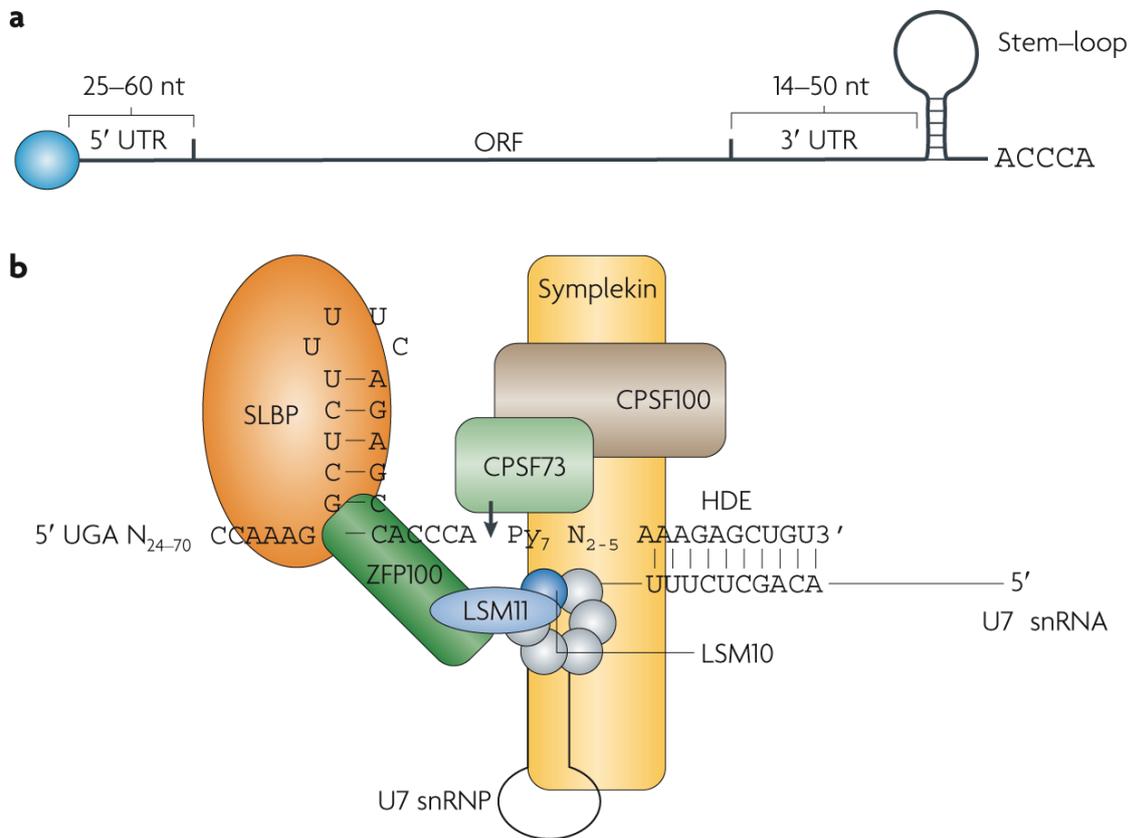


FIG. 1.21 – Structure et maturation des ARNm des histones canoniques.

(a) Représentation schématique de la structure des ARNm des histones, caractérisée par de courtes séquences non traduites 5'UTR et 3'UTR et une structure très conservée en tige boucle, reconnue par SLBP « *Stem Loop Binding Protein* » (b) Formation de l'extrémité 3' est la seule étape de maturation des ARN pré-messagers des histones canoniques, qui sont dépourvus des introns. Ce processus fait intervenir deux éléments en *cis* très conservés : une tige boucle reconnue par la protéine SLBP et une séquence HDE « *Histone Downstream élément* » qui s'apparie avec U7snRNA, faisant partie du complexe U7 snRNP « *U7 small nuclear ribonucleoprotein* », composé d'un anneau de 5 protéines Sm (cercles bleus) et deux protéines LSM11 et LSM 10 (ovales bleus). Une interaction entre SLBP et U7snRNP est assurée par une protéine de 100kDa (ZFP100, « *zinc finger protein 100kDa* »), permettant ainsi la stabilisation de la liaison entre U7snRNA et la séquence HDE. Au cours de la deuxième étape de maturation un complexe de clivage (composé de CPSF73 « *cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 73* », CPSF100, symplekin et peut être FIP1, aussi bien que d'autres protéines jusqu'à présents non déterminées) se fixe sur l'ARN pré-messager des histones canoniques et coupe l'ARN 5nt en aval de la structure en tige boucle (site de coupure est indiqué par une flèche) (Marzluff et al., 2008).

Bien que les processus de maturation des ARNm conventionnels et des histones canoniques soient différents, de nombreuses similitudes peuvent être observées. En effet, ces deux mécanismes partagent un certain nombre de facteurs, notamment l'endonucléase CPSF73, responsable du clivage des deux types d'ARN pré-messagers (ARN_{pré-m}), ainsi que la symplekin, la protéine d'échafaudage. De plus, il a également été montré que l'hélicase hPrp43 et le composant de U2snRNA (SF3b), impliqués habituellement dans l'épissage des ARN_{pré-m} conventionnels, participaient également à la maturation de l'extrémité 3' des ARN_{pré-m} des histones. En effet, ces deux protéines sont capables d'interagir avec un élément conservé de 22nt, comportant un motif de 7nt (C/GAAGAAG), localisé au sein de la séquence codante des ARNm des histones et de stimuler le clivage de ces messagers (Friend et al., 2007)(Marzluff, 2007). La particule U7 snRNP, quant à elle, est caractérisée par l'existence, dans le complexe des protéines Sm, des protéines Lsm10 et Lsm11 (Pillai et al., 2003). Ces dernières remplacent les protéines SmD1 et SmD2 trouvées dans le complexe des protéines Sm associés aux particules snRNPs impliqués dans l'épissage des pré-messagers nucléaires (Will and Lührmann, 2001). Des études récentes ont montré que les deux protéines Lsm10 et Lsm11 étaient nécessaires à la localisation de la particule U7snRNP près du site de la biosynthèse des ARNm d'histones et Lsm11 serait également impliqué dans la maturation de ces pré-messagers via une interaction avec un facteur jusqu'à présent non identifié (Godfrey et al., 2009). D'autres études ont montré que les protéines SmB, SmD3 et Lsm10 pourraient interagir, directement ou non, avec CPSF73 et influencer le site de clivage des ARN_{pré-m} des histones (Yang et al., 2009). Un autre paramètre capable d'influencer le site de clivage de ces molécules est l'ubiquitination de l'histone H2B (H2Bub1) en association avec CDK9, qui régule l'expression génétique par la phosphorylation du domaine carboxy-terminal de l'ARN polymérase II (Pirngruber et al., 2009)(Pirngruber and Johnsen, 2010).

Les ARNm des histones matures possèdent à leur extrémité 3' une structure en tige boucle suivie de 5nt (*cf. Fig. 1.21-A*). Des études structurales de cette tige boucle

montrent qu'au niveau du repliement en deux dimensions, six appariements de type Watson-Crick aboutissent à la formation d'une hélice, terminée par une boucle de quatre nucléotides riche en pyrimidines (*cf. Fig. 1.22-A*) (Williams and Marzluff, 1995). La conformation tridimensionnelle de cette structure en « *épingle à cheveux* » montre une hélice canonique de type A et l'empilement des bases de la boucle, à l'exception du résidu C qui reste parallèle à l'hélice et pointe vers la solution (*cf. Fig. 1.22-B*) (DeJong et al., 2002). Cette structure est reconnue de façon spécifique par la protéine SLBP « *stem-loop binding protein* » et joue un rôle crucial dans le métabolisme des ARNm des histones réplication-dépendants. Par exemple, elle participe au transport nucléo-cytoplasmique, mais également à la stabilité des ARNm matures codant pour les histones canoniques (*cf. Fig. 1.18*) (Sullivan et al., 2009)(Marzluff et al., 2008). Enfin, tout comme pour les histones, l'expression de cette protéine est régulée en fonction du cycle cellulaire et se limite à la phase S de celui-ci (*cf. Fig. 1.22-C*) (Marzluff et al., 2008).

1.2.2.4 Traduction des ARNm des histones réplication-dépendants

Bien que les ARNm des histones canoniques présentent à leur extrémité 5' une « *structure-coiffe* », l'absence de queue poly(A) à leur extrémité 3', a soulevé de nombreuses questions sur le mode d'initiation de leur traduction. Ainsi, il a été suggéré qu'à ce stade de l'expression génétique, les ARNm des histones réplication-dépendants subiraient également un contrôle par la machinerie traductionnelle.

Les premières études de la traduction des ARNm d'histones ont suggéré que la tige boucle à l'extrémité 3' pourrait participer dans l'initiation de leur traduction, en remplaçant fonctionnellement la queue poly(A). Ainsi, selon ce mécanisme, la protéine SLBP, fixée à la tige boucle en 3', pourrait interagir avec la sous-unité eIF4G du complexe de la coiffe (eIF4F), par l'intermédiaire d'une protéine récemment caractérisée. Il s'agit d'une protéine essentielle de 25,4kDa, appelée SLIP1 « *SLBP-*

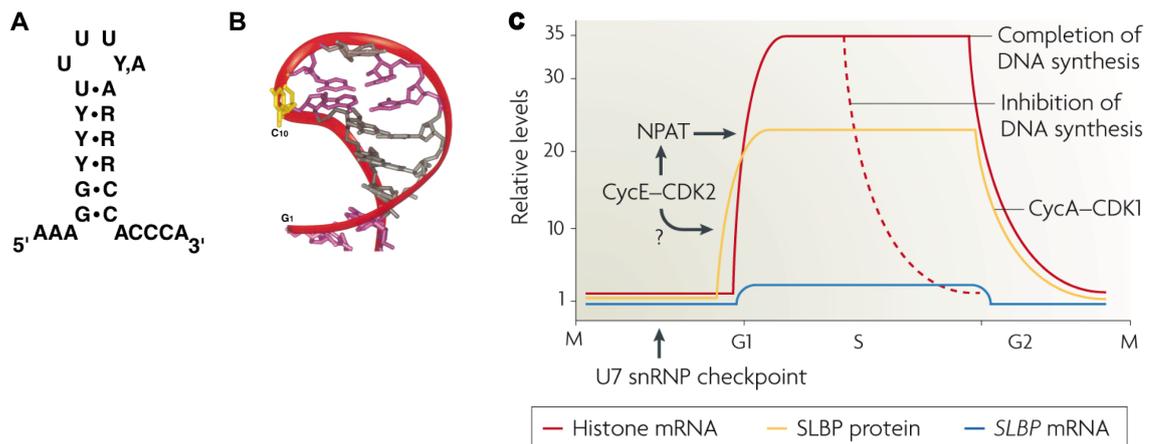


FIG. 1.22 – Régulation des ARNm des histones canoniques en fonction du cycle cellulaire

(A) Repliement 2D de la séquence minimal consensus de reconnaissance par la SLBP, formant une structure en tige boucle (Y= pyrimidine ; R=purine). (B) Structure tridimensionnelle de la structure tige boucle, obtenue par la résonance magnétique nucléaire (RMN) (DeJong et al., 2002). (c) Le taux d'expression des ARNm des histones canoniques (courbe en rouge), de la protéine SLBP (courbe jaune) et du messenger de SLBP (courbe bleue) est représenté en fonction des quatre phases du cycle cellulaire, montrant une corrélation entre l'expression des ARNm des histones et la protéine SLBP. Ainsi, au cours de la phase G1 seule une petite fraction des ARNm des histones et de SLBP peut être constatée. A l'entrée de la phase S, une accumulation massive des transcrits des histones est accompagnée d'une augmentation du taux d'expression de la protéine SLBP. A ce stade du cycle cellulaire, la transcription des ARNm des histones canonique est stimulée par le facteur NPAT, qui est à son tour activé par une cycline E (cycE)-CDK2 (cyclin-dependent kinase 2). A la fin de la synthèse de l'ADN génomique, le taux des messagers des histones est rapidement diminué en parallèle de celui de la protéine SLBP, contrôlé par la cycline A (CycA)-CDK (Marzluff et al., 2008).

interacting protein 1 », qui interagirait avec un motif conservé de 15aa de la protéine SLBP, de type DWX3VEE, et avec une partie amino-terminale du facteur eIF4G, plus particulièrement avec une région habituellement interagissant avec la protéine PABP « *poly(A) Binding Protein* » (Cakmakci et al., 2008). Cette interaction entre les deux extrémités de l'ARNm de l'histone H3, conduirait ainsi à la circularisation, également observée dans l'initiation classique de la traduction, et rendrait la traduction des histones très efficace (cf. Fig. 1.18) (Marzluff et al., 2008).

Toutefois, ce modèle de traduction a été remis en cause par Kozak, qui a remarqué une discordance entre différents résultats obtenus en faveur de l'hypothèse d'implication de la protéine SLBP. Premièrement, le taux de stimulation de la traduction

par la SLBP restait très variable, parfois même très faible, tout au long de certaines expériences, suggérant une non reproductibilité de ces expériences. Deuxièmement, certaines expériences ont été effectuées avec des composants hétérologues (par exemple, la protéine SLBP humaine a été testée dans des extraits de levures) sans même vérifier la compatibilité fonctionnelle entre ces espèces. Troisièmement, certaines expériences ont été réalisées sur les ARNm non coiffés, alors que les messagers des histones sont naturellement coiffés. Quatrièmement, certains effets de la protéine SLBP ne seraient pas correctement interprétés, et selon Kozak, certains effets, mentionnés comme étant la conséquence de la SLBP sur la traduction, pourraient tout simplement être dûs à la stabilisation du messager par cette protéine. Enfin, des résultats contradictoires entre deux études différentes ont également été mentionnés. Par exemple, certaines études ont affirmé l'inutilité de l'extrémité C-terminale de la SLBP, tandis que d'autres ont attesté du besoin de la protéine entière dans la traduction. Le même désaccord a été constaté pour la nécessité de la coiffe du messager dans l'action de la SLBP en traduction (Kozak, 2004).

Par ailleurs, l'ensemble de travaux, effectués pour soutenir l'hypothèse de l'implication de la protéine SLBP dans la traduction des ARNm des histones, ont été réalisés sur les gènes rapporteurs ne contenant que l'extrémité 3' non traduite des messagers d'histones, sans donc tenir compte d'une éventuelle participation d'éléments localisés à l'intérieur de la séquence codante. D'autant plus, que de nombreuses hypothèses ont suggéré que la forte conservation de la séquence codante des messagers d'histones pourrait résulter d'une pression de sélection sur sa structure secondaire, qui pourrait jouer un rôle important dans l'initiation de la traduction (Huynen et al., 1992). D'autres caractéristiques des éléments intrinsèques aux messagers des histones, comme la longueur de leur extrémité 5' non codante, n'ont pas non plus été prises en compte. En effet, la taille limitée de leur 5'UTR (9 à 60nt), semble *a priori* incompatible avec un mécanisme de balayage de cette région, habituellement effectué au moment de l'initiation classique de la traduction.

En conséquence de ces études controversées, nous nous sommes intéressés au mécanisme d'initiation de la traduction des ARNm d'histones.

1.3 Avant-propos de ma thèse

Les études menées dans notre laboratoire sur l'initiation de la traduction des messagers d'histones, ont d'abord été concentrées sur l'ARNm codant pour l'histone H4, dont les caractéristiques des éléments en *cis* sont les plus surprenantes. En effet, sa séquence codante est la plus conservée et son 5'UTR, qui ne comporte que 9nt, est le plus court parmi les ARNm d'histones, ce qui a posé la question de son mode de recrutement du ribosome. Ainsi, avant mon arrivée au laboratoire, plusieurs particularités d'une traduction atypique de cet ARNm avaient été mises en évidence. D'abord, il a été montré que l'ARNm de l'histone H4 était traduit *in vitro* avec une efficacité très supérieure à celle des ARNm classiques utilisés comme témoins (*f*Luc, GFP, CP de BMV). De plus, cette forte efficacité de traduction n'était que peu affectée par la délétions des régions non codantes. Il en a donc été déduit que, la séquence codante de cet ARN contenait toutes les informations nécessaires pour assurer cette traduction efficace. Par ailleurs, il a été constaté que l'ARNm d'H4 était considérablement moins efficacement traduit lorsque son codon initiateur était déplacé de sa position initiale, ce qui montre l'incapacité du ribosome à le retrouver par un mécanisme de « *scanning* » classique. Par conséquent, il a été proposé que le ribosome atteindrait le codon initiateur par le mécanisme de « *tethering* » décrit par Stephen A. Chappell, dans lequel le ribosome, attaché à un point de l'ARNm, placerait directement le Mét-ARNt^{Met} sur le codon AUG (Chappell et al., 2006). Le ribosome étant classiquement recruté sur l'ARNm par les facteurs de la coiffe, des expériences d'inhibition par ajout d'analogue de coiffe ont été menées. Celles-ci ont montré que la traduction de l'ARNm d'H4 était bien plus sensible à la présence de cet analogue que celle d'un messager classique. Ainsi, la traduction du messager d'H4 se fait de façon coiffe dépendante, avec toutefois une affinité plus faible, entre le facteur de la coiffe et la structure coiffe de cet ARNm, que celle observée pour un messager conventionnel. De plus, les expériences de gradient de sucrose et de « *toe-print* » du ribosome, effectuées

sur les ARNm d'H4 ayant une coiffe non fonctionnelle ou en présence d'analogue de la coiffe, ont montré que le ribosome était recruté par voie coiffe indépendante. La coiffe est donc importante à la traduction de l'ARNm d'H4, mais pas au recrutement du ribosome. Il a donc été proposé que le ribosome serait recruté par des éléments structuraux *in cis*, situés à l'intérieur de la séquence codante de ce messenger. Afin de mieux comprendre ce mécanisme, la structure secondaire de l'ARNm d'H4 a été déterminée par des expériences de sondage en solution. De nombreuses caractéristiques indiquant une initiation de la traduction atypique du messenger d'H4 ayant été révélées, il a été décidé d'approfondir l'étude de ce mécanisme. Dans ce projet, j'ai pris part aux études structurales menées sur le messenger d'H4.

L'initiation étant l'étape limitante du processus de traduction des ARN, il a été postulé que sa grande efficacité, dans le cas du messenger d'H4, permettrait la synthèse massive des histones durant la phase S du cycle cellulaire, ce qui a soulevé la question du mode de traduction des ARNm des autres histones d'octamère. En effet, les histones étant présents dans la cellule en quantité stœchiométrique, afin de permettre la formation des octamères et d'éviter leur toxicité, on peut se demander si leurs ARNm sont tous aussi bien traduits que celui d'H4. C'est l'une des questions à laquelle j'ai cherché à répondre au cours de ma thèse, à l'aide des gènes d'histones H2A, H2B et H3 que j'ai clonés et amplifiés. De plus, suivant les travaux qui avaient été menés sur la traduction du messenger d'H4, j'ai voulu connaître le rôle rempli par les éléments *in cis* des messagers de ces trois autres histones d'octamère. La traduction de l'ARNm codant pour l'histone H3 ayant révélé de nombreuses caractéristiques intéressantes, que je décrirai tout au long de mon manuscrit de thèse, j'ai décidé de l'étudier de façon plus approfondie. Pour cela, j'ai d'abord cherché à décrypter son mode de recrutement du ribosome et le rôle rempli par différents facteurs dans ce mécanisme. Par ailleurs, comme c'est la structure d'un ARN qui régit son comportement au sein de la cellule, j'ai entrepris de déterminer la structure secondaire du messenger d'H3. Enfin, j'ai intégré

CHAPITRE 1 : *Introduction générale*

l'ensemble des résultats que j'ai obtenus au cours de ma thèse dans un modèle de l'initiation de la traduction de cet ARNm.

Chapitre 2

Etude de l'initiation de la traduction de l'ARNm de l'histone H4

2.1 Introduction

Nos récentes observations ont révélé un élément structural en double tige boucle de consensus UX₂UX₂A au sein de la séquence codante du messager de l'histone H4, qui pourrait présenter une affinité pour le facteur eIF4E. En effet, cette structure présente une forte ressemblance avec l'élément 4E-SE « *eIF4E Sensitive Element* », qui est retrouvé chez certains ARNm classiques (par exemple la cycline D1 et Pim-1 ref) (Culjkovic et al., 2005)(Culjkovic et al., 2006) et qui participe au transport nucléocytoplasmique de ces ARNm en impliquant le facteur eIF4E (*cf. Fig. 2.1-A*). Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une interaction entre cet élément, que nous appellerons H4-12 4E-SE-like, et le facteur eIF4E pourrait avoir lieu au moment du démarrage de la synthèse de l'histone H4, expliquant ainsi le recrutement interne du ribosome sur son messager. Des études qui ont suivi au sein de notre laboratoire ont en effet confirmé l'affinité entre ce facteur et l'ARNm non coiffé d'H4. Toutefois, les expériences de délétions progressives de l'ARNm d'H4 ont révélé l'incapacité de l'élément H4-12 4E-

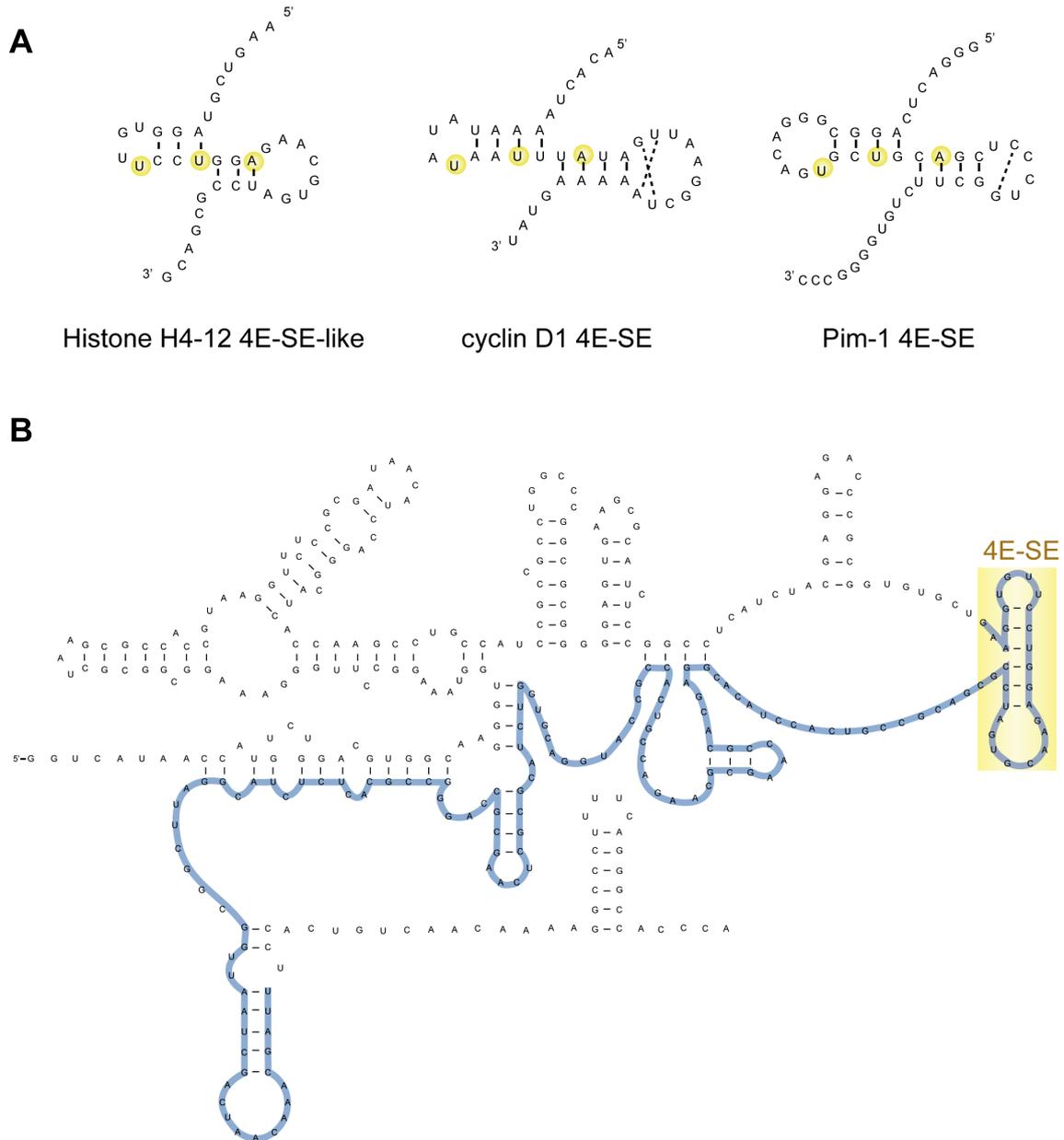


FIG. 2.1 – Représentation schématique de la structure secondaire de 4E-SE et de la séquence minimale de fixation de eIF4E

(A) Candidat potentiel de l'histone H4 à la fixation du facteur de la coiffe eIF4E (H4-12 4E-SE-like) et structure secondaire de 4E-SE des ARNm classique (cyclin D1 et Pim-1). Les nucléotides importants dans la séquence consensus UX_2UX_2A sont entourés d'un cercle jaune (Culjkovic et al., 2007). (B) Représentation de la séquence minimale (surlignée en bleue) sur le modèle de la structure secondaire de l'ARNm de l'histone H4, proposé par S. Jaeger (Jaeger, 2005). La région H4-12 4E-SE-like, constituée d'une structure en double tige boucle et comportant une séquence consensus UX_2UX_2A , est contenue dans le rectangle jaune.

SE-like à interagir, à lui seul, avec le facteur eIF4E et qu'une région supplémentaire, localisée en position 190 – 341 de l'ARNm d'H4 et appelée « *séquence minimale* », était nécessaire [résultats non publiés] (*cf. Fig. 2.1-B*).

Afin d'expliquer le mécanisme de la fixation du facteur eIF4E sur le messager d'H4, il était important d'affiner l'étude des interactions se produisant entre ces deux partenaires. Ma contribution personnelle à ce projet a donc consisté à détailler l'ensemble de ces interactions, ainsi qu'à étudier l'impact de la fixation de ce facteur sur la conformation globale de l'ARN.

Dans un second temps, bien que la coiffe ne soit pas nécessaire à la fixation de eIF4E sur le messager d'H4, son importance dans le démarrage de la synthèse de cette histone (Jaeger, 2005) m'a conduit à m'intéresser à son influence sur le repliement de cet ARNm.

2.2 Etudes du site de fixation du facteur eIF4E sur l'ARNm de l'histone H4

2.2.1 Présentation de la problématique

Afin d'analyser le plus précisément possible l'interaction se produisant entre eIF4E et le messager d'H4, mon objectif était de déterminer les nucléotides impliqués dans cette fixation. De plus, des études antérieures ayant suggéré une importance de la structure secondaire des ARNm d'histones au niveau de la régulation de l'initiation de leur traduction (Huynen et al., 1992), je me suis attachée à rechercher le contexte structural dans lequel se situent les résidus précédemment identifiés. Par ailleurs, l'une de nos hypothèses de travail étant que l'élément H4-12 4E-SE-like est un site privilégié dans la fixation du facteur eIF4E, j'ai étudié la localisation, par rapport à cet élément,

des nucléotides participant à cette fixation. Enfin, j'ai également analysé l'ensemble des modifications structurales subies par le messenger d'H4 lors de la fixation du facteur eIF4E, afin d'évaluer son impact sur la conformation globale de cet ARN.

2.2.2 Approche expérimentale utilisée

Afin d'étudier les interactions entre le messenger de l'histone H4 et le facteur eIF4E, j'ai utilisé la méthode d'empreinte de la protéine sur l'ARN. Son principe ressemble à la technique permettant de déterminer la structure secondaire, appelée sondage en solution de l'ARN, dont l'objectif est de mettre en évidence les résidus libres ou pris dans une structure secondaire. Dans cette expérience d'empreinte, les molécules d'ARN seules ou complexées à la protéine sont soumises à une hydrolyse enzymatique ou à des modifications chimiques spécifiques des nucléotides simples ou doubles brins de la chaîne d'ARN. La fixation de la protéine peut protéger certains nucléotides des coupures enzymatiques ou des modifications chimiques. Elle peut par ailleurs induire un changement de conformation dans la structure de l'ARN, protégeant ou exposant ainsi des résidus aux sondes utilisées. L'empreinte de la protéine peut ainsi être déduite en examinant les différences de coupures et de modifications des nucléotides entre l'ARN seul et complexé à la protéine (*cf. Fig. 2.2*) (Chevalier et al., 2009) (Ehresmann et al., 1987).

Dans le cadre d'une étude d'interaction entre l'ARNm d'H4 et la protéine eIF4E, j'ai choisi deux sondes enzymatiques spécifiques des régions doubles brins (RNase V1) et simples brins (RNase S1). Le choix de coupler ces deux nucléases s'est fondé sur la possibilité de distinguer simultanément les nucléotides simples et doubles brins protégés par la protéine eIF4E. De plus, ces RNases sont actives dans un milieu réactionnel très proche des conditions optimales de la fixation de la protéine, contrairement à certaines sondes chimiques qui peuvent nécessiter des conditions beaucoup plus extrêmes.

L'identification des nucléotides coupés par chaque RNase s'est effectuée à

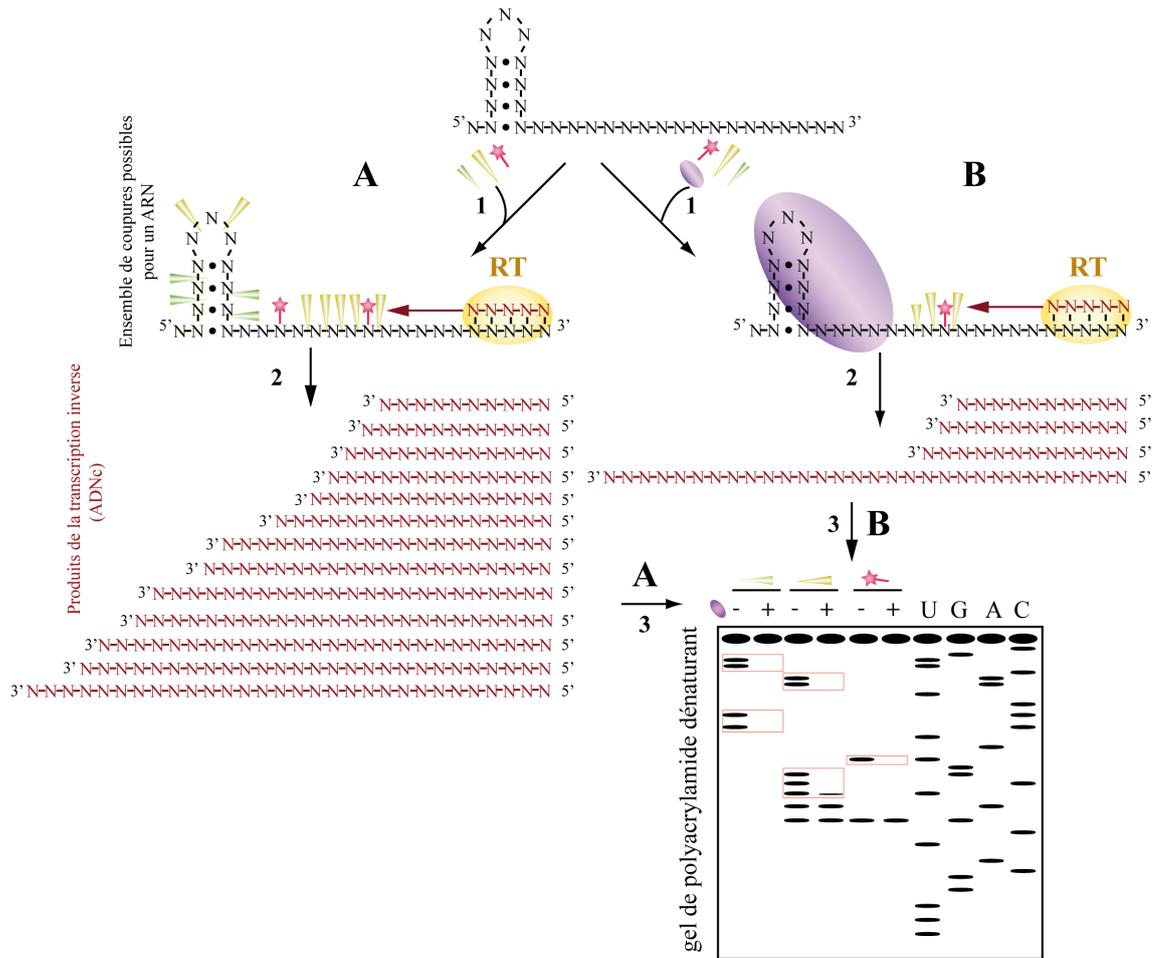


FIG. 2.2 – Principe de l'expérience d'empreinte de la protéine par voie indirecte

(1) Dans un premier temps, l'ARN est soumis à un traitement enzymatique ou à des modifications chimiques en absence (A) ou en présence (B) de la protéine. (2) Les coupures enzymatiques (cônes jaunes ou verts, respectivement spécifiques du simple ou double brin) ou des modifications chimiques (étoiles) obtenues de façon statistique, sont ensuite révélées par une extension d'amorce grâce à une rétro-transcriptase (RT). (3) Les produits de la transcription inverse (ADNc) sont ensuite identifiés sur un gel de polyacrylamide dénaturant parallèlement au séquençage de l'ARN (UGAC) obtenu avec la même amorce. La comparaison des différences d'intensité de bandes entre les pistes en présence (+) ou en absence (-) de la protéine (encadrés en orange) avec les pistes de séquençage indique les sites d'empreinte de la protéine sur l'ARN.

l'aide d'une rétro-transcriptase AMV (Avian Myeloblastosis Virus) et de sept amorces différentes, espacées d'une cinquantaine de nucléotides le long de la séquence d'ARN. Cette méthode de révélation, appelée indirecte, a été utilisée en raison de la grande taille (375nt) du messager d'H4. Le produit final de ces expériences a été résolu sur un gel de polyacrylamide dénaturant, en parallèle à des expériences de séquençage de cette même

molécule d'ARN permettant d'identifier les résidus. Par ailleurs, pour une meilleure résolution de ces gels, j'ai utilisé deux temps de migration. Une migration courte pour révéler les plus petits fragments, et une migration longue, après la sortie des fragments d'une vingtaine de nucléotides, permettant de mieux lire la séquence des fragments de plus grande taille. Enfin, les gels ont été fixés, séchés puis autoradiographiés.

2.2.3 Résultats et discussions

La réalisation des expériences d'empreinte de la protéine eIF4E sur l'ARNm de l'histone H4 nécessitait tout d'abord la définition des conditions optimales de la réaction. En effet, ces conditions dépendent du type d'ARN, de la quantité de sondes enzymatiques et de protéines utilisées, mais également du milieu réactionnel.

Dans un premier temps, j'ai établi les concentrations de nucléases nécessaires pour obtenir une hydrolyse statistique de l'ARNm d'H4. Celle-ci correspond à un rapport d'une coupure pour dix molécules d'ARN et est importante pour obtenir un clivage spécifique de la structure initiale de l'ARN. En effet, les premières coupures peuvent altérer la conformation de l'ARN de manière à ce que des remaniements structuraux apparaissent. Des coupures secondaires non spécifiques peuvent donc se manifester en présence d'une quantité trop importante de nucléase (Chevalier et al., 2009) (Ehresmann et al., 1987).

Les expériences de sondage en solution de l'ARNm d'H4, effectuées précédemment au sein de notre laboratoire, ont permis d'établir une concentration optimale en RNase V1 d'une valeur de 59×10^{-6} U (Jaeger, 2005). Cependant, les conditions du milieu réactionnel n'étant pas les mêmes que celles utilisées dans mon expérience d'empreinte, il était important de vérifier la concentration nécessaire de cette endoribonucléase. De plus, dans le cas de la RNase S1, aucune étude n'avait été menée sur l'ARNm d'H4. Ainsi, j'ai effectué cette recherche en utilisant une gamme de concentration croissante de RNases V1 et S1. Les coupures dues à l'hydrolyse

2.2 Etudes du site de fixation du facteur eIF4E sur l'ARNm de l'histone H4

de l'ARNm par chaque concentration de RNases ont ensuite été identifiées par une extension d'amorce n°260 (*cf. Fig. 2.3-A*). Cette amorce permet en effet de visualiser la zone centrale de l'ARN (des nucléotides 164 à 241) qui contient la séquence H4-12 4E-SE-like.

L'analyse des résultats obtenus a montré que des concentrations de RNase V1 à $1,1 \times 10^{-4}$ U, et de RNase S1 à $6,7 \times 10^{-2}$ U pour 0,8pmol d'ARN (*cf. Fig. 2.3-A*) ont permis d'obtenir des coupures sur approximativement 10% des molécules d'ARNm, laissant le reste intact. Ces concentrations en RNases sont donc optimales et dans le cas de la RNase V1 se révèle supérieure à celle précédemment établie dans le milieu de sondage. L'examen des sites de coupures par ces deux nucléases a montré que les nucléotides aux positions 197-202 ; 210-215 ; 217-218 ; 220-226 ; 231-235 et 237-238 sont impliqués dans une structure secondaire alors que ceux aux positions 163-166 et 203-205 ne sont pas appariés. Ces résultats sont validés par leur concordance, à la fois avec ceux obtenus lors de l'expérience de sondage en solution de cet ARN (Jaeger, 2005) et avec le modèle de structure secondaire proposé pour cette molécule (*cf. Fig. 2.1-B*).

Dans un deuxième temps, j'ai procédé à une estimation de la quantité de protéines nécessaire pour fixer l'ARNm d'H4 et permettant d'obtenir des empreintes spécifiques du facteur eIF4E. La recherche d'empreinte nécessite un excès en protéine par rapport à l'ARN. En général, les conditions optimales de réaction sont atteintes lorsqu'au moins 90% de l'ARN est complexé à la protéine. Les expériences de retard sur gel de l'ARNm d'H4 libre et complexé à la protéine eIF4E ont montré que 50000cpm d'ARN (estimés à ~ 2 pmol) ont été complexés à 100% en présence de 40pmol de protéine [résultats non publiés]. J'ai donc testé quatre concentrations différentes de protéine eIF4E en présence de $1,1 \times 10^{-4}$ U de RNase V1 (*cf. Fig. 2.3-B*). Dans cette gamme, la protéine eIF4E était en excès de 5, 25, 50 et 100 fois par rapport à l'ARNm de l'histone H4. Les produits de la réaction ont ensuite été rétrotranscrits en ADNc par l'AMV à partir de l'amorce n°260. Les résultats ont montré une protection correcte de quatre zones clivées par la

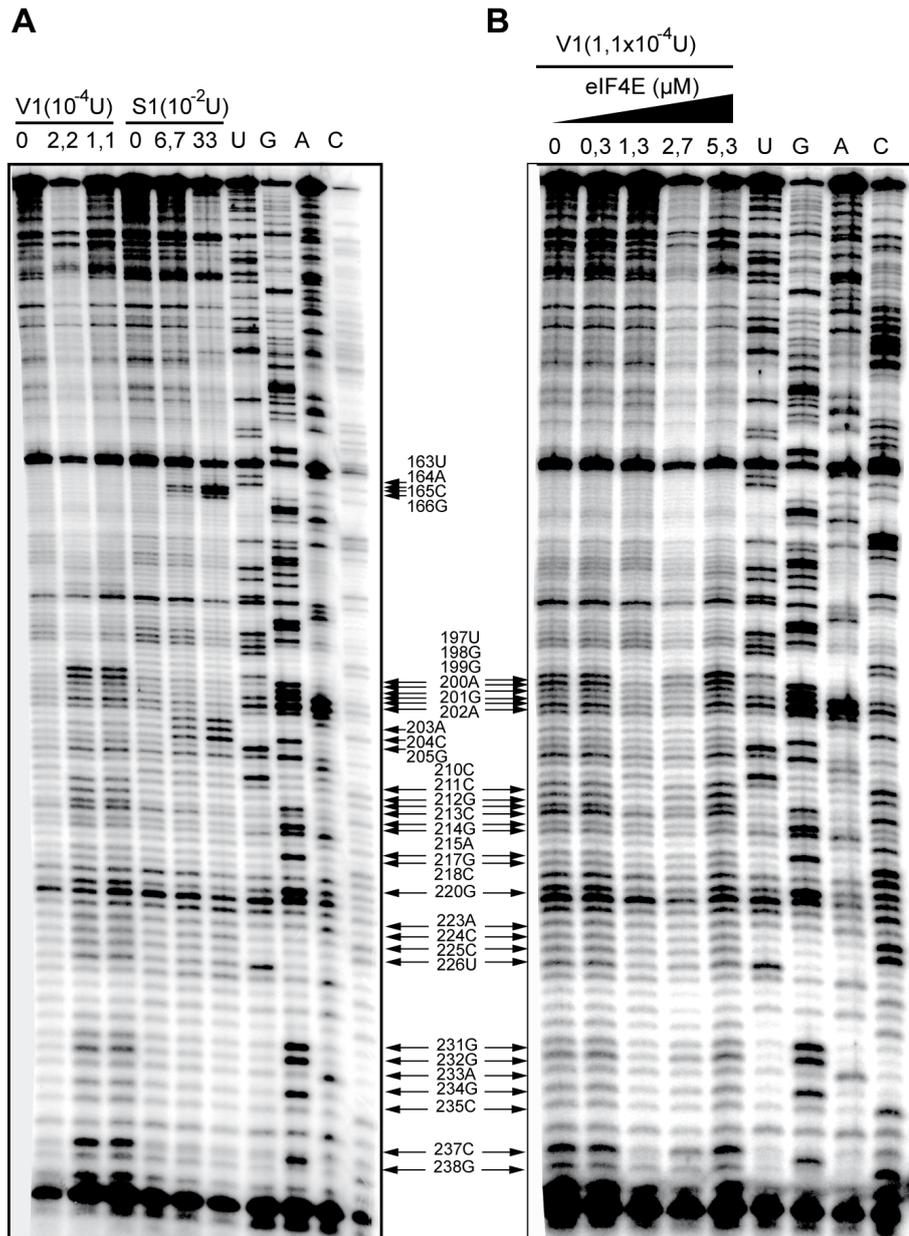


FIG. 2.3 – Identification des concentrations optimales pour l'expérience d'empreinte du facteur eIF4E

Identification des concentrations optimales en sondes enzymatiques (A) et en protéine eIF4E (B) pour l'expérience d'empreinte du facteur eIF4E sur l'ARNm de l'histone H4. (A) 0,8 pmol d'ARNm ont été hydrolysées par deux concentrations différentes de RNases V1 et S1. Les produits d'hydrolyse ont ensuite été rétro-transcrits par une extension d'amorce n°260, puis révélés sur gel de polyacrylamide dénaturant avec un temps court de migration et comparés au séquençage. (B) La même quantité d'ARNm a été hydrolysée par $1,1 \times 10^{-4}$ U de RNase V1 en présence de concentrations croissantes de protéine eIF4E. Les produits de la réaction ont ensuite été révélés de la même manière que pour (A). Les positions de coupure à l'une des deux RNases et d'empreinte de la protéine sont indiquées par des flèches

2.2 Etudes du site de fixation du facteur eIF4E sur l'ARNm de l'histone H4

RNase V1 en présence de 20pmol de protéine, correspondant à un excès de 25 fois par rapport à l'ARN. Ces résultats corroborent le rapport de 20 :1 établi lors des expériences de retard sur gel.

Une fois les conditions optimales de la réaction établies, j'ai réalisé l'expérience d'empreinte de la protéine eIF4E sur la totalité de l'ARNm de l'histone H4 non coiffé (*cf. Fig. 2.4*).

FIG. 2.4 – Résultats d'empreinte du facteur eIF4E sur l'ARNm d'H4

Quatre gels représentatifs de l'expérience d'empreinte du facteur eIF4E sur l'ARNm de l'histone H4, couvrant la quasi totalité de la séquence de l'ARN dans le sens de 3' vers 5'. 0,8pmol d'ARNm ont été hydrolysées par $1,1 \times 10^{-4}$ U de RNases V1 (A), (C) et (D) ou par $6,7 \times 10^{-2}$ U de RNases S1 (A-D), en absence ou en présence la protéine eIF4E. Les produits de réaction ont ensuite été révélés par une extension d'amorce n°+34, 260, 210 ou 110 suivie d'une migration avec un temps court ou long sur gel de polyacrylamide dénaturant et comparés au séquençage réalisé en parallèle. Les positions de coupures à l'une des deux RNases et d'empreinte de la protéine sont indiquées par des flèches.

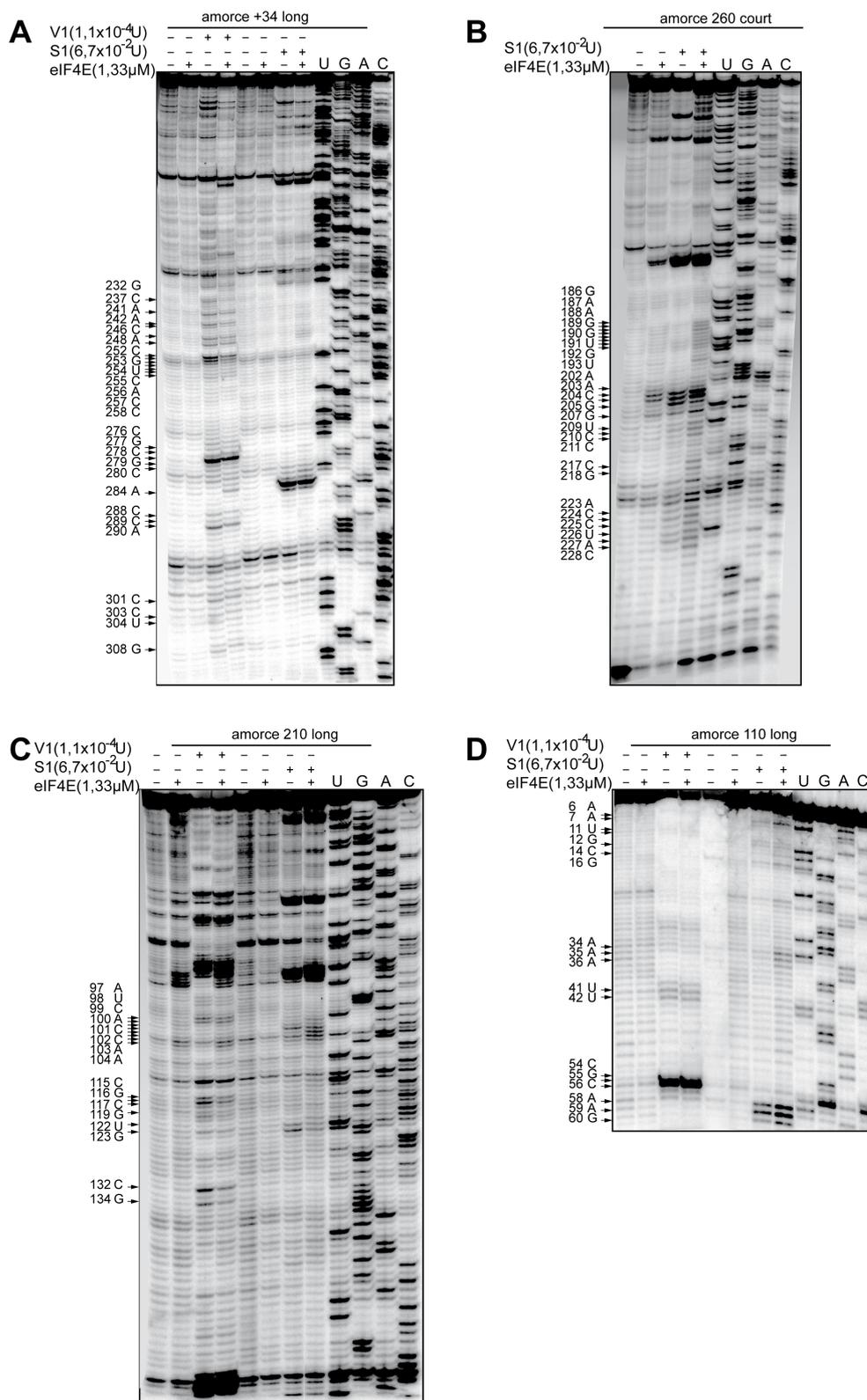


FIG. 2.4 – Résultats d'empreinte du facteur eIF4E sur l'ARNm d'H4

2.2 Etudes du site de fixation du facteur eIF4E sur l'ARNm de l'histone H4

L'empreinte d'eIF4E a été établie par la comparaison de l'ensemble des résultats entre les ARNm sondés en absence et en présence de la protéine. Le premier groupe, servant de témoin d'empreinte, m'a par ailleurs permis de vérifier la correspondance entre la structure secondaire de l'ARNm d'H4 et les coupures par les RNases. En effet, l'analyse des résultats obtenus, pour les ARNm sondés en absence de protéine, a montré que les sites coupés aux RNases V1 et S1 sont retrouvés respectivement dans les régions doubles et simples brins du modèle de la structure secondaire prédit pour l'ARNm d'H4. Ces expériences de sondage corroborent donc le modèle de structure secondaire précédemment établi (Jaeger, 2005) (*cf. Fig. 2.5*). En complément de ces résultats, j'ai retrouvé un certain nombre de coupures supplémentaires. En effet, les nucléotides C₂₅₂, G₂₅₃ et U₂₅₄ ont été clivés par l'enzyme spécifique des régions doubles brins (RNase V1) (*cf. Fig. 2.4-A*), suggérant que ces résidus pourraient être appariés au sein de la structure secondaire. J'ai donc proposé une tige boucle supplémentaire (P12A), constituée d'une hélice de quatre paires de bases et d'une boucle de sept nucléotides formant un pseudonœud par les interactions C₂₅₇-G₁₅₅ et C₂₅₈-G₁₅₄ (*cf. Fig. 2.5*).

L'analyse des réactions aux sondes testées, entre les ARNm en présence et en absence de la protéine, m'a permis d'observer six types de variations de coupures (*cf. Fig. 2.6*). Ainsi, en présence de la protéine, les nucléotides de l'ARNm d'H4 ont été soit protégés de l'hydrolyse par la RNase V1 ou S1 (*notés 1 & 2 respectivement*) soit des deux en même temps (*noté 3*); soit exposés à la RNase V1 ou S1 (*notés 4 & 5 respectivement*); ou enfin protégés de l'hydrolyse par la V1 et exposés à celle par la S1 (*noté 6*). Les deux premiers cas ont été majoritairement observés dans la séquence H4-12 4E-SE-like et à proximité de celle-ci. Des sites de protections ont également été observés à l'intérieur de la séquence minimale de fixation de eIF4E (hélices P8, P12 et P12A), mais également en dehors de celle-ci (hélice P6). Ces protections à l'hydrolyse enzymatique suggèrent que ces nucléotides peuvent interagir avec des résidus de la protéine ou bien que la fixation de la protéine induit des remaniements structuraux qui dissimulent ces nucléotides. En effet, dans les deux cas, les nucléotides n'étant plus

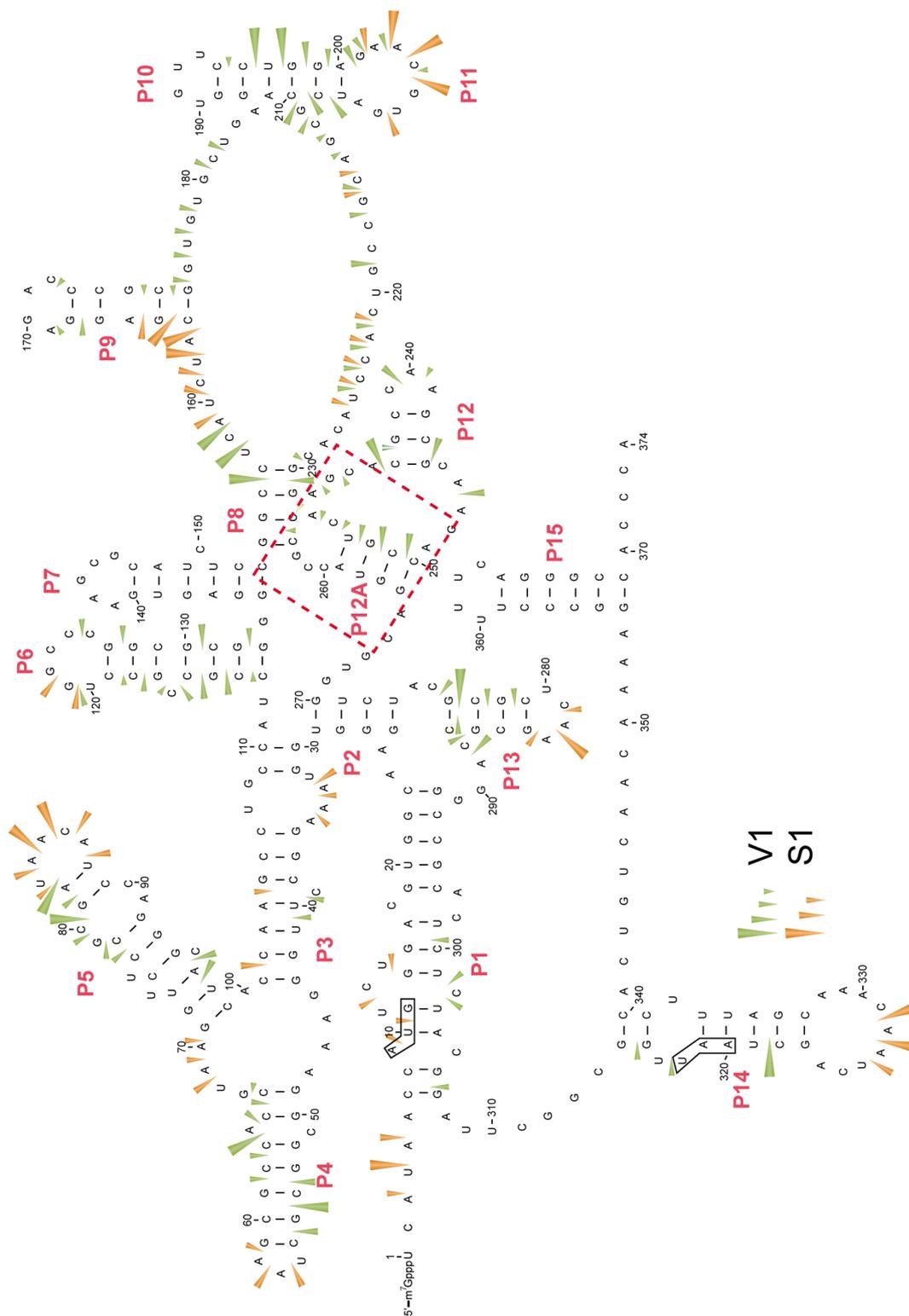


FIG. 2.5 – Coupures par les RNases V1 et S1 sur le modèle de la structure secondaire de l'ARNm d'H4

FIG. 2.5 – Coupures par les RNases V1 et S1 sur le modèle de la structure secondaire de l'ARNm d'H4

Représentation de coupures des RNases V1 (spécifique du double brin) et S1 (spécifique du simple brin) sur le modèle de la structure secondaire de l'ARNm de l'histone H4. Les produits de l'hydrolyse enzymatique représentés ont été obtenus lors des expériences d'empreinte en absence de la protéine, et révélés par la méthode indirecte à l'aide de sept amorces différentes, suivie d'une migration avec un temps court et long sur gel de polyacrylamide dénaturant. L'intensité des coupures enzymatiques est représentée par la taille du cône (de gauche à droite, réactivité décroissante de RNases). La structure en tige boucle nouvellement identifiée (hélice P12A) est encadrée en pointillés rouges. Le codon initiateur AUG et le codon de terminaison UAA sont entourés.

accessibles aux RNases V1 et S1, une diminution de la réactivité de ces régions est observée. Dans les cas d'augmentation d'intensité de coupure aux RNases en présence de la protéine, les remaniements structuraux peuvent également être une explication. Ces observations ont été principalement faites pour les nucléotides coupés à la RNase S1, aux alentours de la séquence consensus de la région H4-12 4E-SE-like et dans la jonction à trois hélices. Ces résultats suggèrent que la fixation du facteur eIF4E pourrait affaiblir ces structures en les exposant davantage à l'hydrolyse par une sonde enzymatique spécifique du simple brin. De plus, certains nucléotides aux positions 210-211 ; 217-218 et 223-226, en plus d'être exposés aux coupures à la RNase S1, ont également été protégés des coupures à la RNase V1. Étant donné que la nucléase V1 est spécifique des nucléotides appariés et la S1 des nucléotides non appariés, ces résultats suggèrent que ces nucléotides se sont libérés suite à la fixation de la protéine.

L'examen de l'ensemble des résultats obtenus montre que les nucléotides de la séquence consensus UX₂UX₂A (aux positions 197-202) ont été protégés des coupures enzymatiques et que les régions avoisinantes (aux positions 186-193 et 206-211), localisées dans la structure en double tige boucle H4-12 4E-SE-like ont été plus exposées aux hydrolyses enzymatiques par la RNase S1, spécifique du simple brin (*cf. Fig. 2.7-A*).

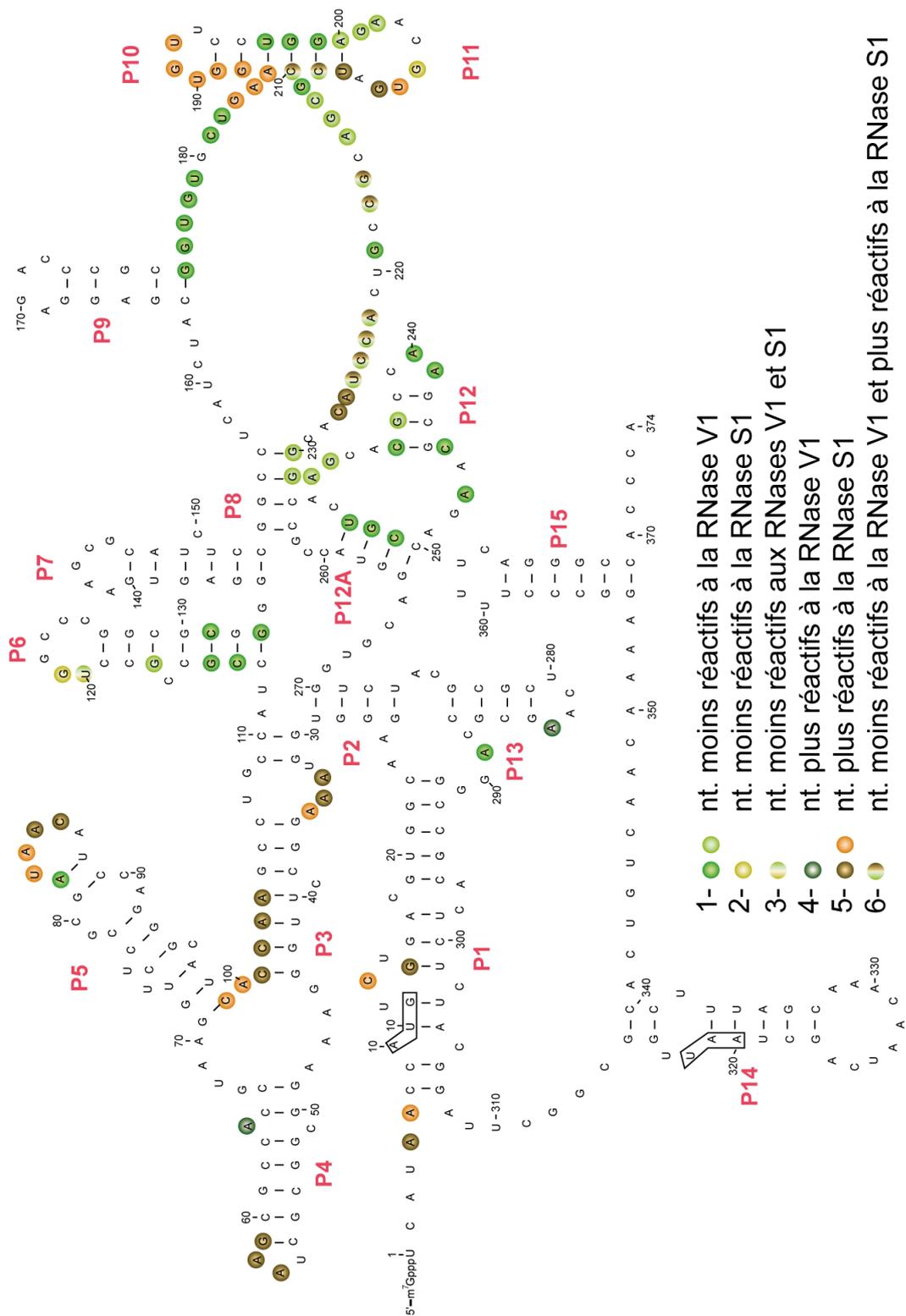


FIG. 2.6 – Empreintes du facteur eIF4E sur le modèle de la structure secondaire de l'ARNm d'H4

FIG. 2.6 – Empreintes du facteur eIF4E sur le modèle de la structure secondaire de l'ARNm d'H4

Représentation de six types d'empreintes du facteur eIF4E sur le modèle de la structure secondaire de l'ARNm de l'histone H4 (1-6). Les nucléotides protégés aux coupures enzymatiques par la présence d'eIF4E ont été répertoriés après une analyse de gels obtenus en temps court et long de migration et révélés à l'aide de sept amorces différentes. Les empreintes sont symbolisées par des disques dont l'intensité de protection est représentée de façon décroissante de gauche à droite. Le codon initiateur AUG et le codon de terminaison UAA sont entourés.

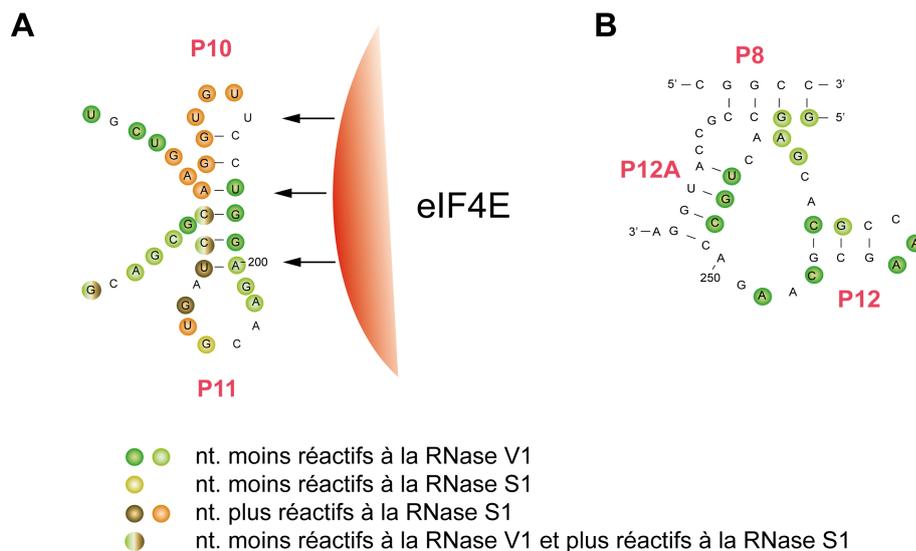


FIG. 2.7 – Représentation schématique des éléments structuraux pouvant participer à la fixation du facteur eIF4E

(A) Interaction possible entre la région H4-12 4E-SE-like et le facteur eIF4E, protégeant le côté contenant le consensus UX_2UX_2A et exposant davantage les régions qui l'entourent. (B) Element structural composé de trois hélices (P8, P12 et P12A) formant un pseudonœud.

En accord avec ces résultats, j'ai émis l'hypothèse selon laquelle la protéine reconnaîtrait l'élément H4-12 4E-SE-like et interagirait avec la séquence consensus. Les liaisons hydrogènes établies entre les nucléotides de la séquence consensus et leurs partenaires au sein des hélices P10 et P11 s'en trouveraient ainsi affaiblies, ce qui les exposerait davantage à l'hydrolyse par la RNase S1. Cette hypothèse concorde donc avec les résultats des expériences de délétions progressives effectuées précédemment qui ont montré que seuls les fragments contenant cet élément sont capables de fixer ce facteur [résultats non publiés].

Bien que des études récentes, effectuées au sein de notre laboratoire, aient montré que l'élément H4-12 4E-SE-like nécessitait une région supplémentaire aux positions 190-341 pour fixer eIF4E [résultats non publiés], les variations de la réactivité aux RNases dans cette région en présence de la protéine sont principalement localisées à son extrémité 5' (*cf. Fig. 2.6*). Dans la région 231-254, on observe une protection à la RNase V1 suggérant qu'elle pourrait participer à la fixation de la protéine. Il est intéressant de noter que les nucléotides concernés pourraient adopter une conformation particulière, constituée par les hélices P8, P12 et P12A, et comprenant un pseudonœud (*cf. Fig. 2.7-B*). L'hypothèse qui s'ensuit est que cet élément structural pourrait collaborer avec H4-12 4E-SE-like dans la fixation du facteur eIF4E. Dans la région 212-231, les nucléotides pour lesquels on observe une empreinte sont soit protégés de la RNase V1, soit exposés à la RNase S1 soit les deux simultanément. Ces résultats suggèrent que la conformation de cette région est modifiée suite à la fixation du facteur eIF4E sur l'ARNm. Notons que, lors de l'établissement de la structure secondaire par sondage en solution, les positions 221-231 ont été identifiées à la fois comme simples et doubles brins et il en a été déduit qu'elles se situeraient au cœur d'une région en équilibre entre deux conformations (Jaeger, 2005). Les résultats des expériences d'empreinte suggèrent donc que la fixation du facteur eIF4E favoriserait la conformation de l'ARNm dans laquelle cette région serait simple brin. Enfin, le restant de la région minimale, ne présentant pas d'empreinte, pourrait jouer un rôle dans la stabilisation des éléments structuraux importants à la fixation du facteur.

L'étude des empreintes de la protéine retrouvées en dehors de la « *séquence minimale* » a principalement mis en évidence des expositions aux RNases dans la région de la jonction à trois hélices (hélices P3, P4 et P5), ainsi que dans l'hélice P1 (*cf. Fig. 2.8*). Ces expositions reflètent vraisemblablement des remaniements structuraux subis par l'ARNm d'H4 lors de la fixation du facteur eIF4E. Les expériences de pontage aux UV à 312nm utilisant des ARN portant une coiffe m⁷s⁶GpppG, réalisées au sein de notre laboratoire, ont mis en évidence l'interaction entre la coiffe et le domaine replié

2.2 Etudes du site de fixation du facteur eIF4E sur l'ARNm de l'histone H4

en jonction à trois hélices [résultats non publiés]. Ainsi, les résultats que j'ai obtenus au cours des expériences d'empreinte suggèrent que ces modifications structurales pourraient libérer la coiffe qui est nécessaire lors de l'étape suivante du mécanisme de l'initiation de la traduction. L'hélice P1 quant à elle, contient le codon initiateur, qui suite à ces remaniements deviendrait plus accessible à Mét-ARNt^{Met}, ce qui faciliterait le démarrage de la traduction. Enfin, ces changements de conformation pourraient également être une explication aux protections aux RNases observées au sein de l'hélice P6 (cf. Fig. 2.6).

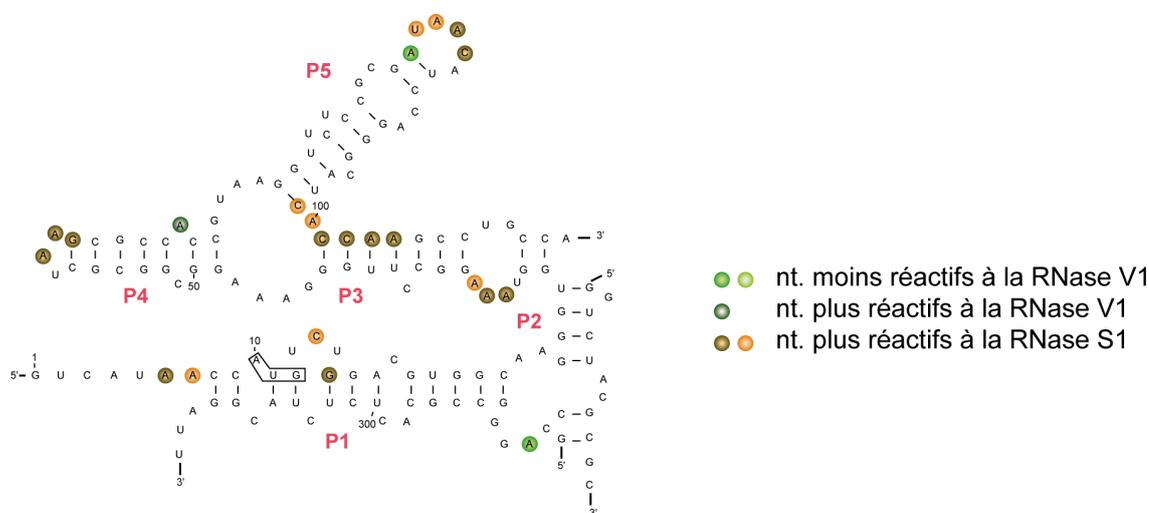


FIG. 2.8 – Remaniements structuraux de la jonction à trois hélices par le facteur eIF4E. Représentation d'une fragilisation de la structure de « jonction à trois hélices » et l'hélice P1 contenant le codon initiateur AUG, en présence du facteur eIF4E.

Pour conclure, les expériences d'empreinte m'ont permis de confirmer que l'ARNm d'H4 non coiffé était capable de recruter le facteur eIF4E de façon interne. Plusieurs éléments structuraux importants participant à ce recrutement ont pu être mis en valeur, dont notamment la structure H4-12 4E-SE-like. Par ailleurs, ces résultats ont également permis de voir l'influence qu'avait la fixation du facteur sur le repliement de différentes régions de l'ARNm.

2.3 Étude de l'influence de la coiffe sur la structure secondaire de l'ARNm de l'histone H4

2.3.1 Présentation de la problématique

La coiffe m⁷G(5')ppp(5')N située à l'extrémité 5' des ARNm conventionnels joue un rôle très important dans le recrutement du ribosome. Elle est reconnue de façon spécifique par le facteur de la coiffe eIF4E, permettant indirectement le recrutement de la petite sous-unité ribosomique à l'extrémité 5' des ARNm conventionnels (Kozak, 1991c, Cowling, 2009). Comme nous l'avons vu dans la section précédente, dans le cas de l'ARNm d'H4, le facteur eIF4E peut être recruté, indépendamment de la coiffe, sur certains éléments structuraux internes. Toutefois, les expériences réalisées au laboratoire ont montré que la traduction de l'ARNm d'H4 était inhibée en présence d'un analogue de la coiffe (Jaeger, 2005). De ce fait, bien que ne participant pas au recrutement du ribosome, la coiffe est nécessaire pour l'initiation de la traduction et nous avons donc cherché à établir sa fonction. Ma part de travail dans ce projet consistait à étudier l'influence de la coiffe sur la structure secondaire globale de cet ARN. En effet, la coiffe pourrait interagir avec certains éléments en *cis* et induire un repliement spécifique de l'ARN qui jouerait un rôle important dans le mécanisme d'initiation de la traduction.

2.3.2 Approche expérimentale utilisée

L'une des façons de mesurer l'influence de la coiffe sur le repliement de l'ARNm est d'observer la différence de réactivité au sondage en solution entre les ARNm coiffés et non coiffés. Pour obtenir des coupures spécifiques à chaque type d'ARN, il était important de sonder des ARNm homogènes, composés à plus de 90% d'ARNm

2.3 Étude de l'influence de la coiffe sur la structure secondaire de l'ARNm de l'histone H4

soient coiffés soient non coiffés. Les ARNm non coiffés ont été synthétisés *in vitro*, à l'aide de quatre types de ribonucléotides et de la T7 ARN polymérase, selon le protocole décrit dans la partie (*cf.* §A.3.4). En revanche, la synthèse d'une coiffe à l'extrémité 5' des ARN était plus délicate. En effet, la méthode habituellement utilisée dans notre laboratoire, qui consiste à l'incorporation d'une coiffe analogue à l'extrémité 5' de l'ARN lors de la réaction de transcription, n'était efficace qu'à ~65% (Dasso and Jackson, 1989). Afin d'assurer la synthèse d'une coiffe pour plus de 90% des ARN, ceux-ci ont été coiffés à l'aide du « *ScriptCapTMm⁷G Capping System* », dont l'efficacité approche les 100% (Epicentre Biotechnologies). Ce système fournit trois enzymes, provenant de « *Vaccinia Virus Capping Enzyme* » (VCE), nécessaires pour assurer cette réaction. Ainsi, une succession de trois réactions enzymatiques, impliquant une ARN-triphosphatase (RTase), une ARN-guanylyltransférase (GTase) et une ARN-(guanine-7-)-méthyltransférase (MTase), a conduit à l'addition d'un résidu guanosine méthylé en position N7 et relié au premier nucléotide en 5' de l'ARNm par une liaison 5'-5' triphosphate.

Comme dans l'expérience d'empreinte de la protéine, j'ai réalisé le sondage en solution des molécules d'ARNm de l'histone H4 à l'aide de deux sondes enzymatiques, la RNase V1 (spécifiques des résidus appariés) et la nucléase S1 (spécifiques des résidus non appariés). Les concentrations en RNases utilisées sont celles que j'ai déterminées et décrites en §2.2.3. Les ARN utilisés dans cette expérience ont été purifiés sur gel de polyacrylamide dénaturant et élués par une technique d'électroélution, prévenant ainsi toute contamination (*cf.* §A.3.5). Les coupures spécifiques aux RNases V1 et S1 ont ensuite été révélées pour la séquence entière de cet ARN par la méthode indirecte utilisant la rétro-transcriptase AMV.

2.3.3 Résultats et Discussions

L'analyse des résultats des expériences de sondage sur les ARNm coiffés et non coiffés n'a pas révélé de différences significatives de coupures entre ces deux types de molécules. La seule distinction pour ces ARN était la variation d'intensité de coupures aux RNases V1 et S1 (*cf. Fig. 2.9*). Au regard de ces faibles différences, il semble que la présence de la coiffe, à l'extrémité 5' de l'ARNm de l'histone H4, n'induit pas d'importants remaniements structuraux. Le modèle de structure secondaire proposé par Sophie Jaeger pour l'ARNm non coiffé reste donc valide pour l'ARNm coiffé.

Bien que la coiffe ne semble pas jouer un rôle crucial dans le repliement de l'ARNm d'H4, l'étude plus détaillée des variations d'intensité de coupures entre les deux types d'ARNm pourrait tout de même révéler une influence locale de la coiffe sur certaines régions. Tout d'abord, l'examen de l'ensemble de ces variations a permis de déceler que, dans la majorité des cas, la réactivité aux RNases S1 et V1 diminue lorsque l'ARNm est coiffé. Ce constat pourrait suggérer que la présence de la coiffe rendrait la structure de l'ARN plus stable et/ou plus compacte et permettrait ainsi sa protection aux hydrolyses enzymatiques.

Les résultats de ces expériences ont montré que les différences de réactivité enzymatique ont été plus marquées dans le cas de hydrolyses de l'ARNm par la RNase S1 que celle par la V1. Ainsi, la réactivité de la nucléase S1 diminue dans les régions suivantes de l'ARNm coiffé : dans la séquence simple brin entre les hélices P8 et P9 et dans les boucles terminales des hélices P11, P13 et P14 (*cf. Fig. 2.9*). Il est

FIG. 2.9 – Variations d'intensité dans la réactivité aux RNases V1 et S1 entre les ARNm coiffés et non coiffés de l'histone H4

(A), (B) et (C) Sélection de gels représentatifs de l'expérience de sondage en solution, montrant les différences clés dans la réactivité des deux types d'ARN, dans le sens du 5' vers le 3'. (D) Résumé de toutes les différences répertoriées après une analyse de gels obtenus en temps court et long de migration et révélés à l'aide de sept amorces différentes, sur le modèle de la structure secondaire de l'ARNm de l'histone H4. Les positions de variation d'intensité de coupure enzymatique sont indiquées par des flèches.

2.3 Étude de l'influence de la coiffe sur la structure secondaire de l'ARNm de l'histone H4

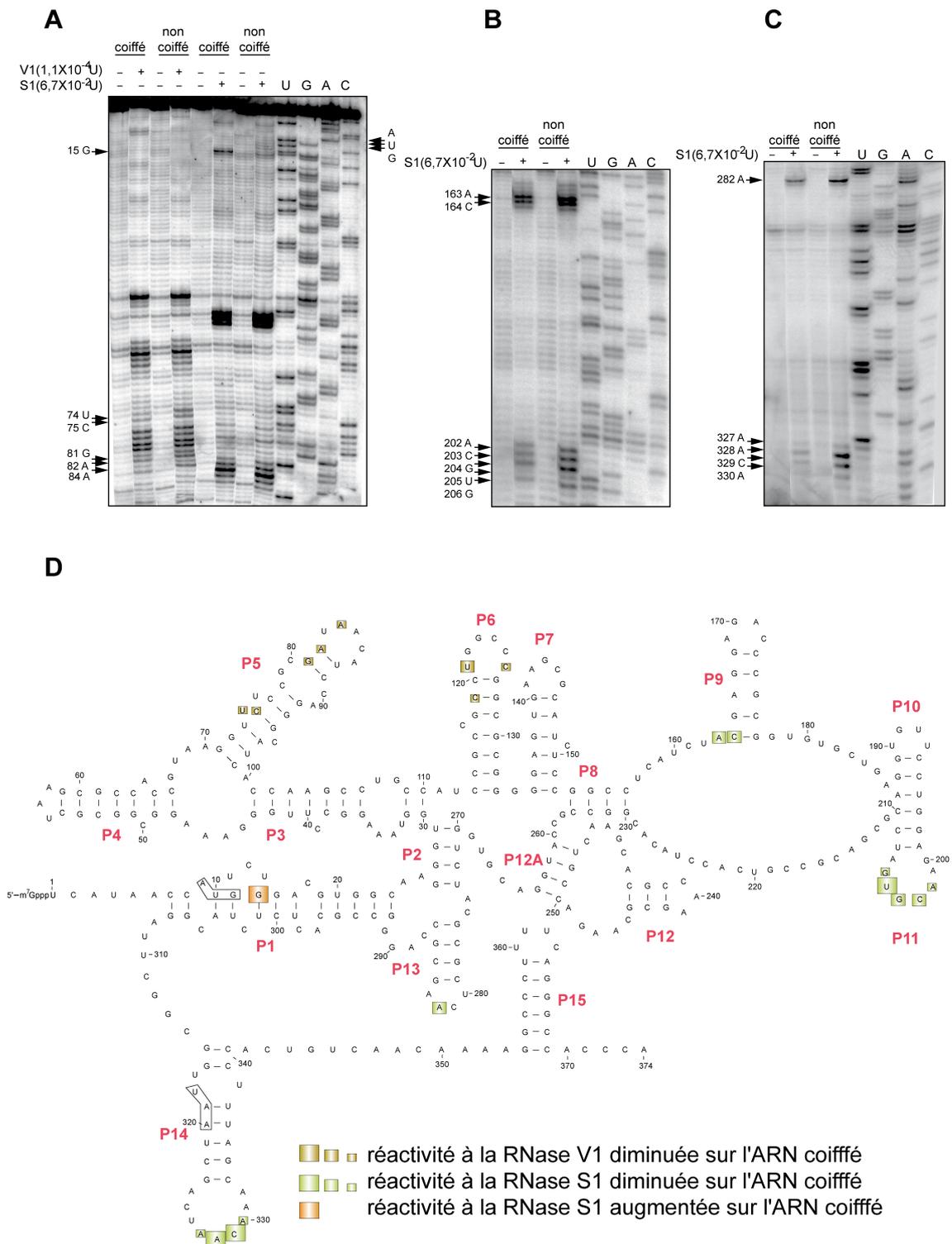


FIG. 2.9 – Variations d'intensité dans la réactivité aux RNases V1 et S1 entre les ARNm coiffés et non coiffés de l'histone H4

intéressant de noter que des caractéristiques particulières ont précédemment été relevées pour certaines de ces régions. En effet, lors de l'établissement de la structure secondaire

du messager d'H4, les nucléotides entre les hélices P8 et P9 présentaient un caractère à la fois simple et double brin, et comme pour la région 221-231, il en a été déduit que cette région prendrait part à un équilibre dynamique entre différentes conformations de l'ARN (Jaeger, 2005). La différence d'intensité mesurée dans cette région suggère que la présence de la coiffe pourrait favoriser la conformation double brin de ces résidus. Comme nous l'avons vu dans la section 2.2.3, la boucle terminale de l'hélice P11, correspondant à la séquence H4-12 4E-SE-like, est impliquée dans l'interaction avec le facteur eIF4E. La diminution de la réactivité à la RNase S1 en présence de la coiffe, suggère que cette dernière pourrait stabiliser la structure en double tige boucle, qui est un élément de reconnaissance important pour le facteur eIF4E. Ainsi, ce constat suggère que la coiffe pourrait participer indirectement au recrutement du facteur eIF4E sur son site interne en stabilisant la région H4-12 4E-SE-like. Cette hypothèse est étayée par l'observation d'une diminution de la réactivité à la RNase S1 au sein de la boucle apicale de l'hélice P13, en présence de la coiffe, associée à la protection à la RNase V1 relevée dans cette même boucle lors dans l'expérience d'empreinte de la protéine eIF4E (*cf. Fig. 2.6*). Enfin, au regard de la diminution de réactivité à la RNase S1 observée dans la boucle terminale de l'hélice P14, la coiffe pourrait également jouer un rôle dans la stabilisation de cette structure qui contient le codon de terminaison UAA.

Dans le cas d'hydrolyse par la RNase V1, une légère diminution de la réactivité est observée au sein de la structure en épingle à cheveux P5 des ARNm coiffés. Celle-ci pourrait être expliquée par la dissimulation de la coiffe dans la jonction à trois hélices [résultats non publiés], dont fait partie P5. Cette diminution de réactivité a également été observée au sein de la tige boucle P6. Celle-ci, n'étant pas associée à une augmentation de coupure par la RNase S1, fait penser à une dissimulation de cette hélice en présence de la coiffe, la rendant ainsi moins accessible aux sondes enzymatiques. Notons qu'une déduction similaire a été évoquée pour cette structure lors des expériences d'empreinte (*cf. §2.2.3*), suggérant que cette structure pourrait se situer au cœur d'une région rendue facilement inaccessible lors de changement de conformation subis par l'ARN.

La seule augmentation de réactivité observée en présence de la coiffe concerne la coupure à la RNase S1 dans la région du codon initiateur (*cf. Fig. 2.9*). Il s'agit d'une coupure entre les nucléotides U₊₁₄ et G₊₁₅, dont l'intensité s'est révélée 1,8 fois plus importante pour les messagers coiffés. Les interactions composant l'hélice P1, qui contient ces nucléotides, pourraient ainsi être affaiblies en présence de la coiffe. Ce résultat suggère que la coiffe pourrait rendre le codon initiateur, également contenu dans cette hélice, plus libre et donc plus accessible pour interagir avec l'anticodon du Mét-ARNt^{Met}₁, lors du mécanisme de « *tethering* » (*cf. §1.3*).

Pour conclure, ces résultats m'ont permis d'établir que la coiffe de l'ARNm d'H4 ne jouerait pas un rôle important dans le repliement global de ce messager. Toutefois, une certaine stabilisation de sa structure a été constatée en présence de la coiffe. Cette stabilisation a été observée localement dans des régions participant au recrutement interne du ribosome, suggérant qu'elle pourrait favoriser ce mécanisme. Enfin, mes résultats ont également montré que la coiffe permettrait de rendre le codon AUG plus accessible à l'ARNt initiateur, ce qui faciliterait le démarrage de la traduction.

2.4 Conclusions

Les études antérieures portant sur l'initiation de la traduction de l'ARNm d'H4 ont mis en évidence un recrutement atypique de la machinerie traductionnelle. Ainsi, certains éléments structuraux seraient importants à la fixation interne du facteur eIF4E, par l'intermédiaire duquel le reste de l'appareil traductionnel sera recruté. Au cours de ma thèse, j'ai étudié par des expériences d'empreinte de la protéine, le contexte structural dans lequel se produisent les interactions entre ce facteur et le messager d'H4. Par ailleurs, la coiffe n'étant pas importante à cette fixation interne, mais toutefois nécessaire au démarrage de la traduction, je me suis intéressée à son influence sur la structure du messager. Les résultats que j'ai obtenus pour ces expériences peuvent être

CHAPITRE 2 : Etude de l'initiation de la traduction de l'ARNm de l'histone H4

confrontés à un modèle établi pour le mécanisme d'initiation de la traduction d'H4 [résultats non publiés].

Le modèle actuel de l'initiation de la traduction de l'histone H4 (*cf. Fig. 2.10*) postule que la dissimulation de la coiffe dans la structure en jonction à trois hélices empêcherait sa reconnaissance par le facteur eIF4E. Ainsi au lieu de se fixer sur la coiffe en 5' de l'ARNm, le facteur eIF4E va interagir avec son site interne localisé dans la séquence codante de l'ARNm d'H4. Ce site serait constitué par des séquences et leurs repliements spécifiques qui sont localisés dans certaines régions internes de ce messenger. La plus importante de ces régions serait la structure en double tige boucle et la séquence consensus de la région H4-12 4E-SE-like. Mes résultats d'empreinte de la protéine ont effectivement confirmé la participation de cet élément ainsi que d'autres structures, dont les hélices P8, P12 et P12A qui forment une configuration particulière comprenant un pseudonœud. Par ailleurs, bien que la coiffe ne recrute pas directement le facteur, mes résultats ont montré qu'elle stabilise la structure du messenger, ce qui laisse penser que les ARNm naturellement coiffés serait plus aptes à recruter la machinerie traductionnelle.

FIG. 2.10 – Représentation simplifiée du modèle d'initiation de la traduction de l'ARNm d'H4

(A) Fixation interne du facteur eIF4E par l'interaction (doubles pointillés marons) avec les éléments structuraux localisés au sein de la séquence codante de l'ARNm d'H4 (représentés en vert). La coiffe, représentée par un cercle rouge en 5' de l'ARN, est montrée près de son site d'interaction avec la jonction à trois hélices. Les éléments structuraux sont annotés de P1 à P15 dans le sens 5'-3'. (B) Riboswitch de la coiffe de l'ARNm d'H4 vers le site spécifique du facteur eIF4E, rapprochant ainsi d'eIF4A les séquences très structurées en 5' de l'ARN. L'action d'hélicase d'eIF4A est représentée par des flèches en pointillés violets. L'interaction entre le facteur eIF4G, faisant parti du complexe de la coiffe eIF4F, et eIF3 permettant le recrutement de complexe de préinitiation 43S, est représentée par une double flèche bleue. (C) Représentation du ribosome assemblé sur le codon initiateur de l'ARNm d'H4.

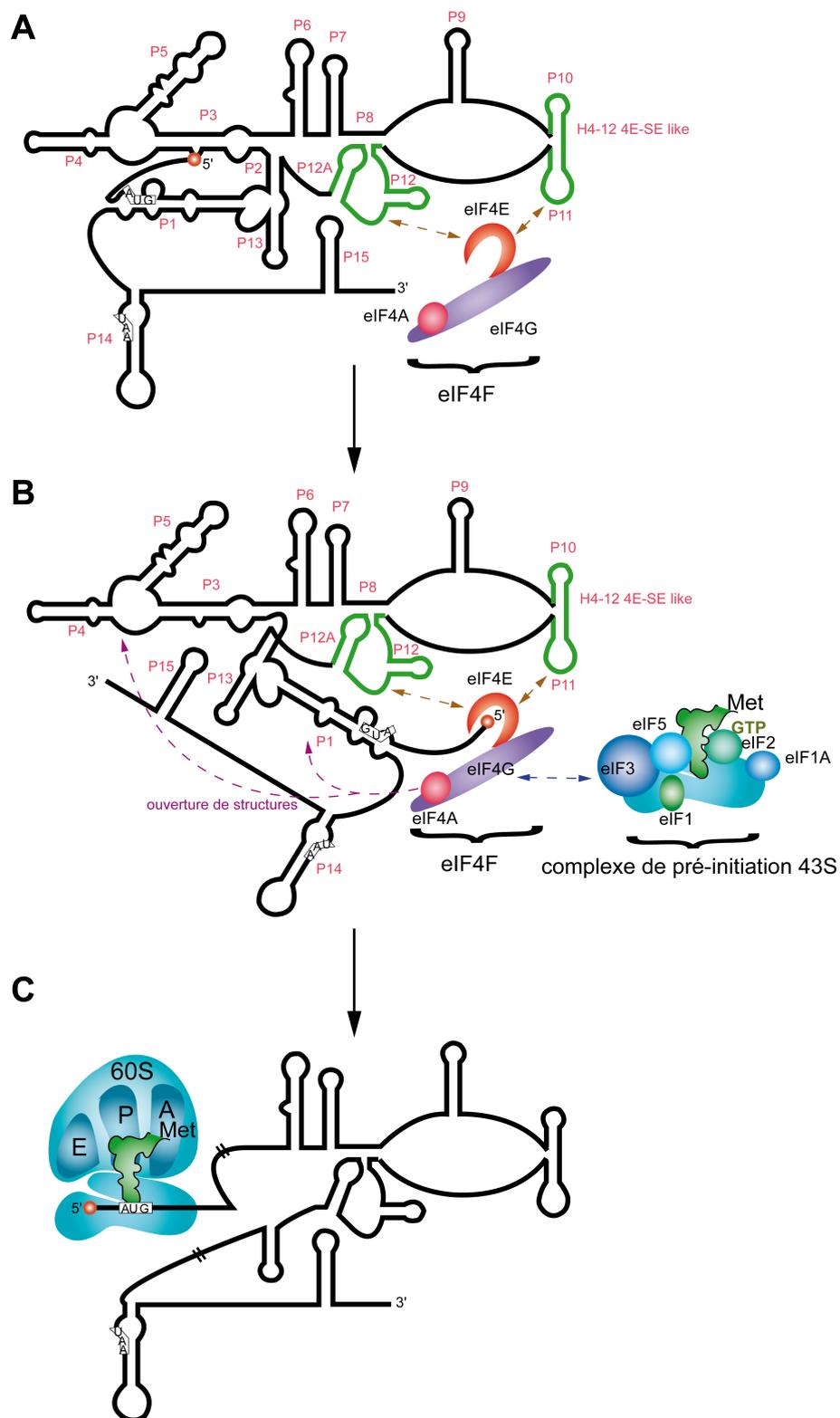


FIG. 2.10 – Représentation simplifiée du modèle d'initiation de la traduction de l'ARNm d'H4

D'après le modèle, une fois le facteur de la coiffe eIF4E fixé sur son site interne, le complexe de préinitiation 43S pourra alors être recruté via l'interaction entre les facteurs eIF4G et eIF3. A ce stade, un mécanisme de « *riboswitch* » permettrait à la coiffe, alors dissimulée dans la jonction à trois hélices, de rejoindre son site d'interaction conventionnel, sur le facteur eIF4E. Mes expériences d'empreinte ont permis de mettre en évidence des remaniements structuraux, notamment au niveau de la jonction à trois hélices, suggérant que la fixation interne de ce facteur permettrait de libérer la coiffe, devenant ainsi disponible pour l'interaction avec son site spécifique sur eIF4E. Selon le modèle, le déplacement de la coiffe va ainsi rapprocher le complexe eIF4F des séquences très structurées, composées de la jonction à trois hélices qui seront ensuite ouvertes grâce à l'action de l'ARN hélicase eIF4A. Ce dépliement de l'extrémité 5' du messager serait important pour la mise en place du complexe ribosomique sur le codon initiateur. D'après les résultats de mes expériences d'empreinte, l'ouverture de l'extrémité 5' pourrait être initiée lors de la fixation du facteur eIF4E, qui semble fragiliser la jonction à trois hélices, ainsi que l'hélice P1 contenant le codon initiateur. Bien qu'aucun rôle de la coiffe n'ait été déterminé dans ce processus, mes résultats de sondage suggèrent que cet AUG serait plus accessible chez les ARNm coiffés. Enfin selon le modèle, lorsque le codon initiateur est exposé, le ribosome se place à l'extrémité 5' de l'ARNm d'H4 grâce aux interactions qui se produisent entre le codon AUG et l'anticodon du Mét-ARNt^{Met}. Une fois que le complexe 48S est bien positionné, la grande sous-unité ribosome vient se fixer à la petite pour former une particule de 80S capable d'entrer dans l'étape d'élongation de la traduction.

Chapitre 3

Etude de l'initiation de la traduction des ARNm codant pour les histones H2A, H2B et H3

3.1 Introduction

La découverte d'un mécanisme, non conventionnel et très efficace, d'initiation de la traduction de l'ARNm d'H4 m'a conduit à m'intéresser à la synthèse des trois autres classes d'histones replication-dépendants (H2A, H2B et H3), qui n'avaient pas encore été étudiées. D'abord, j'ai cherché à savoir si les ARNm des quatre classes d'histones étaient traduits avec la même efficacité, ce qui permettrait une synthèse stœchiométrique de ces histones, nécessaire pour la formation des octamères. Ensuite, comme l'efficacité de la synthèse de l'histone H4 est en grande partie due aux éléments structuraux situés au sein de la séquence codante de son messenger, j'ai recherché les éléments en *cis* des ARNm des trois autres classes d'histones qui seraient importants au démarrage de leur traduction. Pour cela, j'ai analysé l'influence de leurs UTR et le rôle de leur

séquence codante dans ce processus. Enfin, j'ai voulu étudier l'importance la coiffe de ces messagers dans le démarrage de la synthèse de ces histones.

3.2 Choix et préparation du matériel génétique utilisé pendant la thèse

Aucune étude n'ayant précédemment été menée sur l'initiation de la traduction des histones H2A, H2B et H3, il a d'abord été nécessaire de choisir un organisme modèle. Les études portant sur H4 ayant été effectuées à l'aide de matériel génétique provenant de *Mus musculus* (souris grise), cet organisme a également servi de référence pour les études sur les trois autres classes d'histones. Dans cet organisme, plusieurs copies de chaque type de gène d'histones réplication dépendants ont été répertoriées : 18 gènes de l'histone H2A, 17 gènes de l'histone H2B et 12 gènes d'histone H3 (cf. Fig. 3.1). Chez la souris, ces gènes sont regroupés en trois clusters. Le plus grand, *Hist1*, est localisé sur le chromosome 13 et contient 51 gènes d'histones. Les deux autres, *Hist2* et *Hist3*, sont plus petits et localisés sur les chromosomes 3 et 11, respectivement (Marzluff et al., 2002). Dans l'étude de l'initiation de la traduction des histones H2A, H2B et H3, un gène représentatif de chaque type d'histone a été choisi. Ce choix a été dicté par la connaissance de la localisation des extrémités 5' et 3' des ARNm d'histones à l'intérieur la séquence de leur gène. Ainsi, sur le cluster *Hist1*, parmi 11 gènes d'histone H2A et 9 gènes d'H3, les gènes H2A.1 (*Hist1h2ab*) et H3.2 (*Hist1h3b*) ont été retenus pour l'étude de l'initiation de leur traduction. Le gène d'histone de H2B a été choisi parmi 2 gènes du cluster *Hist2* de la souris, il s'agit du gène H2B.613 (*Hist2h2be*). Les noms de gènes en italique et entre parenthèse sont des noms de nomenclature récente établie par Marzluff (cf. Fig. 3.1) (Marzluff et al., 2002).

L'amplification et le clonage des trois gènes d'histones choisis ont été effectués pendant mon stage de master. Ainsi, l'absence d'intron sur les gènes d'histones m'a

3.2 Choix et préparation du matériel génétique utilisé pendant la thèse

H2A			H2B			H3		
Mouse gene	Previous	Accession	Mouse gene	Previous	Accession	Mouse gene	Previous	Accession
<i>Hist1h2aa</i>	N.D.	AY158921	<i>Hist1h2ba</i>	N.D.	AY158939	<i>Hist1h3a</i>	H3-D	AY158952
<i>Hist1h2ab</i>	H2a-53	AY158920	<i>Histh2bb</i>	H2b-143	AY158938	<i>Hist1h3b</i>	H3-53	AY158951
<i>Hist1h2ac</i>	N.D.	AY158919	<i>Hist1h2bc</i>	N.D.	AY158937	<i>Hist1h3c</i>	H3-143	AY158950
<i>Hist1h2ad</i>	N.D.	AY158918	<i>Hist1h2be</i>	N.D.	AY158936	<i>Hist1h3d</i>	H3-B	AY158949
<i>Hist1h2ae</i>	N.D.	AY158917	<i>Hist1h2bf</i>	N.D.	AY158935	<i>Hist1h3e</i>	H3-F	AY158948
<i>Hist1h2af</i>	H2a-221	AY158916	<i>Hist1h2bg</i>	N.D.	AY158934	<i>Histh3f</i>	H3.2-221	AY158947
<i>Hist1h2ag</i>	N.D.	AY158915	<i>Hist1h2bh</i>	H2b-221	AY158933	<i>Hist1h3g</i>	H3.1-221	AY158946
<i>Hist1h2ah</i>	N.D.	AY158914	<i>Hist1h2bj</i>	N.D.	AY158932	<i>Hist1h3h</i>	H3-291	AY158944
<i>Hist1h2ai</i>	H2a-291A	AY158909	<i>Hist1h2bk</i>	N.D.	AY158931	<i>Hist1h3i</i>	H3-H	AY158945
<i>Hist1h2aj</i> (-)	H2a-291B	AY158910	<i>Hist1h2bl</i>	H2b-291A	AY158927	<i>Hist2h3b</i>	H3-616	AY158955
<i>Hist1h2ak</i>	N.D.	AY158911	<i>Hist1h2bm</i>	H2b-291B	AY158928	<i>Hist2h3ca1</i>	H3-615	AY158954
<i>Hist1h2an</i>	N.D.	AY158912	<i>Hist1h2bn</i>	N.D.	AY158929	<i>Hist2h3ca2</i>	H3-614	AY158953
<i>Hist1h2ao</i>	N.D.	AY158913	<i>Hist1h2bp</i>	N.D.	AY158930			
<i>Hist2h2aa1</i>	H2a-615	AY158925	<i>Hist2h2bb</i>	H2b-616	AY158940			
<i>Hist2h2aa2</i>	H2a-614	AY158924	<i>Hist2h2be</i>	H2b-613	AY158941			
<i>Hist2h2ab</i>	H2a-613A	AY158922	<i>Hist3h2ba</i>	N.D.	AY158942			
<i>Hist2h2ac</i>	H2a-613B	AY158923	<i>Hist3h2bb</i>	N.D.	AY158943			
<i>Hist3h2a</i>	N.D.	AY158909						

FIG. 3.1 – Tableau résumant les gènes d’histones réplication-dépendants de H2A, H2B et H3, provenant de *Mus musculus*

De gauche à droite, les trois sous-colonnes de chaque classe d’histone représentent : la nomenclature récente des gènes d’histones (en italique) ; l’ancienne nomenclature de ces mêmes gènes ; et le numéro d’accession dans la banque NCBI. La nomenclature récente indique, de gauche à droite : le nom du cluster comportant le gène ; le nom de la classe d’histone ; le nom du gène. N.D. indique que le gène n’a pas été identifié avant la mise en place de la nomenclature récente. Les gènes H2a-53 et H3-53 sont également connus sous le nom de H2A.1 et H3.2 respectivement. Les trois gènes utilisés au cours de ma thèse sont surlignés en vert (Marzluff et al., 2002).

permis d’amplifier ces trois gènes à partir de l’ADN génomique de la souris, à l’aide des amorces comportant en 5’ le site de restriction EcoRI suivi d’une vingtaine de nucléotides complémentaires au gène choisi. Grâce aux sites de restriction EcoRI, j’ai effectué les expériences de clonage des trois gènes d’histones d’H2A, H2B et H3 dans le plasmide pUC19. Après la vérification de la séquence des trois clones obtenus, quelques mutations ont été observées pour les séquences d’H2A et H2B. Le gène de H2A (numéro d’accession : AY158920) contenait trois mutations dans la phase codante, dont deux silencieuses (A→G à la position 184 et G→T à la position 186), et une mutation faux-sens Cys→Gly (T→G à la position 187). Dans la séquence du gène de H2B (numéro

CHAPITRE 3 : Etude de l'initiation de la traduction des ARNm codant pour les histones H2A, H2B et H3

d'accension : AY158941), seule une mutation silencieuse (C→G à la position 330) a été détectée. Les mêmes mutations aux mêmes positions ont été retrouvées à l'issue du second clonage des gènes d'H2A et H2B de l'ADN génomique de souris. Ces résultats ont suggéré que les mutations obtenues pour les gènes d'H2A et H2B sont dûes à des variations naturelles de l'ADN génomique de la souris, et pourront donc être considérées comme un polymorphisme de séquence plutôt qu'une erreur de l'ADN polymérase utilisée lors de la réaction d'amplification. La séquence du gène d'H3 était identique à celle trouvée dans les banques de données (numéro d'accension : M33989).

Les clones obtenus, pUC19-H2A, pUC19-H2B et pUC19-H3, qui m'ont servi de base tout au long de ma thèse, n'ont pas été transcrits directement, mais ont servi de matrice pour une amplification par PCR des fragments d'ADN porteurs à la fois du promoteur T7 et des gènes d'histones. En effet, des amorces comportant le promoteur de l'ARN polymérase T7 suivi d'une vingtaine de nucléotides des gènes d'histones clonés ont été utilisées du côté 5'. D'autres amorces, complémentaires à l'extrémité 3' des gènes d'histones, ont été utilisées afin de générer les extrémités 3' attendues. Les fragments d'ADN amplifiés ont servi de matrice pour la synthèse *in vitro* des ARNm correspondants. L'avantage de cette technique est qu'en adoptant différents types d'amorces, il a été possible de synthétiser les ARN délétés de différentes régions. De cette manière, j'ai pu synthétiser les ARNm codants pour les histones H2A, H2B et H3, entiers ou délétés de leurs régions non codantes, pour une étude de l'influence des UTR dans la traduction (*cf.* §3.4). Plus loin, dans l'étude fonctionnelle de l'histone H3, nous verrons que cette technique m'a également permis de synthétiser différents types d'ARNm d'H3, délétés de diverses régions de leur séquence codante (*cf.* §4.3.2.3).

3.3 Etude de l'efficacité de la traduction des ARNm d'histones

3.3.1 Présentation de la problématique

La synthèse massive des histones, pendant la phase S du cycle cellulaire, pose la question de l'efficacité de traduction de leur ARNm. Ainsi, il est très tentant d'émettre l'hypothèse que la traduction des ARNm d'histones serait beaucoup plus efficace que celle des messagers classiques. Les premières études, réalisées *in vitro* sur l'ARNm de l'histone H4, ont confirmé cette hypothèse (*cf. Chap. 2*). Afin de vérifier que c'était également le cas pour les ARNm des trois autres histones d'octamère (H2A, H2B et H3), j'ai comparé l'efficacité de leur traduction.

3.3.2 Approche expérimentale utilisée

Comme ce fut le cas pour le messager d'H4 (Jaeger, 2005), j'ai étudié l'initiation de la traduction des ARNm des histones H2A, H2B et H3 *in vitro*, dans le lysat de réticulocytes de lapin (RRL, « *rabbit reticulocyte lysate* ») et dans les extraits de germe de blé (WGE, « *wheat germ extract* »). Ces deux systèmes, comprenant toutes les composantes nécessaires à l'initiation de la traduction des ARNm classiques, présentent l'avantage d'avoir fait l'objet de nombreuses études et ont été largement utilisés afin de mieux comprendre le mécanisme de la synthèse protéique chez les eucaryotes (Soto Rifo et al., 2007). De plus, le niveau de traduction dans ces milieux est proche de celui *in vivo*, y compris pour des ARNm exogènes, comme c'est le cas pour les ARNm de souris auxquels je me suis intéressée. Bien que le mécanisme de l'initiation de la traduction reste conservé chez les eucaryotes, des différences de sensibilité aux éléments *in cis* ont été observées entre les règnes animal et végétal. Par exemple, le WGE présente une plus forte sensibilité à la présence de la coiffe des messagers, tandis

que le RRL, provenant d'un mammifère, est plus proche du milieu naturel de traduction des ARNm étudiés (Soto Rifo et al., 2007).

Les produits de la traduction ont été résolus sur gel de polyacrylamide 15% dénaturant, et détectés grâce au marquage à la [¹⁴C]-Leucine. Ce marquage, présentant une radioactivité plus faible que celui à la [³⁵S]-Méthionine, a dû être utilisé car l'histone H2A ne possède pas de méthionine interne. Les produits de traduction obtenus pour les messagers des histones d'octamère (H2A, H2B et H3) ont été comparés à ceux des témoins que sont l'ARNm de la GFP dont la traduction est conventionnelle et l'ARNm d'H4 qui est traduit de façon atypique.

3.3.3 Résultats et discussions

Les résultats des expériences de traduction montrent des produits de tailles comprises entre 10 et 17kDa, correspondant aux quatre classes d'histones et un produit de ~27kDa qui correspond à la GFP (*cf. Fig. 3.2-A et B*). Aucun sous produit de la traduction n'a été observé, montrant que les ARNm ont été traduits correctement dans les systèmes de RRL et de WGE. Néanmoins, il est possible de voir que dans le RRL, les bandes correspondant aux histones sont plus larges que celles de la GFP ou celles des histones dans le WGE. Ceci est dû à la grande quantité de globine présente dans les réticulocytes de lapin. La taille de la globine étant très similaire à celle des histones, elle migre sous forme de bande large de 10-15 kDa et entraîne les histones dans sa migration (Promega).

Comme ce fut le cas dans les études précédemment menées (Jaeger, 2005), un fort rendement de synthèse de l'histone H4 a été observé dans les deux milieux de traduction utilisés. L'analyse de mes gels révèle également que l'ARNm de l'histone H3 est traduit dans ces milieux avec environ trois fois plus d'efficacité que l'ARNm classique de la GFP et donc à un niveau similaire au messager d'H4 (*cf. Fig. 3.2-C*). Ainsi ces résultats sont en accord avec mon hypothèse de départ et suggèrent que les

3.3 Etude de l'efficacité de la traduction des ARNm d'histones

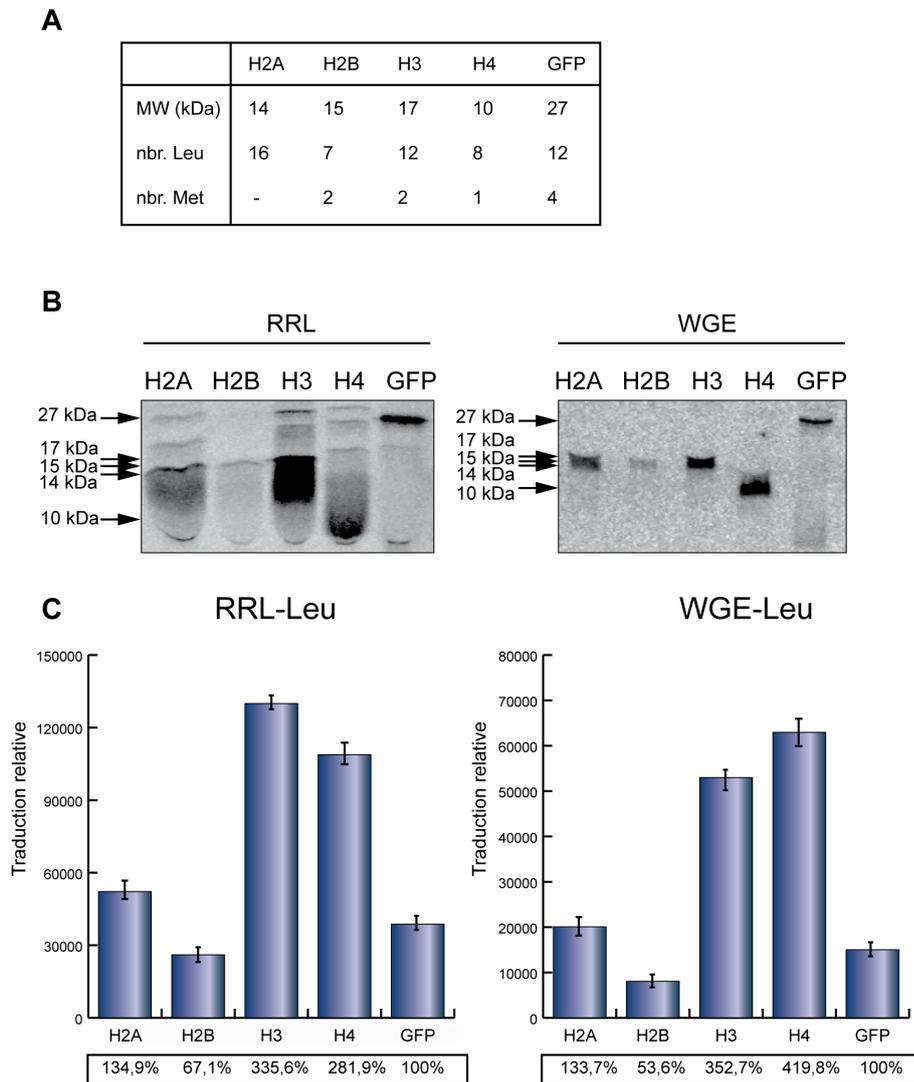


FIG. 3.2 – Comparaison d'efficacité de traduction *in vitro* entre les ARNm des quatre classes d'histones et l'ARNm conventionnel (GFP)

(A) Tableau indiquant le poids moléculaire (MW), le nombre de leucines et de méthionines (de la protéine mature) dans la séquence protéique des quatre histones (H2A, H2B, H3 et H4) et du témoin (GFP).

(B) Deux gels représentatifs des expériences de traduction *in vitro*, dans le RRL et le WGE. Les bandes correspondant aux produits de traduction sont annotées par des flèches et par leur poids moléculaire.

(C) Deux histogrammes résumant l'efficacité de traduction des ARNm des quatre classes d'histones d'octamère par rapport à l'ARNm conventionnel dans le RRL et le WGE. Les tableaux, en dessous des histogrammes, correspondent à l'efficacité relative de traduction des quatre classes d'histones et du témoin, exprimée en pourcentage par rapport à la valeur de la GFP (100%). 5pmol d'ARNm ont été traduits en présence de 10 μ l de RRL ou WGE et de 0,1 μ Ci de [¹⁴C]-Leucine. Les produits de traduction ont ensuite été révélés sur gel de polyacrylamide dénaturant pour protéines, puis mesurés en PSL (radioactivité relative) et relativisés par rapport au nombre de leucines (de la protéine d'intérêt) et la taille de l'ARN.

CHAPITRE 3 : Etude de l'initiation de la traduction des ARNm codant pour les histones H2A, H2B et H3

ARNm de ces deux classes d'histones pourraient présenter des mécanismes d'initiation de la traduction similaires. En revanche, les niveaux de traduction observés pour les ARNm des deux autres classes d'histones se sont révélés inférieurs. En effet, alors que l'histone H2A est synthétisée avec un rendement légèrement supérieur à celui de la GFP, l'ARNm d'H2B n'est traduit qu'à approximativement 60% de cette efficacité (cf. Fig. 3.2-C). Ainsi, parmi les ARNm d'histones replication-dépendant, seul celui d'H2B présente un niveau de traduction inférieur, dans les deux milieux, à celui de l'ARNm classique. La différence d'efficacité observée entre les ARNm d'H3 et H4 d'une part, et ceux d'H2A et H2B d'autre part, suggère donc que les mécanismes de l'initiation de la traduction de leurs ARNm seraient différents ce qui infirme donc l'hypothèse de départ. Toutefois, malgré cette possible différence, il n'est pas exclu que les messagers d'H2A et H2B soient aussi efficacement traduits *in vivo* pendant la phase S du cycle cellulaire que les messagers d'H3 et H4. En effet, il est probable que le milieu traductionnel *in vitro* soit dépourvu de certains facteurs nécessaires à une traduction efficace de ces ARNm. Parmi les facteurs manquants dans ces milieux de traduction, on retrouve la SLBP (Stem Loop Binding Protein) qui reconnaît la tige boucle à l'extrémité 3' des ARNm des histones replication-dépendant, et dont il a été montré qu'elle jouait un rôle crucial dans l'efficacité de la traduction des ARNm de ces histones (Sánchez and Marzluff, 2002). Toutefois, des études menées dans notre laboratoire ont mis en évidence que la traduction du messager d'H4 ne nécessitait pas ce facteur pour être efficace (Jaeger, 2005). De plus, les rendements de traduction comparables entre les ARNm d'H3 et H4, observés lors de mes expériences, semblent indiquer que l'histone H3 ne nécessiterait pas non plus la présence de SLBP pour être efficacement synthétisée. Dans le cas des histones H2A et H2B, à l'issue de ces expériences, il n'est pas possible de déterminer si l'efficacité de traduction plus faible est due à l'absence de ce facteur.

Mes résultats d'expériences *in vitro* ayant montré que l'ARNm de l'histone H3 est très efficacement traduit, j'ai décidé d'approfondir cette étude en effectuant plusieurs tests de traduction de l'ARNm d'H3 dans le RRL. Ces expériences ont été réalisées pour

3.3 Etude de l'efficacité de la traduction des ARNm d'histones

une gamme de concentration croissante en ARNm d'H3 en présence de deux nouveaux témoins, couramment utilisés dans ce type d'expérience (Annamalai and Rao, 2006) et suivant la voie classique de traduction. Le premier témoin est l'ARNm eucaryotique codant pour l'enzyme luciférase *fLuc* « *firefly Luciferase* », et le second est l'ARNm viral codant pour la protéine de coque, CP « *coat protein* », du Virus de la Mosaïque du Brome (BMV). Les valeurs mesurées pour les traductions ont été relativisées en fonction du nombre de méthionines radioactives incorporées et de la taille des ARNm (*cf. Fig. 3.3-A*). J'ai utilisé les résultats de cette expérience afin de tracer une courbe de fonction d'approximation par rapport à la concentration en ARNm (*cf. Fig. 3.3-C*). La comparaison d'efficacité de la traduction de l'ARNm de l'histone H3 à celle de l'ARNm de *fLuc* et CP s'est effectuée pour une concentration de 250nM, correspondant à une traduction pendant la phase croissante de la synthèse protéique. Le calcul de rapport d'efficacité entre l'histone H3 et les témoins montre que l'histone H3 est plus de deux fois mieux traduit que l'ARNm de CP et de *fLuc*, ce qui confirme la traduction efficace de l'ARNm de l'histone H3.

Pour conclure, mes expériences ont permis de montrer que, contrairement à l'hypothèse de départ, tous les ARNm d'histones n'étaient pas aussi bien traduits *in vitro* que celui d'H4. Ainsi, ces résultats montrent que l'on peut classer les histones en deux groupes en fonction de l'efficacité de traduction de leurs messagers. D'un coté H3 et H4 dont les ARNm sont le plus efficacement traduit, et de l'autre H2A et H2B dont le niveau de synthèse est plus bas. Malgré cette différence d'efficacité, il n'est pas exclu que les ARNm des quatre classes d'histones présentent des particularités communes, leur permettant d'être régulés au niveau traductionnel pendant la phase S du cycle cellulaire. Pour cette raison, j'ai continué à étudier d'autres éléments en *cis* de ces ARNm.

CHAPITRE 3 : Etude de l'initiation de la traduction des ARNm codant pour les histones H2A, H2B et H3

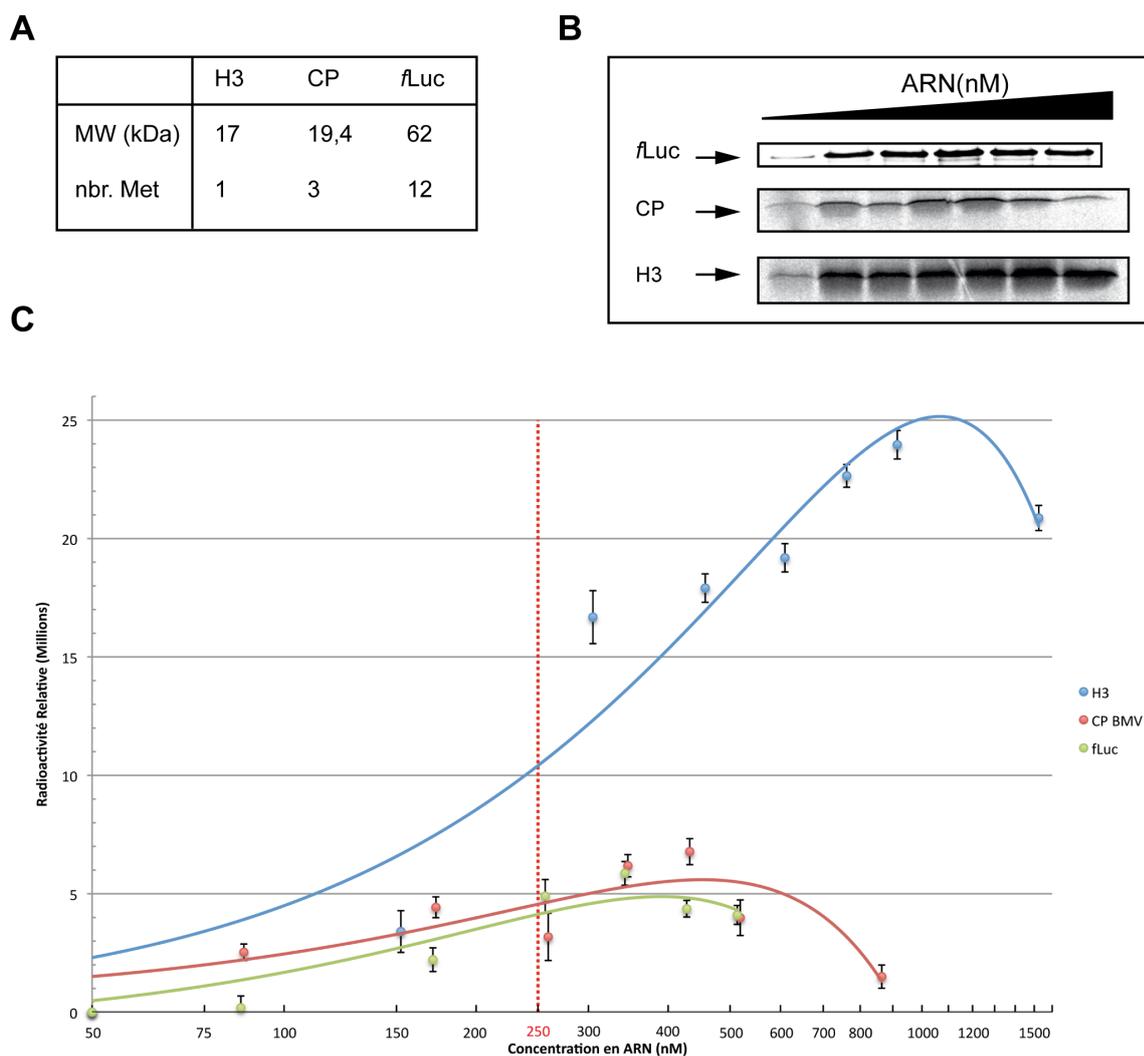


FIG. 3.3 – Comparaison de l'efficacité de la traduction de l'ARNm de l'histone H3 par rapport à des ARNm conventionnels, CP (coat protein) et fLuc (firefly Luciferase)

(A) Tableau indiquant le poids moléculaire (MW) et le nombre de méthionines (de la protéine mature) dans la séquence protéique de l'histone H3 et des témoins (CP et fLuc). (B) Gels représentant les produits de la traduction *in vitro* dans le RRL, en présence d'une gamme croissante d'ARNm de 0,05 à 1,5 μ M ; de 10 μ l de RRL et de 3,75 μ Ci de [35 S]-Méthionine. Les bandes correspondant aux produits de traduction, révélés sur gel de polyacrylamide dénaturant pour protéines, sont annotées par des flèches et par leur poids moléculaire (de haut en bas : fLuc, CP et l'histone H3). (C) Courbe de fonction d'approximation de l'efficacité de la traduction (exprimée en radioactivité relative : PSL) en fonction de la concentration croissante en ARNm de l'histone H3 (bleu), CP (vert) et fLuc (rouge) présent dans le milieu traductionnel.

3.4 Etude de l'influence des UTR dans la traduction des ARNm d'H2A, H2B et H3

3.4.1 Présentation de la problématique

L'initiation classique des ARNm eucaryotiques nécessite les séquences non codantes (UTR). En effet, il a été montré que la délétion des 5'UTR des ARNm classiques résulte en un « *leaky-scanning* » du ribosome vers l'AUG suivant, induisant une synthèse d'une protéine tronquée de son extrémité N-terminale (Jackson et al., 2010)(Kozak, 1991a)(Kozak, 1991b). Dans le cas de l'ARNm de l'histone H4, il a été montré que la délétion des UTR n'affectait pas considérablement l'efficacité ni la fidélité de sa traduction, et que les éléments en *cis* importants au recrutement et au positionnement correct du ribosome sont plutôt localisés à l'intérieur de la séquence codante de cet ARN. Ainsi, la séquence codante de l'ARNm de l'histone H4 est capable, à elle seule, d'assurer efficacement la traduction, à condition d'être coiffée en 5'. La question du rôle des UTR pour les histones H2A, H2B et H3, s'est donc posée. La taille des régions 5' non codantes, des ARNm d'H2A, H2B et H3 est de 46nt, 45nt et 35nt respectivement, soit légèrement inférieure à la taille optimale pour une traduction efficace par voie classique (Chappell et al., 2006). On peut donc se demander si, comme c'est le cas pour le messenger d'H4, leur séquence codante serait suffisante pour assurer la synthèse protéique.

3.4.2 Approche expérimentale utilisée

Afin de mesurer l'impact des extrémités non codantes des messagers d'H2A, H2B et H3 sur la synthèse de ces protéines, j'ai comparé l'efficacité de traduction de ces ARNm privés de leurs 5' et/ou 3' UTR avec celle des ARNm entiers. Ces ARNm tronqués ont été transcrits à partir de matrices que j'ai obtenues par PCR en utilisant

des amorces appropriées (*cf.* §3.2). Pour que le seul paramètre variable dans cette étude soit la présence ou non des UTR, tous les ARNm ont été coiffés en 5' puis traduits dans le RRL, dans les conditions standards (*cf.* §A.4.2). Par ailleurs, lors de ces expériences j'ai utilisé deux types de marquage : la [¹⁴C]-Leucine pour H2A, H2B et H3, et la [³⁵S]-Méthionine pour H2B et H3. La valeur mesurée de l'intensité des bandes correspondant aux produits de traduction a été relativisée, par rapport au nombre d'acides aminés radioactifs incorporés, et à leur taille (*cf.* Fig. 3.2-A). Ces valeurs ont ensuite été normalisées en attribuant un score de 100% à celles correspondant aux ARNm entiers.

3.4.3 Résultats et discussions

Les expériences de traduction menées sur l'ARNm d'H3 montrent que la délétion d'une ou des deux extrémités non codantes n'affectent pas significativement l'efficacité de traduction de ce messager. En effet, le niveau de traduction des ARNm tronqués est à environ 70% de celui des ARNm entiers (*cf.* Fig. 3.4-A-B), ce qui est toujours supérieur à celui des ARNm conventionnels qui, d'après mes expériences antérieures, se situent entre 30 et 40% de la valeur observée pour le messager de l'histone H3 natif (*cf.* §3.3.3). Ce constat suggère donc que, comme cela a été observé pour le messager d'H4, les régions non codantes de l'ARNm de l'histone H3 ne possèderaient pas de propriétés cruciales à la machinerie traductionnelle et que celles-ci seraient plutôt retrouvées dans la séquence codante.

Cette hypothèse est confortée par la forte conservation des séquences codantes des ARNm des histones, bien au delà de ce qui est nécessaire pour maintenir leurs séquences protéiques. En effet, de nombreuses études antérieures ont mis en évidence, à l'intérieur de la séquence codante, des éléments en *cis* cruciaux pour le métabolisme de ces ARNm, qui exerceraient une pression de sélection sur la séquence nucléotidique. Par exemple, l'un de ces éléments est une séquence de 22nt qui fixe SF3b155 et hPrp43, les protéines associées au complexe de U2 snRNP, favorisant la maturation

3.4 Etude de l'influence des UTR dans la traduction des ARNm d'H2A, H2B et H3

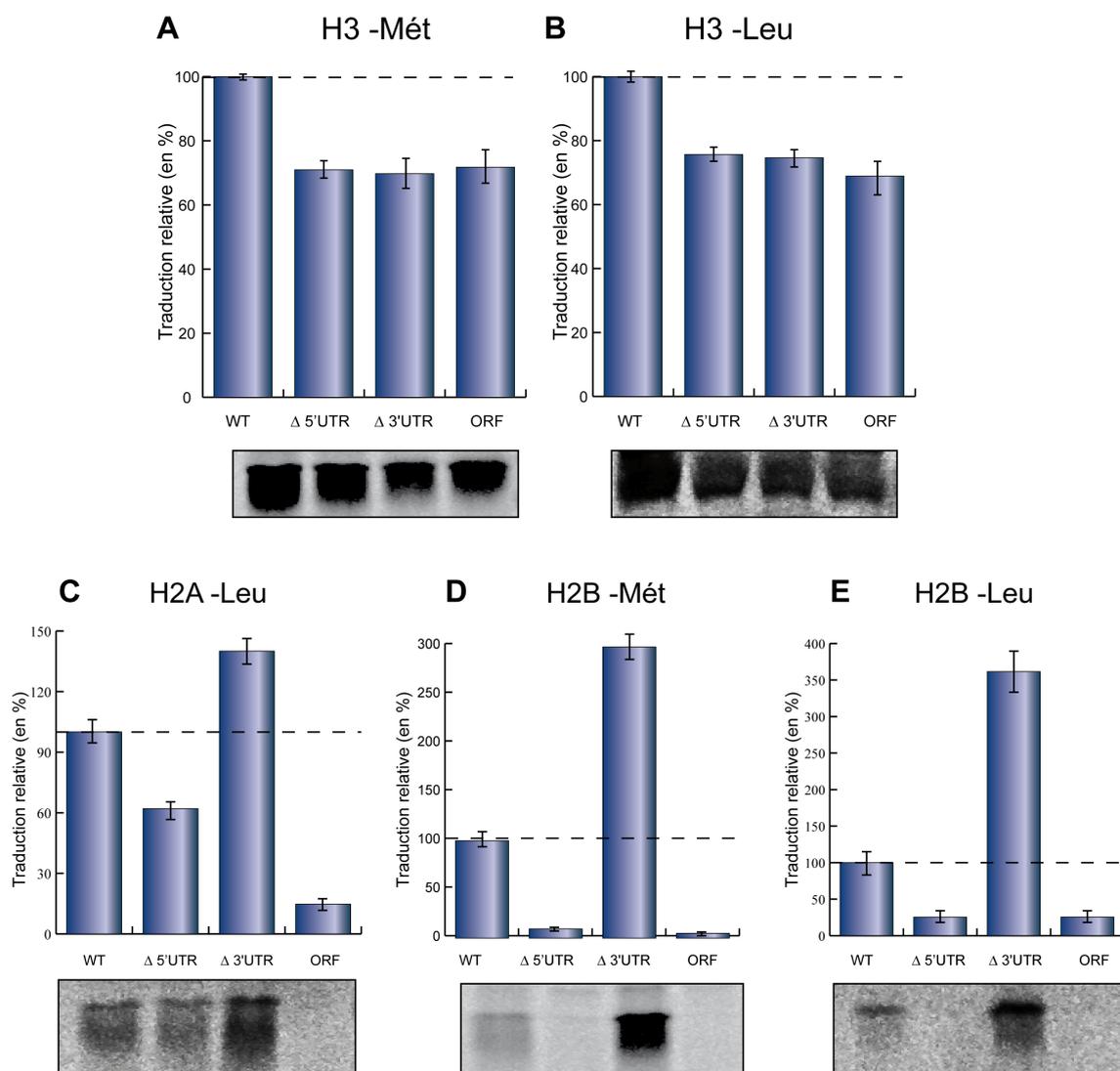


FIG. 3.4 – Comparaison de l'efficacité de traduction des ARNm des histones H2A, H2B et H3 délétes de leurs UTR.

Traduction *in vitro* des ARNm des histones H3, H2A et H2B entiers (WT) ; délétes de leur région 5' non codante (Δ 5'UTR) ; ou de leur région 3' non codante (Δ 3'UTR) ; ou des deux régions non codantes (ORF). 250nM de chaque type d'ARN a été traduit dans le RRL en présence de 3,75 μ Ci de [¹⁴S]-Méthionine (A et D) ou de 0,1 μ Ci de [¹⁴C]-Leucine (B, C et E). L'efficacité de leur traduction est exprimée en pourcentage par rapport à la valeur de l'ARNm entier de l'histone correspondante (WT=100%). Les gels représentatifs de ces expériences sont présentés en dessous des histogrammes.

de l'extrémité 3' des ARNm des histones réplication-dépendants (Friend et al., 2007). Ce même élément interagit également avec les protéines SR : 9G8 et SRp20, permettant le transport nucléocytoplasmique de ces messagers. On trouve également au sein de ces séquences codantes une région fixant le facteur de transcription YY1 qui augmente

l'expression de ces ARNm au niveau transcriptionnel (Marzluff, 2007). L'identification d'éléments de séquence importants à la traduction et localisés dans la région codante du messager d'H3 serait donc un exemple supplémentaire de la pression de sélection exercée sur la séquence nucléotidique, indépendamment de celle nécessaire au maintien de la séquence protéique.

Ces résultats concordant entre les messagers d'H3 et H4 n'ont toutefois pas été confirmés pour les ARNm des histones H2A et H2B. En effet, les résultats de ces expériences ont montré que l'efficacité de la traduction des histones H2A et H2B était sensible à la délétion des régions non codantes. La première propriété révélée pour ces ARNm est la diminution de leur traduction en cas de délétion simultanée des deux régions non codantes. En effet, dans ces conditions, l'efficacité de leur traduction chute par rapport aux messagers entiers à 15% pour H2A, et dans le cas de l'histone H2B elle chute à 25% pour un marquage à la [¹⁴C]-Leu et à 5% pour un marquage à la [³⁵S]-Met (*cf. Fig. 3.4-C, -D et -E*). Ces valeurs sont très proches de celles obtenues pour les ARNm conventionnels (Kozak, 1991b), et montrent que, comme eux, et contrairement aux ARNm des histones H3 et H4, les séquences codantes coiffées d'H2A et H2B ne sont pas capables à elles seules d'assurer une traduction efficace, dans le milieu utilisé. Afin de mieux comprendre le rôle de chaque UTR dans la traduction des messagers de ces histones, j'ai effectué plusieurs tests de traduction dans lesquels seule la région 5' ou 3' a été délétée.

Dans le cas de la délétion de la région 5' non codante, une différence de sensibilité de la traduction a été observée entre les ARNm des histones H2A et H2B. En effet, sans son extrémité 5' non codante, la traduction de l'ARNm d'H2A baisse à 62%, alors que pour l'histone H2B elle chute à 25% pour le marquage à la [¹⁴C]-Leu et à 9% pour le marquage à la [³⁵S]-Met. Ainsi, ces résultats montrent que l'ARNm de l'histone H2A est capable d'assurer une bonne traduction en absence de son 5'UTR, alors que l'ARNm de l'histone H2B ne le peut pas. Constatons que les résultats obtenus pour l'histone H2A se rapprochent de ceux relevés pour les histones H3 et H4. Ces

3.4 Etude de l'influence des UTR dans la traduction des ARNm d'H2A, H2B et H3

observations suggèrent que le 5'UTR de l'ARNm de l'histone H2A ne posséderait pas d'éléments cruciaux pour la machinerie traductionnelle et que cette région n'aurait pas de grande influence sur de tels éléments localisés ailleurs. Une autre hypothèse pour expliquer ces résultats serait la possibilité selon laquelle l'ARNm dépourvu de son 5'UTR adopterait un mode de traduction alternatif, par rapport à celui utilisé en présence des deux UTR, afin de compenser la perte de la région 5' non codante. Par exemple, cet ARNm pourrait recruter le ribosome préassemblé 80S par la voie des ARNm « *leaderless* » (Andreev et al., 2006). À l'inverse, la nécessité de la région 5' non codante dans la synthèse de l'histone H2B, suggère que cette région pourrait contenir des éléments importants, et/ou qu'elle aurait une influence sur la fonction des ces derniers dans le mécanisme de l'initiation de la traduction.

Les expériences menées sur les ARNm délétés de leur extrémité 3' montrent des résultats similaires pour les messagers d'H2A et H2B. En effet, l'efficacité de traduction de ces ARNm tronqués augmentent, par rapport aux messagers entiers, de 1,4 fois pour celui d'H2A et de 3 fois pour celui d'H2B, ce qui ramène leur niveau de traduction à environ 70% de celui observé pour l'ARNm natif d'H4, soit au double de l'efficacité mesurée pour l'ARNm de la GFP (*cf.* §3.3.3). Ces résultats apportent un regard nouveau sur l'apparente différence d'efficacité entre les ARNm entiers d'H3 et H4 d'une part, et d'H2A et H2B de l'autre. En effet, il semblerait que dans le RRL l'extrémité 3' non codante ait un effet délétère sur la traduction de ces derniers messagers, probablement en affectant leur structure secondaire, comme cela a été observé pour l'ARNm de CYC1 chez la levure (Sherman et al., 1986). Ceci pourrait se produire par la fixation d'une partie de la séquence 3' non codante sur une autre région du messenger des histones H2A et H2B qui reste encore à déterminer. L'un des partenaires privilégiés de la région 3' UTR, *in vivo*, est la protéine SLBP, qui se fixe spécifiquement sur la structure en tige boucle à l'extrémité 3' et participe à de nombreux processus du métabolisme des ARNm d'histones réplication-dépendants (*cf.* Chap. 1). Il n'est donc pas exclu que cette protéine, manquante dans le milieu de traduction utilisé, pourrait *in vivo* monopoliser

la région 3' et l'empêcher d'établir une interaction avec une autre région de l'ARNm, assurant ainsi un niveau de traduction équivalent à celui observé pour les messagers d'H3 et H4.

En conclusion, j'ai pu montrer que, contrairement à l'hypothèse de départ, la traduction des ARNm des histones H2A, H2B, H3 et H4 ne présente pas la même sensibilité, *in vitro*, vis à vis de la délétion de leurs régions non codantes. Ainsi, en fonction de cette sensibilité, j'ai classé les ARNm de ces histones en deux groupes. Le premier concerne les histones H3 et H4, pour lesquels des éléments en *cis* importants au démarrage de la traduction seraient localisés au sein de la séquence codante de leur ARNm. Le second groupe est composé des ARNm des histones H2A et H2B, pour lesquels la séquence codante n'est pas suffisante pour assurer une traduction efficace *in vitro*. De plus, un examen plus approfondi a montré que les ARNm de ce groupe étaient beaucoup plus efficacement traduits, *in vitro*, en l'absence de leur 3' UTR. Ceci implique que l'effet de ces régions pourrait être régulé *in vivo* et j'ai émis l'hypothèse que la protéine SLBP pourrait remplir ce rôle en se fixant sur la tige boucle à l'extrémité 3' de ces molécules. Enfin, au sein de ce groupe une différence significative dans le comportement de délétion du 5'UTR a été constatée, suggérant que les processus du démarrage de la traduction des ARNm d'H2A et H2B pourraient également être différents.

3.5 Etude de l'influence de la structure coiffe dans la traduction des ARNm d'H2A, H2B et H3

3.5.1 Présentation de la problématique

La présence de la structure coiffe $m^7G(5')ppp(5')N$ dans leur extrémité 5' est l'une des particularité des ARNm cellulaires des eucaryotes. Celle-ci joue un

rôle important dans l'initiation de la traduction en étant reconnue par un facteur d'initiation classique, eIF4E, qui indirectement permet la fixation de la petite sous-unité ribosomique sur l'extrémité 5' de l'ARNm (*cf. Chap. 1*). Il a été montré qu'un ARNm classique privé de sa coiffe recrutait moins bien le ribosome et que l'efficacité de sa traduction diminuait fortement (Cowling, 2009). L'importance de cet élément n'est toutefois pas vérifiée dans le cas des ARNm possédant un IRES dans leur séquence 5' UTR (*cf. §1.1.2*). Les études menées sur H4 ont montré que sa traduction utilisait une troisième voie (*cf. §1.3*), et nous nous sommes ainsi demandé dans quelle catégorie pouvait être placée l'initiation de la traduction des ARNm d'histones H2A, H2B et H3.

3.5.2 Approche expérimentale utilisée

L'une des approches les plus utilisées pour vérifier la coiffe-dépendance de la traduction d'un ARNm est l'inhibition de la traduction par l'ajout d'une coiffe analogue, m⁷G(5')ppp(5')G, dans un milieu traductionnel. Le principe de cette méthode est de faire entrer en compétition l'analogue de la coiffe avec l'extrémité 5' coiffée d'un ARNm, pour le même site d'interaction localisé sur le facteur eIF4E (Sonenberg, 2008).

Les études antérieures, réalisées sur les ARNm classiques, ont montré qu'en présence de concentrations croissantes de coiffe analogue, le facteur eIF4E devenait de moins en moins disponible pour la coiffe située à leur extrémité 5', ce qui résulte en une perte d'efficacité de traduction. Bien que la sensibilité de la traduction à l'analogue de la coiffe varie selon les ARNm classiques « *coiffes dépendants* », en général l'initiation de la traduction de ces ARNm est inhibée par l'ajout d'une gamme de concentration croissante d'analogue, comprise entre 125 et 300 μM, dans le WGE (Groppo and Richter, 2009)(Hickey et al., 1976).

Contrairement aux ARNm conventionnels, il a été montré que, les ARNm possédant un IRES étaient moins sensibles à la présence de la coiffe analogue dans le

milieu traductionnel. Cette caractéristique confirme bien leur initiation de la traduction par la voie « *coiffe indépendante* ». De plus, il a été observé que, la traduction d'ARNm possédant un IRES pouvait être stimulée en présence de cet inhibiteur, par la compétition avec un ARNm conventionnel pour des composants de la machinerie traductionnelle (Vallejos et al., 2010).

Les études antérieures sur l'ARNm codant pour l'histone H4 ont montré que l'efficacité de sa traduction chutait à 5% pour 60 μ M de la coiffe analogue rajoutée dans le milieu réactionnel. Autrement dit : l'ARNm d'H4 est 5 fois plus sensible que les ARNm de BMV, servant de témoin d'une traduction « *coiffe-dépendante* ». Ces résultats montrent ainsi que la traduction des ARNm d'H4 est « *coiffe dépendante* ». Toutefois, l'affinité entre la coiffe de cet ARN et le facteur eIF4E est moins forte que celle qui se produit avec la coiffe d'un ARNm classique (Jaeger, 2005). Mon but était donc de vérifier la coiffe dépendance pour les autres ARNm d'histones (H2A, H2B et H3).

Il a été constaté que la sensibilité de cette expérience pouvait varier en fonction du milieu traductionnel choisi. Par exemple, la traduction des ARNm par la voie « *coiffe dépendante* » est très sensible dans le WGE. Pour cette raison, j'ai effectué ces études dans ce milieu traductionnel en présence d'une gamme croissante d'analogue de la coiffe, variant de 0,5 à 800 μ M. Pour contourner un effet inhibiteur non spécifique de l'analogue de la coiffe, dû à la chélation des ions magnésium, ces derniers ont été ajoutés au milieu traductionnel à une concentration égale à 80% de la concentration de la coiffe analogue (Vallejos et al., 2010).

3.5.3 Résultats et discussions

Les résultats de ces expériences ont montré que la traduction des ARNm des histones H2A, H2B et H3 était inhibée en présence d'une concentration croissante de coiffe analogue dans le milieu réactionnel. En effet, l'efficacité de la traduction, des trois ARNm d'histones étudiés, diminue de 80 à 95% pour une concentration de

3.5 Etude de l'influence de la structure coiffe dans la traduction des ARNm d'H2A, H2B et H3

60 μ M de coiffe analogue dans le WGE (*cf.* Fig. 3.5). Cette traduction s'est donc révélée beaucoup plus sensible à cet inhibiteur que celle d'un ARNm classique. Par exemple, la traduction du messenger codant pour la globine n'est limitée qu'à 50% pour la même concentration d'analogue de coiffe dans le même milieu réactionnel (Hickey et al., 1976). Les résultats que j'ai obtenus au cours de cette étude sont donc similaires à ceux issus des études sur l'ARNm d'H4 (Jaeger, 2005), et montrent que l'initiation de la traduction des ARNm des histones H2A, H2B et H3 s'effectue par la voie coiffe dépendante et que ce mécanisme fait intervenir le facteur de la coiffe eIF4E. De plus, comme cela a été montré pour H4, la forte sensibilité de traduction des ARNm d'histones H2A, H2B et H3, vis à vis de cet inhibiteur, suggère que l'affinité entre le facteur eIF4E et la coiffe des messagers d'histones serait moins forte que celle qui se produit entre l'ARNm classique et ce facteur. En effet, dans le cas de l'interaction du facteur eIF4E avec la coiffe des ARNm des histones H2A, H2B et H3, l'analogue de la coiffe est capable de déplacer plus facilement l'équilibre dans le sens de la formation du complexe « *coiffe analogue-eIF4E* », que lorsqu'il s'agit d'une interaction entre le facteur eIF4E et la coiffe d'un ARNm conventionnel. Ceci pourrait s'expliquer par la dissimulation de la structure coiffe des ARNm des histones H2A, H2B et H3 au facteur eIF4E, comme le propose le modèle d'initiation de la traduction du messenger d'H4 (*cf.* Chap. 2). Par ailleurs, il n'est pas exclu que les structures environnant l'extrémité 5' de ces ARN pourraient également avoir un effet négatif sur la stabilité du complexe « *coiffe-eIF4E* ».

L'analyse de la concentration inhibitrice à 50% (CI50) montre que l'analogue de coiffe à un effet inhibiteur plus fort sur la traduction du messenger d'H3 que sur celle des ARNm d'H2A et H2B. En effet, la synthèse d'H3 est inhibée à 50% par l'ajout de 15,75 μ M de coiffe analogue, alors qu'il faut plus du double de cette concentration pour inhiber au même niveau la synthèse d'H2A (36 μ M) et d'H2B (42,5 μ M). Lorsque l'on continue d'ajouter de l'analogue de coiffe dans le milieu de traduction, à une concentration de 60 μ M, l'efficacité de la traduction de l'ARNm d'H3 chute à son niveau

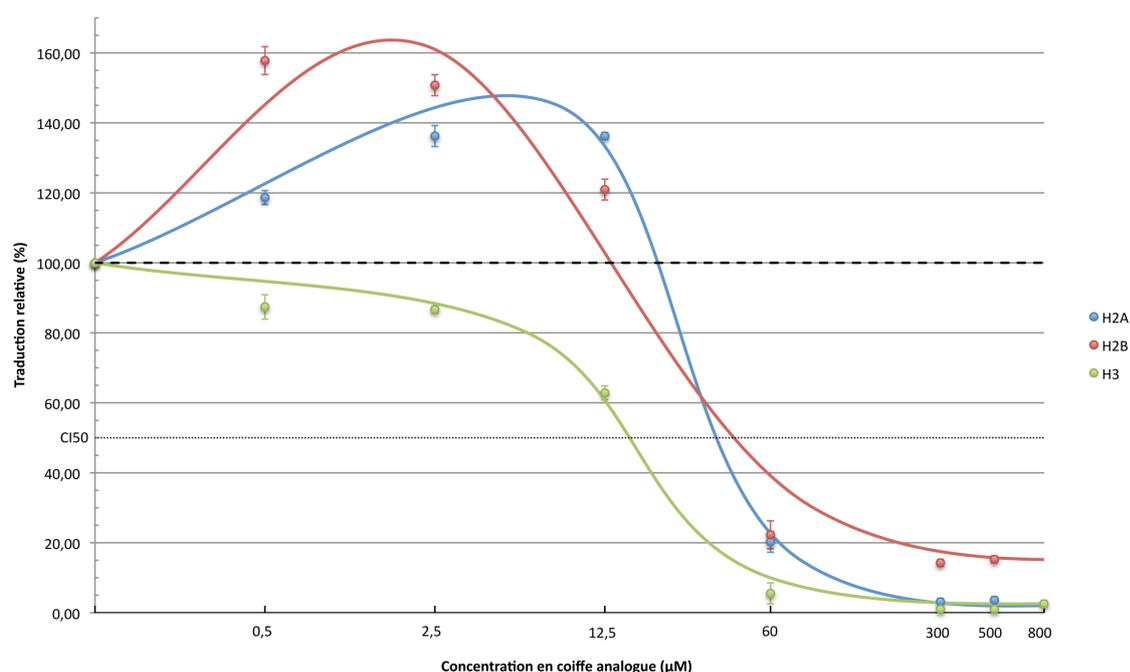


FIG. 3.5 – Courbe d'efficacité de la traduction des histones H2A, H2B et H3 en présence d'analogue de la coiffe

250nM d'ARNm des trois classes d'histones ont été traduits dans le WGE en présence d'une gamme croissante d'analogue de la coiffe et de 0,1µCi de [¹⁴C]-Leucine. L'efficacité de la traduction est exprimée en pourcentage par rapport à la traduction des trois histones en absence d'analogue de la coiffe (0µM=100%).

le plus bas, de 5% par rapport à l'ARNm de contrôle traduit en absence de cet inhibiteur, rappelant ainsi les résultats obtenus pour le messager d'H4 (cf. Fig. 3.5). Cependant, pour la même concentration en inhibiteur, l'efficacité de la traduction de l'ARNm de l'histone H2A est de 11%. L'inhibition maximale de la traduction de cet ARNm (~95%) n'est observée que pour une concentration de 300µM de la coiffe analogue. Dans le cas de l'histone H2B, les résultats ont montré que la traduction de son ARNm était moins sensible que celles des messagers d'H2A et H3, car son inhibition par la coiffe analogue semble être « incomplète ». En effet, l'efficacité de la traduction de l'ARNm d'H2B chute à 20%, par rapport à son ARNm traduit en absence d'inhibiteur, et reste constante même à de grandes concentrations de coiffe analogue. Ce constat amène à penser que l'ARNm d'H2B aurait la faculté de mieux démarrer la traduction que ceux d'H2A et H3 lorsque les interactions eIF4E-coiffe sont compromises. Toutefois, à

l'issue de ces expériences, l'origine de cette capacité demeure inconnue. Par ailleurs, à faibles doses d'analogue de coiffe, une stimulation de la traduction des ARNm d'H2A et H2B a été observée. Ceci rappelle en quelque sorte le comportement des ARNm possédant un IRES (Vallejos et al., 2010). Toutefois, lorsque la concentration en coiffe analogue augmente, l'inhibition plus forte de leur traduction par rapport aux ARNm conventionnels, exclue la possibilité d'existence d'un IRES à l'intérieur des ARNm des histones H2A et H2B.

Pour conclure, les résultats des expériences de traduction que j'ai menées sur les ARNm d'histones H2A, H2B et H3 en présence d'analogue de coiffe ressemblent à ceux qui avaient été obtenus lors de l'étude menée sur l'ARNm d'H4 (Jaeger, 2005). Ils montrent que la traduction de ces messagers se fait de façon coiffe dépendante. De plus, il apparait que l'affinité entre le facteur eIF4E et la coiffe de ces ARNm est moins forte que celle entre ce facteur et la coiffe des messagers classiques. Ainsi, certains éléments de ces ARNm pourraient rendre la coiffe des messagers d'histones moins accessible au facteur eIF4E, ou déstabiliseraient l'interaction entre ces deux partenaires. Néanmoins, une importante différence de sensibilité à cet inhibiteur a été observée entre la traduction du messager d'H3 et celle des ARNm d'H2A et H2B.

3.6 Test d'intégrité

Afin de m'assurer que les ARNm utilisés lors de mes expériences n'aient subi aucune dégradation (notamment après la délétion des UTR), j'ai procédé à une vérification de leur stabilité dans le milieu traductionnel utilisé. Comme ce fut le cas pour l'étude de l'histone H4 (Jaeger, 2005), cette vérification a été effectuée par la méthode de RT-PCR, qui est une technique sensible se déroulant en deux étapes. Dans un premier temps, l'ARNm a été rétro-transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par l'AMV à l'aide des amorces appropriées. Ces ADNc ont ensuite été amplifiés par une

CHAPITRE 3 : *Etude de l'initiation de la traduction des ARNm codant pour les histones H2A, H2B et H3*

réaction en chaîne par polymérase (PCR), jusqu'à leur détection sur gel d'agarose 1.5% (cf. §A.4.3).

Ainsi, pour chaque expérience, j'ai prélevé du milieu traductionnel 2.5pmol d'ARNm au début (t_0) et au bout de 60 min (t_{60}), correspondant à la fin de la réaction. Une fois cet ARN rétro-transcrit, 14 cycles d'amplification ont été nécessaires pour une première détection des ADNc.

Les résultats que j'ai obtenus, pour les ARNm entiers et délétés de leurs UTR, ont montré des produits de tailles attendues, avec des bandes d'intensité équivalente (cf. Fig. 3.6). Ceci indique que les ARNm des histones que j'ai utilisés ne semblent pas avoir été dégradés, ni avant, ni pendant les expériences. Les ARNm des histones H2A, H2B et H3 sont donc stables dans les milieux traductionnels utilisés, ce qui confirme la validité des résultats obtenus lors de mes expériences de traduction des ARNm des histones H2A, H2B et H3 et de leurs dérivés tronqués.

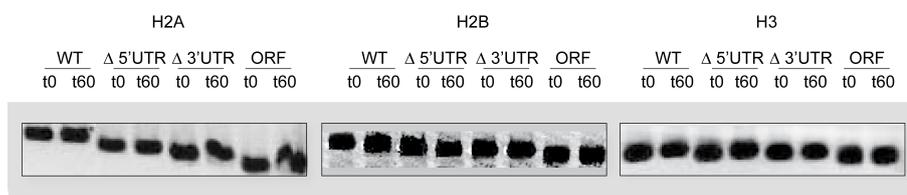


FIG. 3.6 – Trois gels représentatifs de l'expérience de RT-PCR, vérifiant l'intégrité des ARNm des histones H2A, H2B et H3

Dans ces expériences sont testés les ARNm entiers (WT), dépourvus de leurs extrémités 5' ou 3' ($\Delta 5'$ UTR et $\Delta 3'$ UTR respectivement), ou des deux simultanément (ORF).

3.7 Conclusions

Au cours de ce chapitre, j'ai cherché à savoir si les messagers des histones H2A, H2B et H3 présentaient un mécanisme d'initiation de la traduction atypique, similaire à celui de l'ARNm d'H4. Lors de chacune des études que j'ai effectuées *in vitro*, des différences dans la traduction de ces ARNm ont pu être observées. Ainsi, en fonction de

leur comportement lors des expériences de traduction, j'ai réparti ces messagers en deux groupes, le premier étant composé des ARNm d'H3 et H4, et le second des messagers d'H2A et H2B.

La première différence constatée entre les ARNm de ces deux groupes se situe au niveau de l'efficacité de leur traduction *in vitro*. En effet, alors que le rendement de traduction du messager d'H3 est très élevé, comme cela avait déjà été observé pour l'ARNm d'H4, la traduction des ARNm des histones H2A et H2B s'est révélé moins efficace. Toutefois, lors de la délétion de l'extrémité 3' des messagers de ce dernier groupe, des niveaux de traduction équivalent à ceux des ARNm d'H3 et H4 entiers ont pu être obtenus. La région 3' non codante de ces ARNm aurait donc un effet délétère sur leur traduction, qui pourrait s'expliquer par la possible interaction de cette région avec des éléments en *cis* cruciaux à la traduction, situés ailleurs dans les ARNm. Durant la phase S du cycle cellulaire, le 3' UTR de ces ARNm interagit avec la protéine SLBP, présente dans la cellule à ce moment là et se fixant spécifiquement sur la tige boucle au sein de cette région. Ainsi, *in vivo*, cette fixation pourrait empêcher la région 3' d'interagir avec le reste de l'ARNm pendant cette phase, et donc permettre un niveau de traduction équivalent pour les quatre classes d'histones. Cette hypothèse concorde avec le fait que les histones étudiées soient présentes en quantité stœchiométrique durant cette phase, afin de permettre la formation des octamères nécessaires à la compaction de l'ADN. Une étude *in vivo* de la traduction au cours de la phase S est donc nécessaire afin de comparer son efficacité pour les ARNm des quatre classes d'histones réplication dépendant.

La seconde différence, entre les ARNm des deux groupes proposés, est la localisation des éléments en *cis* importants à l'initiation de leur traduction, révélée par l'étude des extrémités non codantes de ces messagers. En effet, j'ai montré que, comme pour le messager d'H4, l'ARNm d'H3 ne nécessitait pas la présence de ses UTR pour être efficacement traduit et que les éléments en *cis* cruciaux à l'initiation de sa traduction

étaient donc localisés dans sa séquence codante. Cette forte ressemblance entre les deux messagers suggère donc que, comme pour l'ARNm d'H4, les éléments importants à l'initiation de la traduction du messenger d'H3 sont d'ordre structural. Cette hypothèse est étayée par la forte conservation de la séquence codante observée pour les ARNm d'histone. En effet, en plus d'être importante à la préservation d'éléments essentiels au métabolisme de ces ARNm (Marzluff et al., 2008), cette conservation reflète également une pression de sélection de la structure secondaire de l'ARNm sur sa séquence codante (Huynen et al., 1992). Bien que les séquences codantes des ARNm des histones H2A et H2B soient également très conservées, celles-ci ne sont pas suffisantes pour assurer une initiation efficace de leur traduction. Si des éléments structuraux importants à ce mécanisme existent au sein des séquences codantes de ces messagers, ils ne peuvent fonctionner correctement en l'absence des UTR. Par exemple, ces structures pourraient être plus stables en présence des extrémités non codantes. Par ailleurs, des différences de réactivité vis à vis de la délétion des UTR ont pu être observées au niveau de la traduction des ARNm d'H2A et H2B. En effet, l'ARNm d'H2A nécessite la présence d'au moins un de ses deux UTR pour être traduit, tandis que l'extrémité 5' non codante est cruciale à l'initiation de la traduction du messenger d'H2B.

Malgré les multiples différences observées entre les ARNm des deux groupes, des similarités ont également pu être mises en évidence lors des études portant sur la structure coiffe des messagers d'histones. En effet, comme cela avait déjà été constaté pour l'ARNm d'H4, l'initiation de la traduction des messagers d'H2A, H2B et H3 se fait par la voie coiffe dépendante, et nécessite donc le facteur eIF4E. De plus, mes résultats d'expériences suggèrent que l'affinité entre ce facteur et la coiffe des messagers d'histones est plus faible que celle impliquant la coiffe des messagers classiques. Une explication possible à cette observation serait que, pour les histones canoniques, la coiffe soit dissimulée dans la structure de leur messenger, ce qui renforcerait l'importance des éléments structuraux dans l'initiation de la traduction des messagers d'histones. Il serait donc intéressant d'étudier leur structure secondaire afin de confirmer ou d'infirmer cette

hypothèse. Par ailleurs, la sensibilité plus faible à l'analogue de coiffe de la traduction des ARNm du second groupe indique que, si l'hypothèse de la dissimulation de la structure coiffe était vérifiée, celle-ci serait moins importante pour les messagers d'H2A et H2B que pour ceux de H3 et H4.

Pour conclure, l'initiation de la traduction des ARNm de ces deux groupes se ferait par des mécanismes distincts, bien que partageant certaines particularités. De plus, au regard des différences constatées, il n'est pas avéré que le démarrage de la synthèse des histones H2A et H2B se fasse de manière similaire. En revanche, les résultats des expériences menées sur l'ARNm d'H3 sont très ressemblants avec ceux qui avaient été obtenus pour le messenger d'H4, ce qui semblent indiquer que les mécanismes impliqués pour initier la traduction de ces deux messagers soient très proches. L'initiation de la traduction de l'ARNm d'H4 étant atypique, j'ai approfondi les études portant sur la synthèse de l'histone H3 dans les chapitres suivants.

Chapitre 4

Etude fonctionnelle de la traduction de l'ARNm codant pour l'histone H3

4.1 Introduction

L'obtention de résultats similaires dans les expériences de traduction des ARNm des histones H3 et H4 (*cf. Chap. 3*), amène à penser que, comme pour le messager d'H4, l'initiation de la traduction de l'ARNm d'H3 se fait de façon non conventionnelle. Le modèle de l'initiation de la traduction de l'ARNm d'H4, proposé dans le chapitre 2, prévoit que ce mécanisme se fasse par l'assemblage du ribosome sur le messager à partir d'une fixation interne du facteur eIF4E sur des éléments structuraux présents au sein de la séquence codante. Dans un premier temps, j'ai donc cherché à savoir comment était recruté le ribosome lors de l'initiation de la traduction de l'ARNm d'H3. En particulier, j'ai voulu connaître son site de recrutement et savoir sous quelle forme il était fixé. Ensuite, j'ai recherché les facteurs protéiques mis en jeu lors de ce processus et j'ai cherché à localiser le site de fixation du facteur eIF4E.

4.2 Étude du mode de recrutement du ribosome sur l'ARNm de l'histone H3

4.2.1 Caractérisation des complexes ribosomiques sur l'ARNm de l'histone H3

4.2.1.1 Présentation de la problématique

Chez les eucaryotes, le ribosome peut être recruté sur les ARNm sous deux formes : à partir de deux sous-unités ribosomiques séparées ou directement sous forme d'un complexe de 80S préassemblé (Andreev et al., 2006). Dans cette étude, j'ai cherché à identifier le mode de recrutement employé par l'ARNm de l'histone H3.

Les très fortes ressemblances de ce messenger avec celui d'H4, mises en évidence dans le chapitre précédant, suggèrent que ces deux histones pourraient recruter le ribosome de la même façon, c'est à dire par un assemblage successif des deux sous-unités ribosomiques (Jaeger, 2005). Afin de vérifier cette hypothèse, il était nécessaire de mettre en évidence les complexes intermédiaires de formation de la particule ribosomique de 80S.

Par ailleurs, j'ai précédemment mis en évidence la capacité de l'ARNm de l'histone H3 délété de ses UTR à être correctement et efficacement traduit (*cf.* §3.4.3), ce qui a conduit à l'hypothèse que la séquence codante de ce messenger pourrait contenir des éléments importants et suffisants au recrutement du ribosome. Dans le but de vérifier cette théorie, il était important d'étudier et de comparer le mode de recrutement du ribosome sur les ARNm entiers et délétés de leurs extrémités non codantes. En effet, l'une des possibilités expliquant la synthèse efficace de l'histone H3 à partir de son ARNm dépourvu de ses UTR pourrait être une mise en œuvre d'un mode alternatif de recrutement du ribosome, qui compenserait l'absence de ses régions non codantes. Par

4.2 Étude du mode de recrutement du ribosome sur l'ARNm de l'histone H3

exemple, sur l'ARNm délété, le ribosome pourrait être recruté sous forme de particule de 80S préassemblée (comme cela peut être rencontré chez les ARN « *Leaderless* » (Andreev et al., 2006)), tandis que sur l'ARNm entier, il pourrait être recruté par la voie 48S. Pour répondre à cette question j'ai donc mené la même étude sur les ARNm tronqués.

4.2.1.2 Approche expérimentale utilisée

L'une des approches permettant la mise en évidence des complexes d'initiation sur les ARNm est la séparation et l'identification de ces complexes sur un gradient de sucrose. Le principe de cette technique repose, dans un premier temps, sur la formation des complexes ribosomiques tels que le 48S, le 80S ou des polysomes, en incubant l'ARNm dans le milieu traductionnel. Les complexes ainsi formés sur l'ARNm sont ensuite déposés sur le gradient de sucrose (dans le cas de l'histone H3, j'ai utilisé un gradient linéaire de 7 à 47% de sucrose), puis soumis à une ultracentrifugation dans le but de leur séparation. En effet, les particules ribosomiques de 80S et les polysomes ayant un coefficient de sédimentation plus grand que les complexes de 48S ou les ARNm libres, ils migrent plus rapidement vers les zones de densité en sucrose plus élevée. Enfin, les gradients de sucrose contenant des complexes ribosomiques ainsi séparés sont ensuite fractionnés en plusieurs échantillons, et la radioactivité de l'ARNm marqué est comptée en mode Cerenkov pour chaque fraction (*cf. Fig. 4.1*).

La formation d'un complexe ribosomique sur un ARNm est un processus dynamique. En effet, une fois que la petite sous-unité ribosomique est recrutée à l'extrémité 5', il s'ensuit aussitôt la reconnaissance du codon initiateur et la fixation de la grande sous-unité ribosomique 60S. Dès que le complexe 80S est formé, l'étape de l'élongation suit immédiatement, laissant la place pour le ribosome suivant, permettant la formation de polysomes. A la fin d'un cycle de traduction, une dissociation du ribosome en deux sous-unités peut également se produire. Ainsi, dans ces conditions,

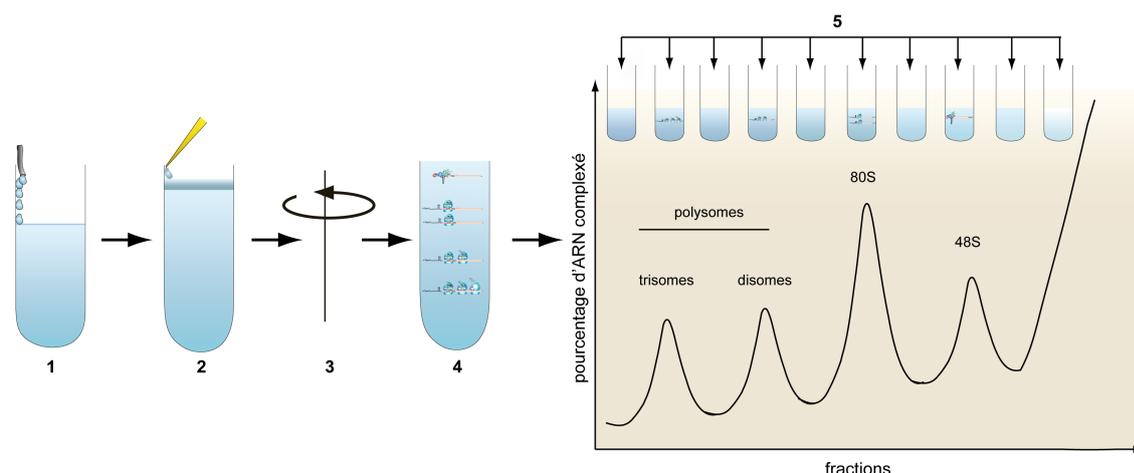


FIG. 4.1 – Représentation schématique des étapes de l'expérience de gradient de sucrose

(1) La première étape consiste en la préparation d'un gradient de sucrose linéaire de 7-47% (du haut vers le bas), grâce un mélange progressif de deux solutions de 7% et de 47%. (2) Dans un deuxième temps, une solution de réaction de la traduction est déposée sur le gradient de sucrose, et soumise à une ultracentrifugation (3). La solution finale en gradient de sucrose contenant les complexes ribosomiques séparés (4) est ensuite fractionnée en plusieurs échantillons (5) dont la radioactivité est ensuite mesurée en mode Cerenkov. Enfin, les valeurs obtenues sont représentées sur un graphique, dont les pics de radioactivité indiquent la présence de complexes ribosomiques, identifiés par rapport au numéro de la fraction (graphique).

il est très difficile d'isoler des complexes intermédiaires, tels que le complexe de 48S. Afin de contourner ce phénomène, plusieurs inhibiteurs sont utilisés pour stabiliser les complexes d'initiation à différentes étapes, ce qui permet ensuite leur identification. Dans le cas de l'ARNm de l'histone H3, j'ai ajouté deux sortes d'inhibiteurs au milieu traductionnel (RRL) (*cf. Fig. 4.2*). Le premier est la cycloheximide qui permet la visualisation du complexe 80S. Cet antibiotique n'interfère pas avec la formation de la particule ribosomique 80S, mais son action principale est de bloquer l'étape de l'élongation, et plus précisément la translocation du ribosome vers le codon suivant (Wilson et al., 2000)(Pestova et al., 1996). Le second inhibiteur est un analogue non hydrolysable du GTP (GMP-PNP). En effet, des études antérieures ont montré que le GTP était nécessaire à l'assemblage du ribosome. Son hydrolyse permet de libérer le Mét-ARNt^{Met} du facteur eIF2 dans le site P du ribosome et celle du facteur eIF5B, la grande sous-unité ribosomique 60S pouvant alors se fixer au complexe

4.2 Étude du mode de recrutement du ribosome sur l'ARNm de l'histone H3

48S pour former un ribosome actif de 80S (Pestova et al., 2000)(Wilson et al., 2000) (Unbehaun et al., 2004). La présence de GMP-PNP, fréquemment utilisée dans ce type d'expériences (Pestova et al., 2000), inhibe donc la fixation de la grande sous-unité ribosomique 60S au complexe de 48S, permettant ainsi de visualiser ces complexes intermédiaires.

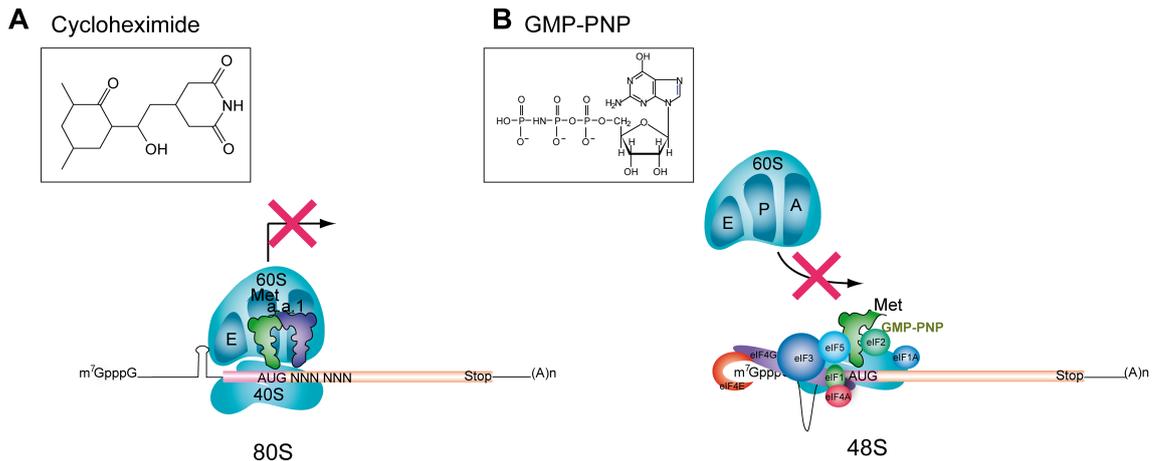


FIG. 4.2 – Blocage des complexes d'initiation aux inhibiteurs

Représentation des inhibiteurs utilisés : la cycloheximide (A) et l'analogue non hydrolysable du GTP (GMP-PNP) (B). L'action de ces molécules, consistant en l'inhibition des complexes ribosomiques au niveau de la particule 80S (A) et du complexe (48S), est indiquée par la croix pourpre. La formule chimique de la cycloheximide et du GMP-PNP est encadrée.

4.2.1.3 Résultats et discussions

Lors de mes expériences de gradient de sucrose en absence d'inhibiteur, plusieurs pics de radioactivité correspondant aux complexes d'initiations formés sur les messagers sont visibles (*cf.* Fig. 4.3-A). Pour les ARNm entiers, on constate la formation de particules 80S (fraction n°20) et de polysomes (disomes et trisomes, fraction n°16 et 18 respectivement). Dans le cas des ARNm tronqués de leurs UTR, seul un pic correspondant au 80S a été observé, quoiqu'un léger épaulement de ce pic (fraction n°19) pourrait suggérer la présence d'un second ribosome. Dans le milieu contenant de la cycloheximide, qui bloque l'étape d'élongation et permet

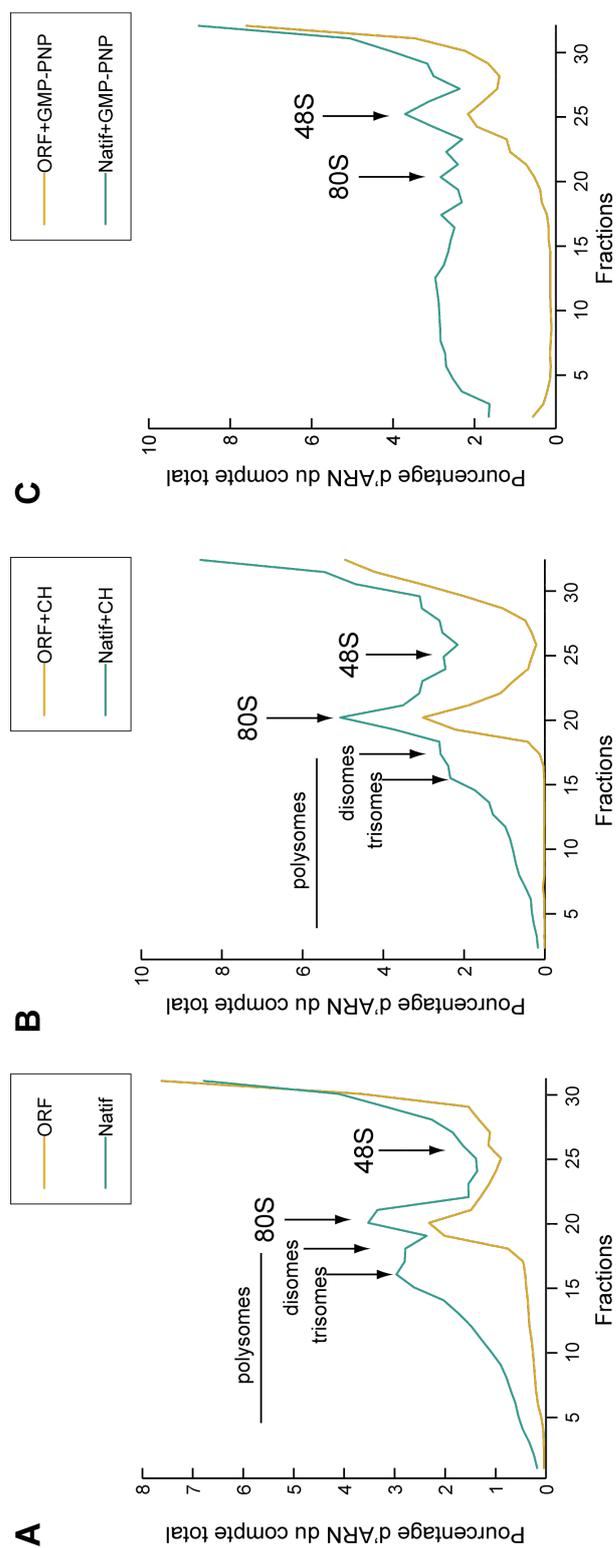


FIG. 4.3 – Séparation des complexes d'initiation formés sur l'ARNm d'H3 en absence ou en présence d'inhibiteur

4.2 Étude du mode de recrutement du ribosome sur l'ARNm de l'histone H3

FIG. 4.3 – Séparation des complexes d'initiation formés sur l'ARNm d'H3 en absence ou en présence d'inhibiteur

Résultats des expériences de gradient de sucrose des complexes non bloqués (A) ou bloqués par cycloheximide (CH) (B) ou par le GMP-PNP (C) sur l'ARNm de l'histone H3 entier (courbe verte) et délété des extrémités non codantes (courbe jaune). 200 000 cpm d'ARNm correspondant, marqué en 3' au [³²P]-pCp, sont incubés dans 50% [vol/vol] de RRL, en présence de 1 mg/ml de cycloheximide (B) ou de 2mM de GMP-PNP (C). Les complexes formés sont séparés sur un gradient de sucrose 7-47% grâce à l'ultracentrifugation, puis fractionnés. Les pics de radioactivité correspondant aux complexes ribosomiques de 48S, 80S et des polysomes sont indiqués par des flèches.

ainsi l'accumulation de monosomes (Wang et al., 2010), des résultats similaires ont été obtenus (*cf. Fig. 4.3-B*). Toutefois, en présence de cet inhibiteur, le pourcentage de polysomes diminue considérablement au profit d'ARNm ne fixant qu'une seule particule de 80S. Ce constat suggère ainsi que les ribosomes de 80S bloqués par cet inhibiteur pourraient empêcher la fixation des ribosomes suivants. Cette inhibition du recrutement de ribosomes supplémentaires pourrait s'expliquer, par exemple, par un encombrement stérique du premier ribosome sur le site de fixation des complexes d'initiation.

Il est admis que dans des conditions optimales et constantes du milieu réactionnel, l'efficacité de recrutement du ribosome reflète généralement l'efficacité de la traduction d'un ARNm (Melamed et al., 2009). Si l'on compare le rapport entre la quantité d'ARNm délétés fixant un seul ribosome (pic de 80S) à celle des ARNm entiers pour la même fraction, on constate qu'il est d'environ 65% dans ce milieu en présence et en absence de cycloheximide. Ce rapport est effectivement très proche de celui de l'efficacité de traduction entre ces deux ARNm qui est de 70% (*cf. §3.4.3*). Toutefois, si l'on prend en compte les polysomes recrutés par les ARNm, ce rapport n'est plus équivalent. En effet, alors que des disomes et trisomes ont été observés sur les ARNm entiers, les messagers tronqués ne semblent pas capables de recruter ou conserver plusieurs ribosomes. Deux hypothèses peuvent expliquer cette différence.

La première est que les UTR jouent un rôle dans la stabilisation des polysomes

sur le messager de l'histone H3. En effet, il est possible de concevoir qu'au cours des expériences que j'ai effectuées, les ribosomes fixés à l'ARNm délété seraient assujettis à une dissociation plus facile par rapport aux ARNm entiers (notamment au moment de la centrifugation). On peut donc s'attendre à ce que les quantités de disomes et trisomes recrutés sur les ARNm délétés, mais dissociés avant d'avoir pu être mesurés représentent également $\sim 70\%$ de celles observées pour les ARNm entiers. Toutefois, cette hypothèse peut être remise en question si la stabilité des complexes d'initiation 80S, observée pour les ARNm classiques (Melamed et al., 2009), est vérifiée dans le cas des ARNm d'histone H3 dépourvus de leurs UTR.

La seconde hypothèse est que les UTR influencent la capacité de l'ARNm à recruter des ribosomes. Cette difficulté pour l'ARNm délété à recruter des ribosomes expliquerait à la fois pourquoi il ne présente pas ou peu de polysomes et pourquoi il recrute moins de 80S que l'ARNm entier. Toutefois, comme l'on constate que le rapport entre le nombre de monosomes recrutés par les deux types d'ARNm est déjà équivalent à celui de leur efficacité de traduction, cela pose la question de l'activité des polysomes. En effet, selon cette hypothèse, il semblerait que la fixation de ribosomes supplémentaires sur un ARNm d'H3 entier pourrait ralentir ou rendre inactifs les polysomes ainsi formés.

Enfin, dans le milieu contenant du GMP-PNP, j'ai mis en évidence une accumulation de complexes de 48S (fraction n°25) au détriment de 80S, pour les ARNm entiers et délétés de leurs UTR (*cf. Fig. 4.3-C*), montrant l'inhibition de la fixation de la grande sous-unité ribosomique 60S au complexe 48S. Dans ce milieu de traduction, le rapport entre la hauteur des pics de 48S pour les ARNm entiers et délétés de leur UTR est également équivalent à celui de l'efficacité de traduction mesurée au chapitre précédant pour ces mêmes ARNm. Ces résultats suggèrent donc que la voie principale de recrutement du ribosome pour ces deux types de messager consiste en l'assemblage successif des deux sous-unités ribosomiques sur l'ARNm, et non par la

4.2 Étude du mode de recrutement du ribosome sur l'ARNm de l'histone H3

fixation d'une particule de 80S déjà préassemblée, comme cela a été observé pour les ARNm « *leaderless* » (Andreev et al., 2006).

En conclusion, le recrutement du ribosome sur le messager d'H3 par l'assemblage de ses deux sous-unités rappelle les résultats des études menées sur l'ARNm d'H4. L'absence d'un mécanisme alternatif de recrutement du ribosome pour les ARNm tronqués de leurs UTR conforte l'hypothèse que les éléments importants à la régulation de l'initiation de la traduction de l'ARNm d'H3 sont situés dans la séquence codante de ce messager. Enfin, l'absence de polysomes sur les ARNm tronqués de leur UTR, associé avec la corrélation entre l'efficacité du recrutement des 80S et l'efficacité de la traduction pour les ARNm entiers d'H3 et délétés, posent la question de l'activité des polysomes présents sur les ARNm entiers ou de leurs stabilité sur les messagers ne possédant pas d'UTR. Ce type d'expérience n'ayant pas été mené sur l'ARNm d'H4 privé de ces UTR, il n'est actuellement pas possible de procéder à une comparaison des résultats entre les messagers des deux histones en vue d'approfondir ces questions.

4.2.2 Localisation du complexe initiateur formé sur l'ARNm de l'histone H3

4.2.2.1 Présentation de la problématique

Les expériences de gradient de sucrose présentées dans la section précédente m'ont permis de mettre en évidence que le ribosome était recruté sur l'ARNm de l'histone H3 par l'assemblage de ses deux sous-unités. Cependant, le site d'assemblage de ces complexes d'initiation restait non déterminé. Les ARNm classiques recrutent la petite sous-unité ribosomique sur la structure coiffe, et l'assemblage du complexe 80S se fait sur le premier codon AUG initiateur, localisé de façon optimal à une cinquantaine de nucléotides en aval de la coiffe (Chappell et al., 2006). Les études précédemment menées sur l'ARNm de l'histone H4 ont montré que l'assemblage du ribosome s'opérait

également sur le premier codon AUG de ce messager en dépit d'une région 5' non codante bien plus courte (9 nt), et ceci par un mécanisme différent de celui employé par les ARNm classiques [résultats non publiés]. Le messager de l'histone H3 possède une extrémité 5' non codante de 35nt, et les études précédentes ont montré plusieurs similitudes entre les ARNm d'H3 et H4. J'ai donc cherché à savoir si comme pour le messager d'H4, l'ARNm d'H3 assemblait également le ribosome sur son premier codon AUG malgré un 5' UTR de longueur inférieure à la taille optimale. Ainsi, comme pour les études précédentes, j'ai mené mes expériences en parallèle sur les ARNm d'H3 comprenant ou non leurs extrémités non codantes, afin de mettre en évidence une éventuelle différence dans le mécanisme impliqué pour ces deux types d'ARNm.

4.2.2.2 Approche expérimentale utilisée

L'une des approches permettant la mise en évidence du site de formation des complexes 48S et 80S est l'expérience de « *toe-print* » du ribosome, qui consiste en un arrêt de la transcription inverse de l'ARNm en ADNc, par ces complexes d'initiation de la traduction. Les détails expérimentaux de cette technique sont décrits dans la partie §A.7.

En résumé, les expériences de « *toe-print* » du ribosome s'effectuent en deux étapes. Elles commencent par la formation des complexes d'initiation sur un ARNm dans un milieu traductionnel, en absence ou en présence d'inhibiteurs. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs peut être nécessaire dans le but de figer les complexes ribosomiques au stade de 48S (utilisation du GMP-PNP) ou de 80S (utilisation de la cycloheximide). Après cette étape de fixation des ribosomes sur l'ARNm, le milieu réactionnel est soumis à une ultracentrifugation à 100 000×g pendant 1h au total, permettant de séparer les complexes ribosomiques des protéines fixées par des interactions non spécifiques sur l'ARNm.

Dans un deuxième temps, les complexes ribosomiques ainsi purifiés (culot de

4.2 Étude du mode de recrutement du ribosome sur l'ARNm de l'histone H3

l'ultracentrifugation) sont ensuite soumis à une transcription inverse à partir d'un oligonucléotide marqué en 5' et hybridé ~100 nucléotides en aval du codon initiateur présumé. Cette réaction est effectuée en parallèle d'un contrôle, constitué du surnageant de l'ultracentrifugation. La transcription inverse s'arrête lorsque la rétro-transcriptase rencontre les complexes d'initiation de 48S ou 80S, résultant en la production d'un ADNc plus court par rapport à une extension d'amorce sur un ARNm libre. Il a été montré qu'un arrêt spécifique de la rétro-transcriptase de l'AMV, par des complexes de 48S et de 80S, est retrouvé aux positions +15 à +17 nucléotides en aval du codon initiateur sur lequel se produit l'assemblage (+1 étant le résidu A de l'AUG) (cf. Fig. 4.4). Enfin, les produits de la transcription inverse sont ensuite révélés sur un gel de polyacrylamide dénaturant et comparés au séquençage de l'ARN obtenu avec la même amorce (Pestova et al., 1998).

4.2.2.3 Résultats et discussions

Les résultats des expériences de « *toe-print* » montrent un arrêt de la rétro-transcriptase AMV à la position +17 (+1 étant le résidu A₃₇ de l'AUG initiateur), correspondant au nucléotide A n°53 dans le cas de l'ARNm entier (cf. Fig. 4.5-A, pistes 2 et 4), et n°17 dans le cas de l'ARNm délété de ses extrémités non codantes (cf. Fig. 4.5-B, pistes 2, 4 et 6). Il est important de noter que le messenger d'H3 de contrôle, non incubé dans le milieu réactionnel constitué de RRL (cf. Fig. 4.5-A et -B, piste 1), ne présente pas de bande à la position +17, montrant que les produits d'arrêt de la rétro-transcriptase correspondent bien aux « *toe-print* » de complexes d'initiation 48S et 80S, et non à un arrêt non spécifique de l'AMV à cette position. Les résultats montrent également que les bandes correspondant à ce « *toe-print* » sont de plus forte intensité lorsque cette expérience est effectuée en présence d'inhibiteurs (cf. Fig. 4.5-A et -B, piste 4 pour la cycloheximide ; piste 6 -B pour le GMP-PNP), reflétant une accumulation des complexes ribosomiques bloqués sur le site de démarrage. En effet, les bandes

4.2 Étude du mode de recrutement du ribosome sur l'ARNm de l'histone H3

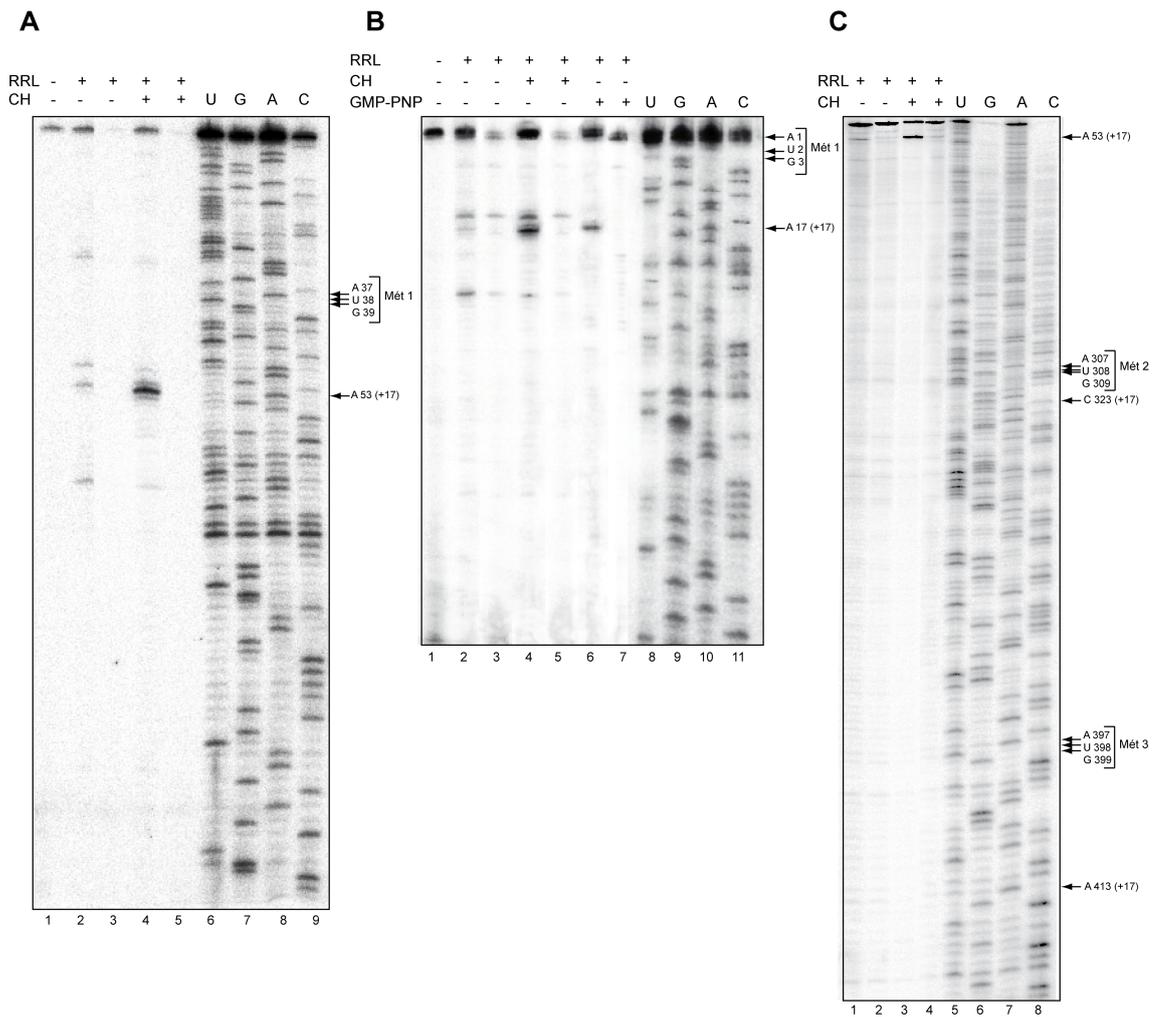


FIG. 4.5 – Localisation des complexes d'initiation formés sur l'ARNm d'H3

Trois gels représentatifs des expériences de « *toe-print* » des complexes d'initiation de la traduction sur les ARNm de l'histone H3 entiers (A) ou délétés de leurs extrémités non codantes (B). 250nM d'ARNm ont été incubés dans 50% [vol/vol] de RRL en présence de 1mg/ml de cycloheximide (CH) ou de 2mM de GMP-PNP, puis soumis à une ultracentrifugation de 100 000×g pendant 1h au total. Les culots (pistes 1, 2, 4 -A; pistes 1, 2, 4, 6 -B; et pistes 1 et 3 -C) et les surnageants représentant le contrôle (pistes 3 et 5 -A; pistes 3, 5 et 7 -B; et pistes 2 et 4 -C) sont soumis à une transcription inverse à l'AMV à partir d'une amorce marquée en 5' au [γ -³²P] ATP, situé 90 nt en aval du premier codon AUG (Mét1, -A et -B) ou 72 nt en aval du troisième codon AUG (Mét 3, -C). Un séquençage de l'ARNm (UGAC) est obtenu en parallèle avec la même amorce radioactive. Les arrêts spécifiques de l'AMV au niveau du résidu A (+17) et ceux attendus à partir des méthionines internes sont indiqués par des flèches. La position des trois méthionines (Mét1, Mét2 et Mét3) est montrée.

sur l'AUG suivant (Kozak, 1991a). J'ai donc procédé à la recherche de « *toe-print* » sur le reste du messager d'H3 et notamment sur ses deux autres codons AUG, qui sont localisés uniquement dans la première phase de lecture, aux positions n°307 et 397. Les

résultats de ces expériences, menées sur les ARNm entiers et tronqués de leurs UTR, montrent l'absence d'arrêt de la transcription inverse, attendu 17 nucléotides en aval de ces codons AUG internes, correspondant aux nucléotides C₃₂₃ et A₄₁₃ (cf. Fig. 4.5-C). Ainsi, la présence d'un « *toe-print* » uniquement sur le premier codon AUG initiateur montre que, contrairement à ce qui est observé pour les messagers classiques, il ne se produit pas de « *leaky scanning* » sur l'ARNm d'H3 en absence de ses UTR. Ce constat corrobore également les résultats d'expériences de traduction que j'ai obtenus précédemment, pour lesquels la délétion des UTR de l'ARNm de l'histone H3 ne génère pas de produits de plus petite taille et n'interfère pas sévèrement avec l'efficacité de la traduction de ce messenger (cf. §3.4.3).

En conclusion, l'assemblage du ribosome sur le premier codon AUG initiateur, indépendamment de la présence des UTR, montre que, contrairement à ce qui est connu pour les ARNm conventionnels, les régions non codantes de l'ARNm d'H3 n'influencent pas le site d'assemblage du ribosome. Il est donc très tentant d'émettre l'hypothèse que parmi les éléments localisés à l'intérieur de la séquence codante et permettant une traduction efficace même en absence des UTR, un certain nombre auraient pour rôle de favoriser le démarrage de la traduction sur le premier codon initiateur. Par ailleurs, l'absence de « *leaky scanning* » observée pour le messenger d'H3 rappelle des interprétations similaires pour l'ARNm d'H4 suite à des expériences de déplacement du codon AUG initiateur (Jaeger, 2005), ce qui renforce l'hypothèse que ces deux messagers emploieraient des mécanismes similaires pour initier leur traduction.

4.3 Étude des éléments agissant en trans dans la traduction de l'ARNm d'H3

Les mécanismes complexes relatifs aux ARNm, tels que l'initiation de leur traduction, subissent une régulation due à des éléments situés en *cis* de ces messagers, mais également à des facteurs protéiques agissant en *trans*. Ainsi, dans la seconde partie de ce chapitre, je me suis focalisée sur l'étude de ces éléments dans le processus du démarrage de la traduction du messenger d'H3.

Comme on l'a vu précédemment, de fortes similarités ont été observées entre l'initiation de la traduction de l'ARNm de l'histone H3 et celle du messenger d'H4, pour laquelle le rôle du complexe de la coiffe eIF4F a été clairement établi. C'est pourquoi mon attention s'est portée sur ce complexe et plus particulièrement sur deux de ses composants essentiels que sont les facteurs eIF4G et eIF4E.

4.3.1 Étude du facteur eIF4G et de son implication dans la traduction de l'ARNm de l'histone H3

4.3.1.1 Présentation de la problématique

eIF4G est un facteur d'échafaudage, dont le rôle est d'orchestrer les interactions se produisant à proximité de la coiffe des ARNm cellulaires. Il peut agir à différents niveaux dans l'initiation de la traduction des ARNm classiques, aussi bien que de certains ARN viraux possédant un IRES, aboutissant au recrutement du ribosome et à l'augmentation de l'efficacité de la traduction (Jackson et al., 2010). En effet, dans le cas de l'initiation de la traduction « *coiffe-dépendante* », son interaction avec les facteurs eIF4E et eIF3 permet le positionnement du complexe 43S sur l'ARNm (*cf. Fig. 4.6-A*).

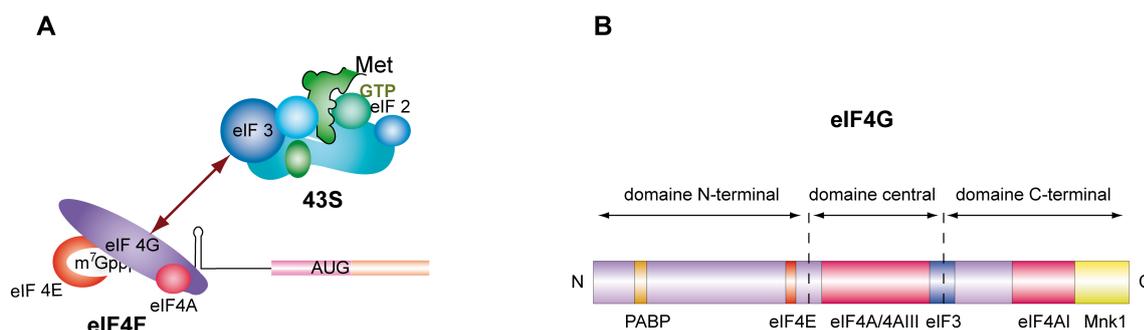


FIG. 4.6 – Rôle du facteur eIF4G dans l'initiation de la traduction conventionnelle

(A) Le facteur eIF4G, faisant partie du complexe de la coiffe (eIF4F), assure le recrutement du complexe 43S à l'extrémité 5' d'ARNm conventionnel, via son interaction avec le facteur eIF3 (indiquée par une double flèche). (B) Un schéma présentant les trois domaines du facteur eIF4G, délimités par des pointillés. Les sites d'interaction avec d'autres protéines (PABP, eIF4E, eIF4A, eIF3 et Mnk1) sont indiqués par des couleurs différentes (respectivement : orange ; rouge ; pourpre ; bleu et jaune).

De plus, il a été montré que son interaction avec le facteur eIF4E augmentait l'affinité de ce dernier pour la coiffe des ARNm, favorisant ainsi le recrutement du ribosome. Il est également apte à interagir avec la protéine Mnk1 « *MAP kinase-activated protein kinase* », dont le rôle, lorsqu'elle est fixée au facteur eIF4G, est d'activer le facteur eIF4E via sa phosphorylation (*cf. Fig. 4.6-B*) (Bellsollell et al., 2006). De plus, il a également été montré qu'il était capable d'interagir avec la protéine PABP, fixée sur les résidus d'adénosines de la queue poly(A) à l'extrémité 3' de l'ARNm, circularisant le messager et favorisant ainsi le recyclage du ribosome du codon de terminaison vers le codon d'initiation, ce qui augmente l'efficacité de la traduction (*cf. Fig. 4.6-B*). Ce rôle du facteur dans la circularisation des ARNm a également été proposé par Marzluff pour les messagers d'histones, où eIF4G interagirait par l'intermédiaire de la protéine SLIP-1 avec la protéine SLBP, fixée sur la tige boucle à l'extrémité 3' de ce messager (Marzluff et al., 2008). Comme mentionné ci-dessus, ce facteur intervient également dans le recrutement du ribosome sur les ARN des picornavirus, et deux tiers de ce facteur (correspondant aux domaines central et C-terminal) se révèlent suffisants pour assurer une traduction de ces ARNm. Précédemment, j'ai montré que la synthèse de l'histone H3 était inhibée par la présence d'analogues de la coiffe, indiquant que la synthèse de cette histone nécessitait le

4.3 Étude des éléments agissant en trans dans la traduction de l'ARNm d'H3

facteur de la coiffe eIF4E (*cf.* §3.5.3). Cette importance du facteur eIF4E, appartenant au complexe eIF4F, suggèrent que ce dernier pourrait également être impliqué dans l'initiation de la traduction de l'ARNm de l'histone H3. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai réalisé des expériences visant à mettre en évidence son importance dans la synthèse de l'histone H3.

4.3.1.2 Approche expérimentale utilisée

L'une des approches vérifiant l'importance du facteur eIF4G et son rôle dans le mécanisme de l'initiation de la traduction est l'inhibition de la traduction par interférence sur les interactions se produisant entre ce facteur et plusieurs de ses partenaires. Les études antérieures ont montré que ces interactions peuvent se produire indépendamment, via les trois domaines du facteur eIF4G. Ce sont les domaines amino-terminal (N-terminal), central et carboxy-terminal (C-terminal), correspondant respectivement aux positions des acides aminés 1-164 ; 675-1079 et 1080-1600. Le rôle du domaine N-terminal est d'interagir avec le facteur eIF4E et la protéine PABP, alors que le domaine central est impliqué dans les interactions avec le facteur eIF3 et eIF4A (Korneeva et al., 2000)(Lorsch and Dever, 2010)(Korneeva et al., 2001). De plus, il a été montré que ce domaine central possédait également une séquence riche en arginine capable d'interagir avec un ARNm (Lomakin et al., 2000)(Marcotrigiano et al., 2001). Concernant le domaine C-terminal, son interaction avec eIF4A et Mnk1 a été rapportée (*cf. Fig. 4.6-B*) (Bellolell et al., 2006).

Connaissant le rôle de ces domaines dans le mécanisme de l'initiation de la traduction, il est possible de les cibler séparément, afin de distinguer les interactions importantes dans le mécanisme de l'initiation de la traduction d'un ARNm. Ainsi, Miyakawa et al. ont développé trois aptamères (Apt.3, Apt.4 et Apt.5) qui inhibent les interactions spécifiques du facteur eIF4G dans la traduction « *coiffe-dépendante* ». Les aptamères Apt.3 et Apt.4 présentent les mêmes propriétés, car leurs fixations aux

domaines central et C-terminal du facteur eIF4G inhibent l'interaction avec le facteur eIF4A et eIF3. Dans le cas d'Apt.5, il a été montré que sa fixation se limite au domaine central du facteur eIF4G, sans empêcher l'interaction de ce facteur avec eIF4A et eIF3. Son action reste actuellement non élucidée, toutefois il a été montré que son effet inhibiteur était plus important que celui de l'aptamère Apt.4 (Miyakawa et al., 2006).

Pour étudier le rôle du facteur eIF4G dans le démarrage de la synthèse de l'histone H3, j'ai réalisé les expériences de traduction de son ARNm dans le RRL, en présence et en absence des aptamères Apt.4 et Apt.5, de façon analogue aux expériences de Miyakawa. Les produits de la traduction ont été révélés sur gel de polyacrylamide dénaturant grâce au marquage à la [³⁵S]-Méthionine. Les résultats obtenus pour l'histone H3 ont ensuite été comparés avec ceux de l'ARNm témoin, codant pour la luciférase et possédant un IRES de HCV dans son 5'UTR (HCV-Luc). En effet, il a été montré que ces aptamères n'avaient aucun effet négatif dans la traduction des ARNm possédant un IRES de HCV (Miyakawa et al., 2006).

4.3.1.3 Résultats et discussions

Les résultats de ces expériences ont montré que la synthèse *in vitro* de l'histone H3 était très sensible à la présence des aptamères Apt.4 et Apt.5. En effet, l'ajout de 4 μM de ces aptamères inhibe la traduction de son ARNm de 2,1 et 6,6 fois pour Apt.4 et Apt.5 respectivement (*cf. Fig. 4.7*). L'ARNm témoin (HCV-Luc), quant à lui, présente un effet inverse, car l'efficacité de sa traduction augmente de 1,5 et 1,9 fois en présence d'Apt.4 et d'Apt.5 respectivement (*cf. Fig. 4.7*). La traduction du témoin se déroulant conformément à nos attentes, compte tenu de son mode d'initiation de la traduction, valide les résultats que j'ai obtenus au cours de ces expériences.

Ainsi, le facteur eIF4G semble jouer un rôle important dans l'initiation de la traduction de l'ARNm de l'histone H3, et plus particulièrement au niveau des

4.3 Étude des éléments agissant en trans dans la traduction de l'ARNm d'H3

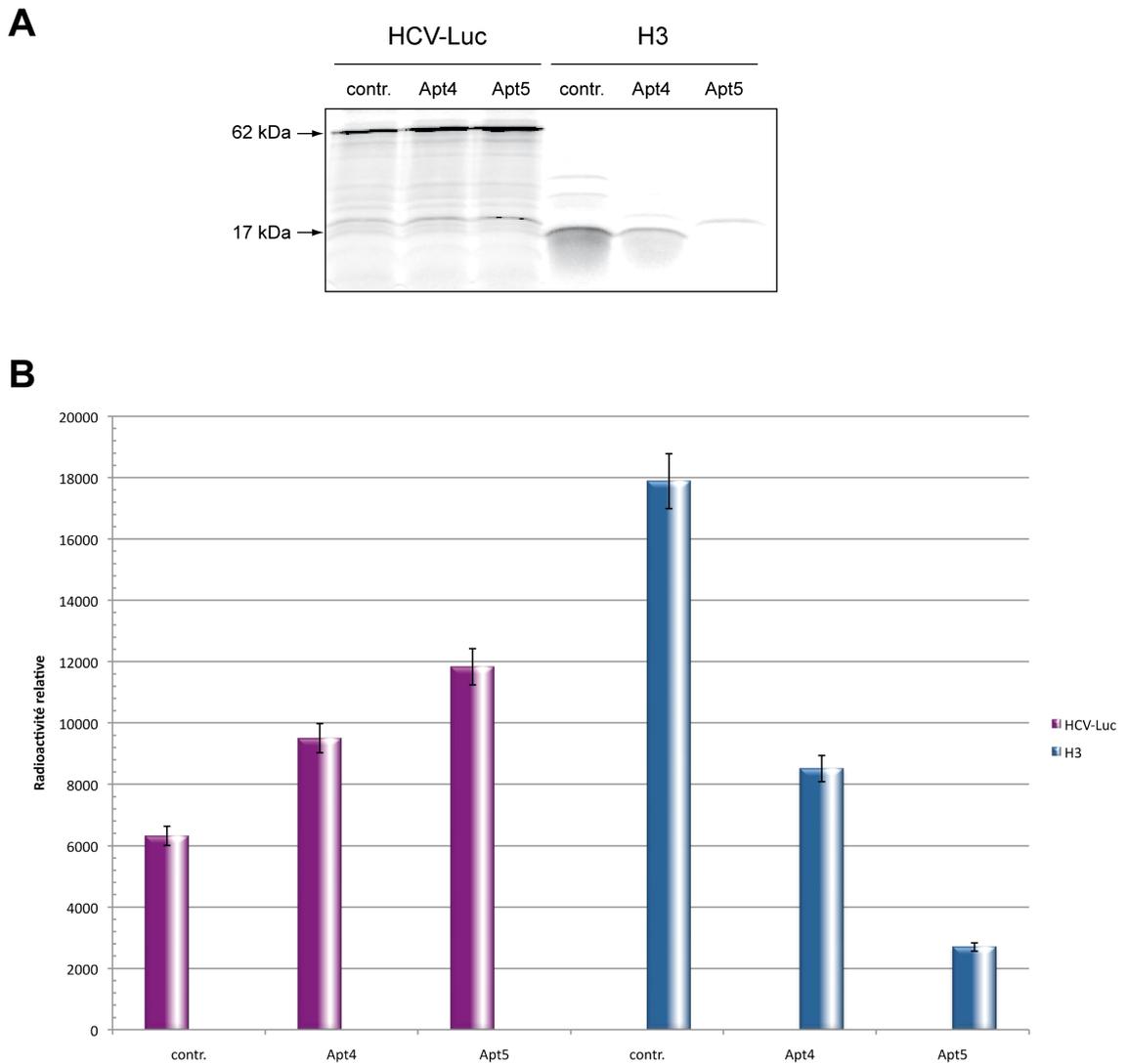


FIG. 4.7 – Étude du facteur eIF4G dans la traduction de l'ARNm d'H3

Traduction *in vitro* de l'ARNm de l'histone H3 en présence de deux aptamères (Apt4 et Apt5) dirigés contre le facteur eIF4G. (A) Un gel dénaturant représentatif des produits de traduction de 250nM d'ARNm de HCV-Luc ou de l'histone H3 dans 50% [vol/vol] de RRL, en absence (contr.) ou en présence de 4 μ M d'Apt4 et Apt5. Les produits de traduction des deux types d'ARN sont présentés par des flèches et leurs poids moléculaire. (B) Un histogramme résumant l'efficacité de la traduction des ARNm de HCV-Luc et de l'histone H3, exprimée en radioactivité relative d'ARN.

interactions avec au moins l'un de ses deux partenaires que sont eIF4A et eIF3, démontré par l'inhibition par Apt.4. Cette observation suggère que le recrutement de la petite sous unité ribosomique, pourrait faire intervenir les interactions entre le facteur eIF3 et eIF4G, habituellement observées lors d'une initiation classique

(Siridechadilok et al., 2005). De même l'interaction avec le facteur eIF4A pourrait suggérer une nécessité d'ouverture des régions structurées de cet ARN à un moment donné de la traduction du messenger de l'histone H3, comme cela été proposé dans le cas de l'ARNm d'H4 (Marintchev et al., 2009), [résultats non publiés]. Comme lors des études menées par Miyakawa, l'effet inhibiteur d'Apt.5 s'est révélé bien plus fort que celui constaté pour Apt.4. L'action d'Apt.5, encore peu connue, n'est pas de réduire l'affinité du complexe eIF4A-eIF4G-eIF3, ni d'inhiber l'interaction entre eIF4G et eIF4E. L'auteur propose donc deux possibilités pour expliquer l'inhibition de la traduction des ARNm classiques par cet aptamère. La première est qu'il empêcherait, directement ou non, eIF4G d'interagir avec un hypothétique autre facteur, impliqué dans la traduction coiffe dépendante, mais pas dans celle régie par les IRES. La seconde est qu'Apt.5 pourrait être chargé dans le complexe d'initiation avec eIF4G et ainsi empêcher la formation d'un complexe fonctionnel. Ainsi, les résultats obtenus dans cette expérience montrent que le processus ciblé par Apt.5 pour inhiber la traduction des ARNm classiques s'appliquerait également au messenger d'H3, ce qui concorde avec mes expériences montrant la coiffe dépendance de l'initiation de la traduction du messenger d'H3 (Miyakawa et al., 2006) (*cf.* §3.5.3). Toutefois, ces premiers résultats devront être confirmés par des expériences complémentaires, par exemple en réalisant des tests de restauration de l'activité de traduction par ajout du facteur eIF4G dans le milieu traductionnel (Miyakawa et al., 2006).

Pour conclure, ces résultats révèlent la nécessité du facteur eIF4G qui, associée à l'importance d'eIF4E (*cf.* §3.5.3), montrent que le complexe eIF4F joue un rôle crucial dans l'initiation de la traduction de l'ARNm d'H3. Par ailleurs, à l'issue de ces expériences aucun résultat ne remet en question l'hypothèse selon laquelle l'initiation de la traduction des ARNm d'H3 et H4 partagerait des mécanismes communs.

4.3.2 Recherche de sites internes de fixation du facteur eIF4E sur l'ARNm de l'histone H3

4.3.2.1 Présentation de la problématique

Le composant suivant du complexe de la coiffe eIF4F que j'ai étudié est le facteur eIF4E, qui est le point d'ancrage de ce complexe sur la coiffe. Les résultats de mes expériences d'inhibition de la traduction par ajout de coiffe analogue (*cf.* §3.5.3) ont en effet montré que ce facteur était crucial au démarrage de la synthèse l'histone H3. Toutefois, malgré la traduction efficace constatée pour le messager de cette histone, l'affinité entre eIF4E et la coiffe s'est révélée plus faible que dans le cas des ARNm classiques. De plus, l'ensemble des résultats que j'ai obtenus précédemment suggère que la coiffe à elle seule ne serait pas suffisante au démarrage de la traduction de l'ARNm d'H3 et que ce processus pourrait impliquer des éléments structuraux localisés dans ce messager. De nombreuses fonctions peuvent être attribuées à ces éléments internes. L'une d'entre elles pourrait consister en une interaction non conventionnelle avec certains facteurs protéiques, et notamment eIF4E. En effet, bien que ce facteur se fixe spécifiquement sur la coiffe, des études ont montré qu'il pouvait également agir de façon atypique. Par exemple, dans le cas de l'ARN viral de PEMV « *Pea Enation Mosaic Virus* », capable d'être traduit efficacement en l'absence de coiffe, il a été montré qu'il possédait un élément CITE appelé PTE « *PEMV RNA 2 cap independent translation element* » qui interagit de façon non conventionnelle avec le facteur eIF4E et permet ainsi le recrutement du ribosome à l'extrémité 5' de cet ARN (Wang et al., 2009). Dans le cas de l'ARNm de l'histone H4, un site interne de fixation du facteur de la coiffe, nommé H4-12 4E-SE-like, a été mis en évidence (*cf.* Chap. 2). La traduction de ce messager présentant de nombreuses similitudes avec celle de l'ARNm d'H3, j'ai cherché à savoir si celui-ci possédait également un site interne pour le facteur eIF4E,

pouvant favoriser le recrutement du ribosome et ainsi compenser l'affinité moins forte entre sa coiffe et ce facteur.

4.3.2.2 Approche expérimentale utilisée

L'une des approches permettant la mise en évidence des interactions se produisant entre la protéine eIF4E et l'ARNm de l'histone H3 est une expérience de retard de migration sur gel (ou EMSA pour « *Electrophoretic Mobility Shift Assay* »). Le principe de cette expérience tient dans la propriété qu'un ARN seul migre plus rapidement sur un gel natif que lorsqu'il est complexé à une protéine. Cette variation de vitesse de migration peut être suivie grâce au marquage radioactif de l'ARN (dans le cas de l'ARNm de l'histone H3, j'ai marqué celui-ci en 3' au [³²P]-pCp, §A.3.6.2).

Afin de mettre en évidence les interactions non conventionnelles entre les séquences internes de l'ARNm de l'histone H3 et le facteur de la coiffe eIF4E, j'ai effectué plusieurs expériences d'EMSA dans les conditions natives avec les ARNm coiffés ou non coiffés. Un ARN compétiteur (ARNt de levure) a été ajouté, dans le but de prévenir toute interaction non spécifique entre les deux partenaires étudiés (*cf.* §A.6.1).

4.3.2.3 Résultats et discussions

Dans un premier temps, il était nécessaire d'examiner le comportement du facteur eIF4E vis à vis des ARN coiffés et non coiffés de l'histone H3. Étant donné que le rôle classique de ce facteur est de reconnaître la coiffe, on s'attendrait à ce que les ARNm comportant la coiffe fixent mieux ce facteur que ceux dépourvus de cette structure en 5'. Toutefois, les résultats de ces expériences montrent le même profil de migration des ARNm coiffés aussi bien que de ceux non coiffés, en présence ou en absence de la protéine en question (*cf.* Fig. 4.8-A). Ce constat suggère donc que la coiffe de

4.3 Étude des éléments agissant en trans dans la traduction de l'ARNm d'H3

l'ARNm de l'histone H3 n'aurait pas d'influence significative sur l'interaction entre ce facteur eIF4E et le messenger de l'histone H3 et que les éléments localisés à l'intérieur de cet ARN seraient responsables de l'interaction avec cette protéine, ce qui rappelle les résultats de l'ARNm de l'histone H4 (cf. Chap. 2). Plusieurs concentrations de la protéine ont été testées et j'ai retenu 0,5 μ g du facteur eIF4E, estimé de déplacer 100% d'ARNm d'H3 radioactifs, coiffés et non coiffés, dans le milieu réactionnel (cf. Fig. 4.8-A). En parallèle de ces expériences, j'ai également effectué un contrôle, constitué d'un ARNm conventionnel non coiffé de la GFP, afin de voir si le facteur eIF4E se fixerait aussi bien sur ses séquences internes que sur celles de l'ARNm de l'histone H3. Les résultats de ces expériences ont montré qu'en présence ou en absence de la protéine en question, l'ARN témoin présente le même profil de migration, suggérant que les séquences internes du messenger conventionnel ne seraient pas capables de fixer le facteur eIF4E, contrairement à celui de l'histone H3 (cf. Fig. 4.8-B).

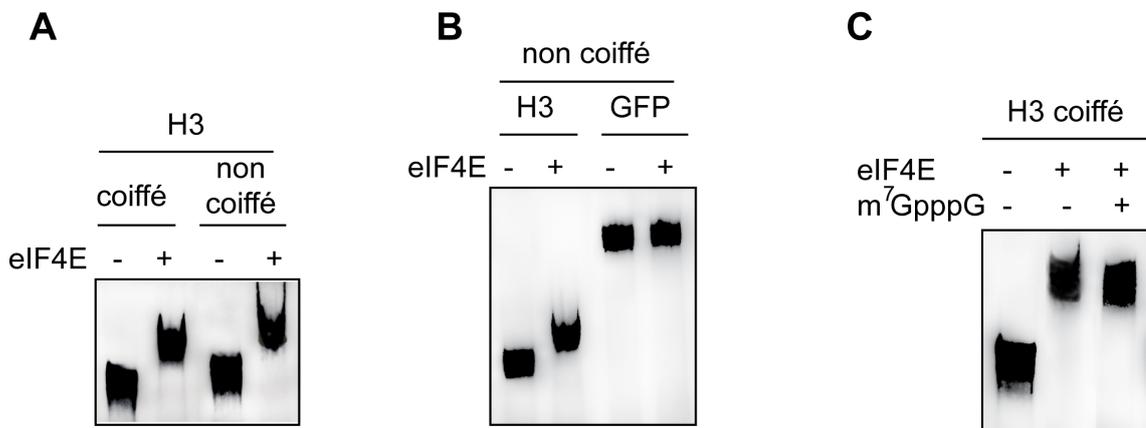


FIG. 4.8 – Trois gels représentatifs d'EMSA issus d'une étude des interactions entre le facteur eIF4E et l'ARNm de l'histone H3

25 000 cpm d'ARN ont été incubés dans les conditions natives en absence (-) ou en présence de 0,5 μ g de eIF4E (+); 60 μ M de coiffe analogue m⁷GpppG (+). (A) La mise en évidence d'un site interne d'ARNm d'H3 interagissant avec eIF4E. (B) Comparaison de la capacité de fixation d'eIF4E sur les ARNm non coiffés d'H3 et du témoin conventionnel (GFP). (C) Contrôle d'une fixation indépendante de la « structure-coiffe » du facteur eIF4E.

Dans le but de s'assurer d'une fixation de la protéine eIF4E indépendante de la coiffe, j'ai effectué des expériences supplémentaires en présence d'un analogue de la

coiffe. Ainsi, les résultats de ces tests ont montré que l'ajout de 60 μ M d'analogue de la coiffe ne perturbe pas l'interaction du facteur eIF4E avec l'ARNm de l'histone H3 coiffé et marqué en 3' au [³²P]-pCp (cf. Fig. 4.8-C), ce qui est en accord avec les résultats (décrits ci-dessus) suggérant un caractère non essentiel de la coiffe de cet ARN dans la fixation de cette protéine. Il semblerait également que les séquences internes de l'ARNm de l'histone H3 et l'analogue de la coiffe ne partagent pas le même site d'interaction sur le facteur eIF4E. Pourtant, j'ai montré précédemment qu'à la même concentration de cet inhibiteur l'efficacité de la traduction de cette histone chute de 95% (cf. §3.5.3). La raison de cet effet pourrait être que, comme dans le cas de l'histone H4 (cf. Chap. 2), la fixation du facteur eIF4E sur les séquences internes serait indépendante de la coiffe, mais que cette dernière jouerait un rôle crucial dans l'étape suivante, lors du mécanisme de démarrage de la traduction.

Au regard de ses résultats, comme cela avait été précédemment montré pour l'ARNm d'H4, il existe bien un ou plusieurs sites internes de fixation du facteur eIF4E sur le messenger d'H3. Les expériences d'EMSA qui avaient été menées sur les ARNm d'H4 successivement délétés en 5' et en 3' ont permis d'identifier un site minimal de fixation d'eIF4E, recouvrant la seconde moitié de ce messenger (cf. Fig. 2.1-B). J'ai donc utilisé la même approche pour rechercher la localisation d'une séquence minimale fixant ce facteur sur l'ARNm d'H3.

Ainsi, j'ai d'abord procédé à la synthèse de messagers d'H3 progressivement tronqués en 3', à partir de matrices obtenues par PCR à l'aide d'amorces appropriées (cf. §3.2). La fixation d'eIF4E sur ces ARNm marqués radioactivement a été testée à l'aide de la technique d'EMSA en présence de 0,5 μ g de ce facteur. A l'issue d'une première série de délétion, le plus petit ARNm (H3 Δ 3'-284) obtenu fixait toujours le facteur. En partant de celui-ci, j'ai donc progressivement supprimé l'extrémité 5', jusqu'à obtenir un fragment (a Δ 5'-205) ne fixant plus eIF4E (cf. Fig. 4.9-A, étape c). Ceci m'a permis de définir la borne 3' d'un domaine minimal de fixation de ce facteur sur l'ARNm d'H3. A partir de l'ARNm complet en 5' mais limité à cette borne en 3', j'ai procédé à une

4.3 Étude des éléments agissant en trans dans la traduction de l'ARNm d'H3

nouvelle série de délétions progressives en 5', de grain plus fin que les précédentes, afin d'identifier la borne 5' du domaine. Une fois celle-ci identifiée, j'ai effectué d'autres délétions pour valider sa position. Le domaine minimal de fixation du facteur eIF4E ainsi révélé en 5' de l'ARNm d'H3, couvrait les positions 70 à 135 et était localisé 33 nucléotides en aval du codon d'initiation.

Parallèlement à ces expériences, j'ai utilisé le procédé que je viens de décrire afin de chercher un domaine de fixation en 3' de l'ARNm (*cf. Fig. 4.9-B*). Ceci m'a permis d'identifier un second domaine minimal de fixation du facteur, à partir de la position 403 et comprenant donc le codon de terminaison et la séquence 3' non codante.

Après avoir déterminé ces deux domaines, j'ai constaté que la région comprise entre la borne 3' du premier domaine et la borne 5' du second fixait également le facteur. J'ai donc procédé à une nouvelle série d'expérience du même type sur cette région (*cf. Fig. 4.9-A*), ce qui m'a permis de révéler un troisième domaine minimal de fixation dans la partie centrale du messager, entre les positions 177 et 260.

Pour conclure, trois domaines minimaux de fixation d'eIF4E ont donc pu être identifiés au sein de l'ARNm d'H3 suggérant que, comme pour le messager d'H4, l'ARNm d'H3 peut recruter ce facteur de façon interne. Le fait que ces domaines soient disjoints, du point de vue de la séquence primaire, conduit à deux hypothèses. Soit ces domaines sont proches dans la structure tridimensionnelle de l'ARNm d'H3 et se fixent sur un site précis d'eIF4E, soit ils sont situés à des positions éloignées dans la structure et ciblent des régions différentes du facteur. Par ailleurs, pour être définitivement validés, ces trois domaines minimaux devront être synthétisés et il faudra montrer qu'ils sont effectivement capables de fixer eIF4E dans un test EMSA.

FIG. 4.9 – La mise en évidence de trois domaines internes de l'ARNm de l'histone H3 fixant le facteur de la coiffe eIF4E

La recherche d'une séquence minimale fixant eIF4E, dans la partie 5' (A); 3' (B); et centrale (C) du messenger non coiffé, a été effectuée grâce aux expériences d'EMSA. Parmi plusieurs constructions testées, seules quelques unes sont montrées. Chaque série d'expériences similaires (exemple, délétions successives de la région 3' à partir d'une sous-séquence d'H3 étudiée) est représentée par une ou des constructions clé dans l'établissement de ces domaines, et séparée par un trait en pointillé horizontal. Les domaines minimaux, fixant indépendamment le facteur eIF4E sont délimités par des traits en pointillés verticaux. Les noms des constructions sont indiqués à gauche de la figure, dont la nomenclature est établie selon : le nom du fragment à l'origine (H3 représente la séquence entière), délété en 5' ($\Delta 5'$) et/ou en 3' ($\Delta 3'$), suivi d'un chiffre représentant la taille de la partie délétée. Les gels des expériences d'EMSA en absence (-) ou en présence (+) de $0,5\mu\text{g}$ d'eIF4E sont montrés à droite de la figure pour chacune des constructions testées.

4.4 Conclusions

Au cours du chapitre 3 j'ai présenté mon étude de l'initiation de la traduction de trois ARNm d'histones, celle du messenger d'H3 présentait le plus de similarité avec celle de l'ARNm d'H4, dont le mode de fonctionnement est le mieux connu. Ainsi, au cours de ce chapitre j'ai approfondi l'étude de ce processus pour l'ARNm d'H3, en m'intéressant en particulier à son mode de recrutement du ribosome et à l'importance des facteurs de la coiffe. La plupart des résultats que j'ai obtenus au cours de ces travaux se sont révélés similaires à ceux qui avaient été obtenus lors de l'étude de l'initiation de la traduction de l'ARNm d'H4. De plus, si certains résultats n'ont pas pu être comparés avec ceux d'H4, faute d'expériences similaires sur son messenger, aucun résultat ne laisse supposer à une éventuelle différence dans les mécanismes impliqués dans l'initiation de la traduction de ces deux messagers. Ainsi, le recrutement du ribosome sur l'ARNm d'H3 se produirait par l'assemblage de ses deux sous-unités, directement sur le codon initiateur, et ce, même en l'absence des extrémités non codantes. Cette capacité à assembler le ribosome directement en aval de la structure coiffe, associée à une très forte efficacité de traduction, indiquerait un mécanisme non conventionnel faisant intervenir des éléments structuraux au sein de la séquence codante du messenger. Comme dans le cas de l'ARNm d'H4, j'ai pu montrer que, certains de ces éléments internes au messenger

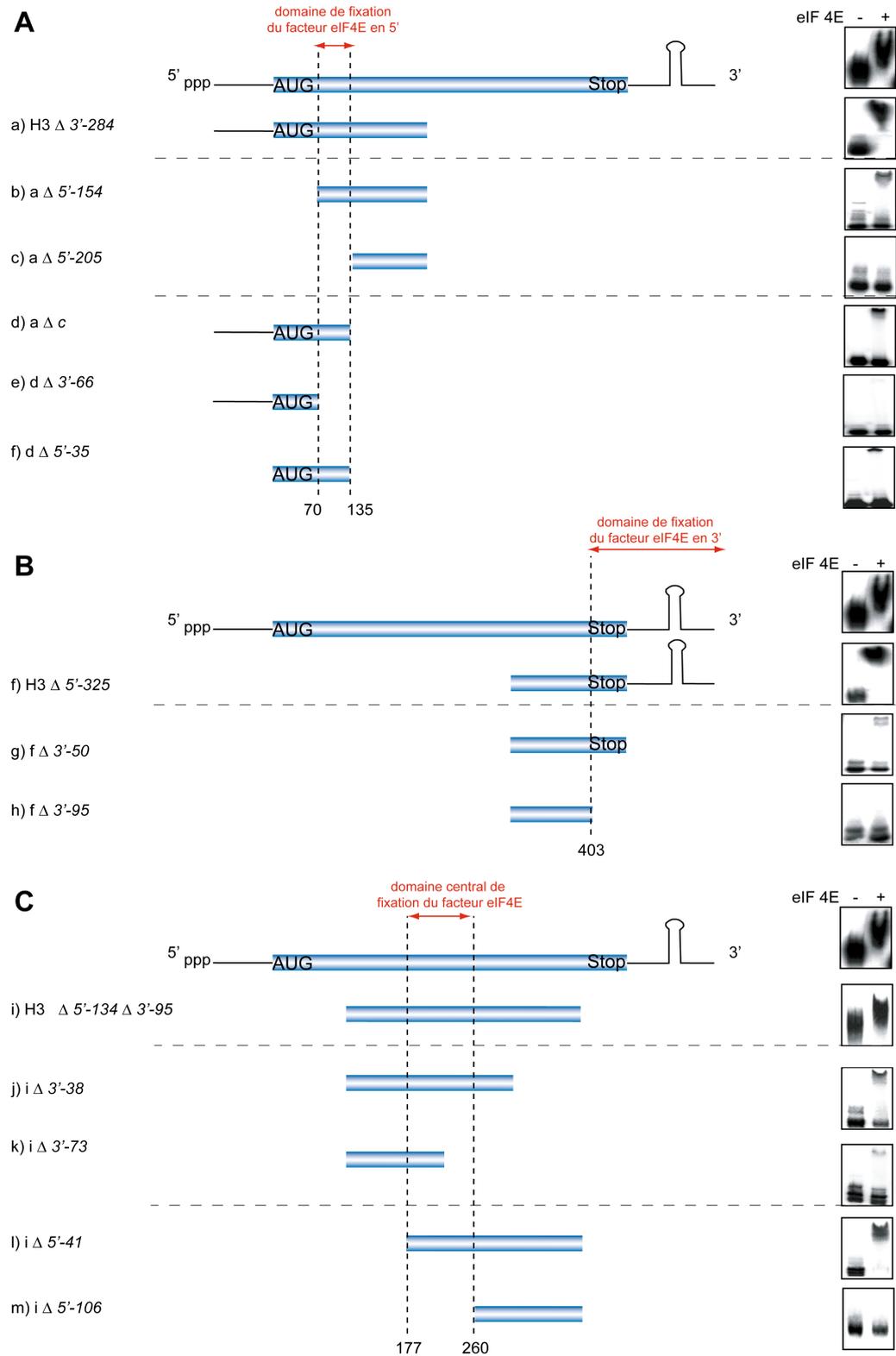


FIG. 4.9 – La mise en évidence de trois domaines internes de l'ARNm de l'histone H3 fixant le facteur de la coiffe eIF4E

CHAPITRE 4 : *Etude fonctionnelle de la traduction de l'ARNm codant pour l'histone H3*

d'H3 étaient capables de fixer le facteur eIF4E, et pourraient ainsi compenser la plus faible affinité de ce facteur pour la coiffe du messager d'H3 par rapport à celle des ARNm classiques. De plus, au cours de cette étude j'ai mis en évidence la nécessité du facteur eIF4G dans le démarrage de la synthèse de l'histone H3, comme cela avait déjà été montré dans le cas d'H4. Cette importance est vraisemblablement liée à l'interaction de ce facteur avec eIF4A, dont le rôle est de déplier les structures présentes dans l'extrémité 5' du messager et/ou à sa fixation avec eIF3 qui amène la petite sous-unité ribosomique. Ainsi, l'ensemble des résultats que j'ai obtenus dans ce chapitre coïncident avec le modèle d'initiation de la traduction proposé pour l'ARNm d'H4.

Chapitre 5

Etude structurale de l'ARNm de l'histone H3

5.1 Introduction

Les résultats de mes études, présentées au cours des chapitres 3 et 4, ont suggéré que la forte efficacité de traduction de l'ARNm de l'histone H3 pourrait être expliquée par l'existence d'un mécanisme non conventionnel de son initiation, faisant intervenir un certain nombre d'éléments structuraux localisés au sein de ce messager. Les études de séquences d'ARNm d'histones, réalisées par Huynen et al, appuient cette hypothèse en suggérant que la fonction remplie par ces ARN, en particulier au niveau de l'initiation de la traduction, exercerait une pression de sélection sur leurs structures secondaires (Huynen et al., 1992). En effet, le repliement des ARN joue souvent un rôle crucial dans la régulation de l'expression génétique, notamment pendant l'étape de la synthèse protéique (Cruz and Westhof, 2009)(Roberts and Holcik, 2009). Celui-ci est obtenu de façon hiérarchique, à partir d'un enchainement de nucléotides, appelé séquence primaire. Ces résidus interagissent deux à deux pour former les paires de bases Watson-Crick (A-U et G-C) et Wobble (G-U) composant les hélices (*cf. Fig. 5.1-A*).

Les duplexes ainsi obtenus forment à leur tour, avec les régions simples brins (boucles, renflements) (cf. Fig. 5.1-B), une topologie particulière appelée structure secondaire. Des interactions dites « *non canoniques* » (Leontis and Westhof, 2001) consolident ensuite cette conformation et permettent également d'unir des éléments distants du repliement secondaire afin de façonner la structure tridimensionnelle de l'ARN.

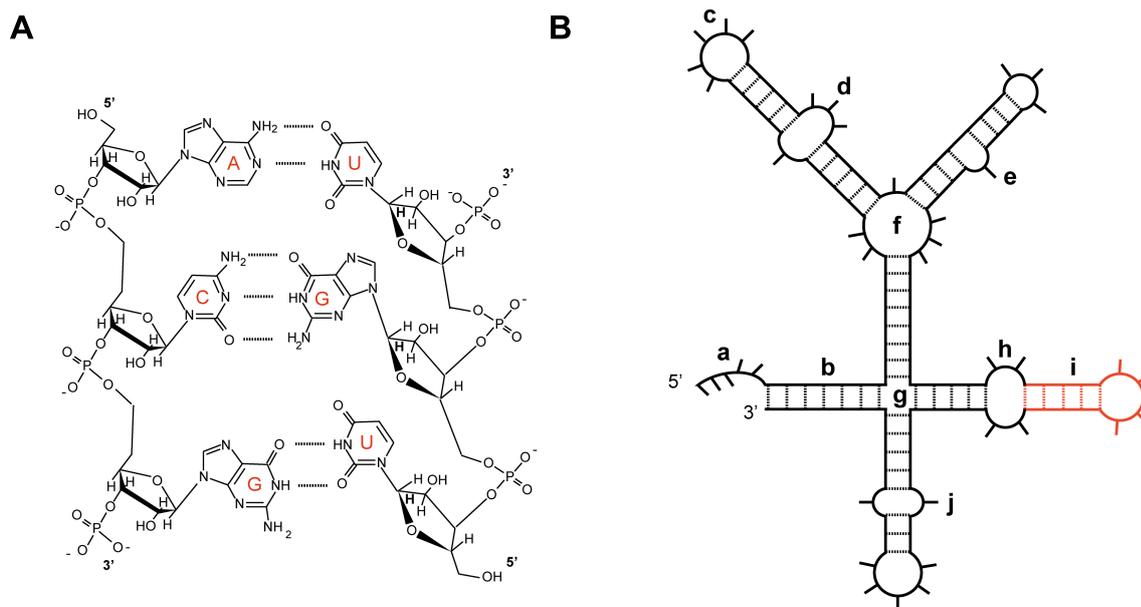


FIG. 5.1 – Représentation schématique de la structure secondaire d'un ARN

(A) Formation de duplexes grâce aux appariements Watson-Crick (A-U, C-G) et Wobble (G-U), indiqués en pointillé. La succession des nucléotides, montrant la structure primaire d'un ARN, est indiquée dans le sens 5' vers 3' par sa formule chimique. (B) Motifs structuraux couramment rencontrés dans le repliement en deux dimensions de l'ARN : a. simple brin (single strand); b. tige (stem); c. boucle terminale/apicale (loop); d. boucle interne asymétrique (asymmetric internal loop); e. renflement (bulge loop); f. jonction à trois hélices (three-way junction); g. jonction à quatre hélices (four-way junction); h. boucle interne symétrique (symmetric internal loop); i. tige boucle ou épingle à cheveux (hairpin); j. mésappariement (mismatch).

Pour la plupart des métazoaires, la structure primaire des ARNm des histones réplication-dépendants a été identifiée grâce aux séquençages de leurs gènes respectifs. Toutefois, aucune structure secondaire ni tertiaire n'a été identifiée pour les ARNm entiers, à l'exception de l'histone H4 de *Mus musculus*, dont le modèle de la structure secondaire, récemment proposé (Jaeger, 2005) est présenté en chapitre 2, concorde avec les hypothèses de Huynen.

5.2 Prédiction de la structure secondaire par l'approche bioinformatique

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'initiation de la traduction de l'ARNm de l'histone H3, il s'est donc révélé très important d'établir sa structure secondaire. Ce projet, que je présenterai dans ce chapitre, a constitué la partie la plus importante de mon travail de thèse. Ainsi, j'ai cherché à mettre en évidence les interactions qui constituent la structure de l'ARNm d'H3, à l'aide de deux approches complémentaires. Une méthode bioinformatique, permettant la prédiction de certains appariements à partir d'une étude de la structure primaire de ce messager, a été couplée à une méthode expérimentale, qui consistait à sonder l'ARN à l'aide des sondes spécifiques du simple et double brin. Les données que j'ai obtenues par ces deux approches m'ont ensuite servi dans la recherche du repliement en deux dimensions de l'ARNm de l'histone H3. Enfin, dans un deuxième volet de ce chapitre, j'ai utilisé la connaissance de cette structure secondaire afin de caractériser le site interne fixant le facteur eIF4E.

5.2 Prédiction de la structure secondaire par l'approche bioinformatique

5.2.1 Présentation de la problématique

Le principe de l'approche bioinformatique que j'ai utilisée est d'extraire de l'information structurale à partir de données de séquence. En particulier, il s'agit d'identifier, parmi les nucléotides d'un ARN, lesquels vont former des paires de bases Watson-Crick et Wobble. Pour cela, deux méthodes complémentaires peuvent être utilisées. La première est la comparaison des séquences d'une même famille à l'aide d'un alignement, permettant de faire apparaître de l'information structurale par la mise en évidence de mutations compensatoires survenues au fil de l'évolution. La seconde consiste à trouver, parmi l'ensemble des structures possibles pour une séquence, celles qui minimisent l'énergie libre ΔG° à une température donnée. Les outils les

plus utilisés dans ce but reposent sur les algorithmes de programmation dynamique, comme Mfold (Zuker, 2003) et RNAfold (Hofacker, 2003) qui parcourent l'ensemble des interactions possibles au sein d'une séquence afin de trouver celles participant à l'établissement de la structure optimale. La taille de l'ARN joue cependant un rôle majeur dans ces approches bioinformatiques. En effet, l'allongement de la séquence augmente le nombre de combinaisons de façon exponentielle, rendant la recherche des structures correctes très difficiles. Par exemple, pour l'ARNm de l'histone H3 de 497nt, Mfold doit parcourir un arbre de possibilités de 123 millions de structures contre 52 millions pour l'ARNm de l'histone H4 de 374nt. Ainsi, bien que Mfold parcourt un arbre de possibilités restreint, correspondant aux solutions biologiquement cohérentes, l'étude des ARN de grande taille nécessite l'application de multiples contraintes (Sankoff, 1985)(Jossinet et al., 2007).

La séquence d'ARNm dont j'ai cherché à établir la structure secondaire est celle issue du gène *Hist1h3b* de *Mus musculus* que j'ai utilisé comme modèle d'étude tout au long de ma thèse. Un alignement précédemment effectué entre cette séquence et d'autres gènes d'histone H3 de *Mus musculus* (Wang et al., 1996) a permis de mettre en évidence un net consensus pour les 411 nucléotides de la région traduite de leur ARNm, dont la partie centrale de 111 nucléotides (correspondant aux acides aminés 51-87) s'est révélée totalement invariante. Dans la séquence codante de ces messagers, quelques variations mineures ont toutefois été constatées, notamment celles qui conduisent à la synthèse des deux types d'histones H3 : H3.1 et H3.2 qui ne diffèrent que d'un seul acide aminé localisé à la position 96, correspondant à la sérine dans la protéine H3.2 et à la cystéine dans celle de H3.1 (cf. Fig. 5.2-A). Il a également été montré que ces séquences codantes sont riches en résidus G et C, de par leur importante fréquence à la troisième position du codon (Huynen et al., 1992). À l'inverse, les régions non traduites se sont révélées très différentes, tant au niveau de leur taille que de leur composition (cf. Fig. 5.2-B et -C). Seule une région de 26 nucléotides, retrouvée 19-32nt en aval

5.2 Prédiction de la structure secondaire par l'approche bioinformatique

du codon stop, formant la tige boucle reconnue par SLBP est restée particulièrement conservée au cours de l'évolution (cf. Fig. 5.2-C).

En plus de la différence dans le niveau de conservation entre les régions codantes et non codantes, l'étude de la structure primaire des ARNm des histones a montré que leurs séquences codantes contenaient un nombre équivalent de résidus G et C, contrairement à leurs régions non traduites. Ainsi, Huynen et al ont suggéré que ce rapport inhabituel de G/C, trouvé à l'intérieur des UTR, pourrait prévenir les interactions de ces régions avec la séquence codante (Huynen et al., 1992). Les UTR pourraient donc ne pas être impliqués dans le cœur de la structure de cet ARN. J'ai pris en compte cette hypothèse, dans la prédiction de la structure secondaire de l'ARNm de l'histone H3, en étudiant séparément les UTR et la région codante. Ce partitionnement de la structure en régions de plus petite taille permet par ailleurs aux algorithmes bioinformatiques de parcourir un espace de recherche plus restreint et donc d'être à la fois plus rapides et plus fiables.

5.2.2 Résultats et discussions

L'étude structurale de la région 5' non codante des ARNm de l'histone H3 a été effectuée sur les séquences de *Mus musculus* par l'intermédiaire du programme Mfold, accessible gratuitement sur le site <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi>. Ainsi, en raison d'une forte divergence des 5'UTR des ARNm codant pour l'histone H3, j'ai privilégié la recherche de la structure énergétiquement la plus stable, par rapport à d'autres approches, telles que la comparaison de séquences à partir de leur alignement. De plus, la petite taille de cette région, dont la moyenne est de 29nt, est tout à fait optimale pour ce programme de prédiction.

Les résultats de cette étude ont montré que toutes les séquences analysées étaient capables d'adopter une structure en tige boucle à leur extrémité 5', dans laquelle la

5.2 Prédiction de la structure secondaire par l'approche bioinformatique

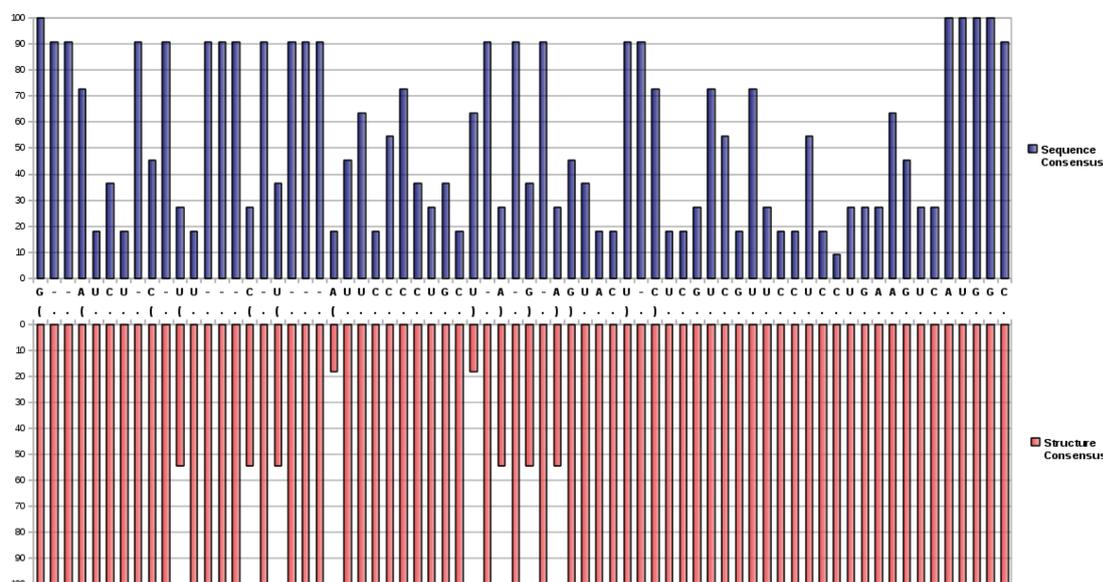
FIG. 5.2 – Comparaison de neuf séquences d'ADN génomique d'histones H3 du *Mus musculus*

(A) Alignement des parties codantes des ARNm. Les résidus identiques sont indiqués par un point et les différences sont indiquées par une lettre (A=adénine ; G=guanine ; C=cytosine et T=thymine). Les séquences consensus au niveau nucléotidique (en rouge) et protéique (en noir) sont indiquées en haut de l'alignement. (B) Représentation des séquences correspondant aux extrémités 5' des neuf gènes d'histones H3. Le site de démarrage de la transcription et les régions promotrices (TATAA box et CCAAT box) sont indiqués en gras. (C) Représentation des séquences correspondant aux extrémités 3' des neuf gènes d'histones H3. La région qui se replie en tige boucle (stem-loop) et le site de fixation de U7 snRNP (U7 site) sont indiqués en gras. La fin de l'ARNm est indiquée par le dernier nucléotide de la première ligne. La séquence de l'histone H3 étudiée dans ce chapitre est en bleu. Figure adaptée de (Wang et al., 1996).

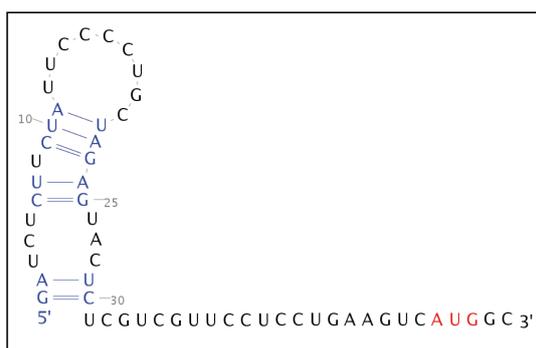
« *structure-coiffe* » serait impliquée. Afin de mieux comprendre le repliement du 5'UTR des ARNm de l'histone H3, j'ai établi une séquence consensus de cette région en fonction des caractéristiques structurales, observées dans les résultats d'algorithmes de programmation dynamique (cf. Fig. 5.3-A). Ainsi, deux blocs structuraux ont été constatés au sein de cette séquence consensus : une tige boucle à l'extrémité 5' et une région non appariée en aval de celle-ci (cf. Fig. 5.3-B). Il est intéressant de noter que la taille de ces différents blocs varie en fonction de celle du 5'UTR.

Dans le cas du motif structural en épingle à cheveux, jusqu'à sept paires de bases peuvent être observées au niveau de la tige. Les trois derniers appariements (G₁-C₃₀ ; A₂-U₂₉ et C₆-G₂₅), impliquant la structure coiffe, sont systématiquement observés (cf. Fig. 5.3-B). Toutefois, la nature des bases ne semble pas être conservée à ces positions, par exemple, l'appariement de base C₆-G₂₅ est fréquemment remplacé par un appariement de type A-U, qui lui est isostérique (Stombaugh et al., 2009), comme c'est le cas dans la séquence MB33989 (cf. Fig. 5.3-C). Comme il préserve la structure tridimensionnelle, ce type de substitutions est fréquent dans les molécules d'ARN et se trouve à la base des analyses comparatives de séquences (James et al., 1989). Par ailleurs, cette hélice peut également contenir des régions non appariées de type « *boucles internes* » et/ou « *renflements* ». En effet, dans la séquence que j'ai étudiée au cours de ma thèse, une boucle interne symétrique peut être constatée à la position C₃, U₄, U₂₀ et

A



B



C

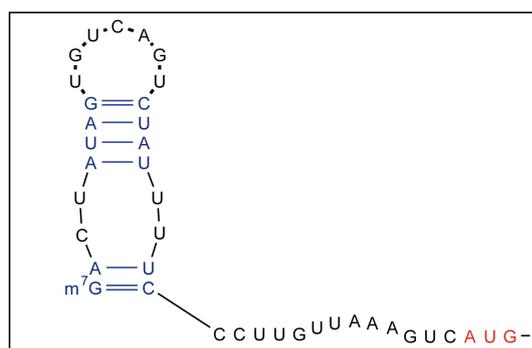


FIG. 5.3 – Prédiction par l'approche bioinformatique du repliement du 5'UTR des ARNm de l'histone H3, provenant du *Mus musculus*

(A) Deux histogrammes de la structure consensus, établie à partir des alignements structuraux des séquences 5' non codantes, provenant des onze messagers de l'histone H3. Le premier histogramme (tracé en bleu) représente la fréquence du résidu le plus souvent trouvé à une position donnée de la séquence, tandis que le deuxième (tracé en rouge) est établi en fonction de la probabilité que le résidus adopte la structure indiquée.

(B) La structure consensus du 5'UTR des ARNm de l'histone H3, caractérisée par une partie en tige boucle et une partie simple brin. Le motif structural en « épingle à cheveux » est constitué de sept appariements de bases, interrompus par une boucle interne symétrique et un renflement, puis terminés par une boucle apicale riche en pyrimidines.

(C) La structure secondaire qu'adopte le 5'UTR de la séquence modèle (MB33989), caractérisée par une tige boucle de 6 appariements de bases, interrompue par une boucle symétrique, et une région simple brin en aval de la région structurée.

5.2 Prédiction de la structure secondaire par l'approche bioinformatique

U₂₁ (cf. Fig. 5.3-C). Cependant, la position de ces régions non appariées s'est révélée non conservée, se traduisant ainsi en « *gaps* » (espaces) dans la séquence consensus. Au niveau de la boucle apicale de cette structure, il est possible de distinguer une séquence riche en pyrimidine, dont la taille moyenne est de 6nt.

La partie simple brin de cette séquence consensus s'est révélée également riche en résidus pyrimidiques, en particulier à proximité immédiate de la structure en épingle à cheveux. Sa taille peut varier de 3 à 15 nt, mais aucune structure stable pour cette région n'a été mise en évidence. Des interactions entre cette partie du 5'UTR et la région codante ou le 3'UTR ne sont pas exclues. Toutefois, en accord avec les résultats de traduction *in vitro* (cf. §3.4.3) et les études effectuées par Huynen (Huynen et al., 1992), il est probable que cette région n'interagisse pas avec le cœur de la structure globale de l'ARNm de l'histone H3.

De la même manière, en accord avec les prédictions de Williams et Marzluff (Williams and Marzluff, 1995), j'ai également pu observer la conservation de la structure en épingle à cheveux en 3'UTR, fixant la protéine SLBP (résultats non détaillés).

Contrairement aux extrémités non traduites, le repliement de la séquence codante de l'ARNm de l'histone H3 est difficile à prédire via Mfold, car le nombre de combinaisons possibles pour cette région de 411nt reste toujours très élevé, ce qui m'a amené à envisager plutôt une étude de covariations de séquences. Toutefois, l'alignement des séquences homologues des gènes d'histones H3 de *Mus musculus* ne révèlent pas suffisamment de variations pour en tirer de l'information utile à cette étude (cf. Fig. 5.2-A) (Wang et al., 1996). En effet, la robustesse de cette approche croît avec la diversité des séquences et donc avec les distances évolutives qui les séparent (James et al., 1989). Ainsi, j'ai choisi d'aligner une vingtaine de séquences homologues de l'ARNm de l'histone H3, provenant d'une variété d'organismes tels que : *Mus musculus*; *Homo sapiens*; *Cricetulus longicaudatus*; *Equus caballus*; *Sus scrofa*;

Gallus gallus; *Cairina moschata* (cf. Fig. 5.4). En accord avec les prédictions des études antérieures, les résultats de cet alignement ont montré que la séquence codante de l'ARNm de l'histone H3 est restée très conservée au cours de l'évolution. Cependant, grâce à la diversité des séquences comparées, des mutations supplémentaires, par rapport à l'alignement proposé par Wang et ses collègues (cf. Fig. 5.2-A), ont été trouvées. Remarquons que certains résidus à des positions données sont plus conservés qu'à d'autres positions, suggérant que la pression de sélection exercée sur ces résidus pourrait résulter de multiples contraintes imposées par la structure et la fonction de l'ARN. Par exemple, ces résidus pourraient jouer un rôle important dans le maintien de la structure de l'ARN, dans la conservation de la séquence protéique ou encore participer dans d'autres réactions du métabolisme du messenger de l'histone H3.

Toutefois, une analyse approfondie de ces variations n'a pas permis de révéler de covariations nettes permettant de prédire une suite d'interactions inter résiduelles aboutissant à la formation d'une hélice, mais des variations ponctuelles, qui pourraient indiquer le remplacement d'appariements par d'autres. Par exemple, à certaines positions les résidus U et C se retrouvent souvent substitués, suggérant que certains appariements Watson Crick entre G et C pourrait être remplacés par des appariements de type Wooble, ou inversement (cf. Fig. 5.4).

FIG. 5.4 – Alignement de vingt-trois séquences codantes d'ARNm d'histone H3

Alignement de vingt-trois séquences codantes d'ARNm d'histone H3, provenant des organismes tels que : *Mus musculus*; *Homo sapiens*; *Cricetulus longicaudatus*; *Equus caballus*; *Sus scrofa*; *Gallus gallus*; *Cairina moschata*, et montrant une bonne conservation de cette région. Au sein d'une même colonne, les différences entre ces séquences peuvent être distinguées par les différentes couleurs des résidus (A rouge, G jaune, U bleu et C vert). Le numéro d'accès dans la banque NCBI est indiqué à gauche de sa séquence.

Les résultats de cette étude n'ont donc pas permis de proposer une conformation de l'ARNm de l'histone H3, car la structure primaire de ce messenger est restée hautement conservée, offrant ainsi trop peu de changements compensatoires pour une étude de covariations. En effet, il a été montré qu'une étude efficace de covariations nécessitait une similarité de séquence de l'ordre de 60-80% (James et al., 1989), alors que les séquences des messagers de l'histone H3, que j'ai comparées, se sont révélées être conservées à plus de 90%. Cependant, les variations constatées au cours de cette étude apportent une information non négligeable sur l'implication de certaines bases dans le repliement de l'ARNm de l'histone H3. En effet, sachant que la structure secondaire de ce messenger est importante dans sa fonction, les variations mineures constatées ne doivent donc pas perturber sa conformation. Ainsi, il est probable que ces variations soient localisées dans des régions non appariées de l'ARN, ou dans le cas contraire qu'elles n'altèrent pas la conformation de l'ARN.

Pour conclure, les études bioinformatiques que j'ai menées afin de proposer un modèle de structure secondaire pour l'ARNm d'H3 m'ont permis de proposer une structure en tige boucle dans la région 5' non codante, dans laquelle serait imbriquée la coiffe du messenger. De la même manière, la structure en épingle à cheveux ciblée par la protéine SLBP a également pu être observée dans l'ensemble des séquences étudiées. Toutefois, dans le cas de la région traduite, en raison de la très forte conservation des séquences et leur grande taille, seules quelques contraintes dans la recherche du repliement secondaire de ce messenger ont pu être inférées. D'autres études ont donc été nécessaires pour établir un modèle de la structure secondaire de l'ARNm de l'histone H3. Une approche expérimentale, pour trouver des contraintes supplémentaires dans le repliement de ce messenger, est présentée dans la section suivante.

5.3 Prédiction de la structure secondaire par une approche expérimentale

5.3.1 Présentation de la problématique

L'approche expérimentale par sondage en solution d'ARN permet d'extraire des informations importantes dans l'analyse structurale de cette molécule. En effet, elle rend possible l'identification des nucléotides impliqués dans la formation d'hélices et ceux restant libres. Enfin, couplée à une étude comparative de séquence, issue de l'approche bioinformatique, les informations obtenues par cette approche m'ont servi de contraintes structurales dans l'établissement d'un modèle d'architecture cohérent de la molécule d'ARN.

5.3.2 Approche expérimentale utilisée

Le principe de l'expérience de sondage en solution de l'ARN repose sur la différence de réaction, à des sondes chimiques ou enzymatiques, de certains nucléotides, selon qu'il soient appariés ou libres. Le déroulement de cette expérience peut être divisé en deux étapes majeures : 1) la réaction des résidus en solution avec une sonde ; 2) l'identification des résidus, en fonction de leur réaction, sur un gel de polyacrylamide dénaturant.

Au cours de la première étape de cette expérience, la mise au point des conditions de la réaction est nécessaire afin d'assurer sa fidélité. Ainsi, une modification ou une hydrolyse de l'ARN doit s'effectuer en présence d'une quantité limitée de sondes dans un milieu de réaction et une température bien définie. Dans le choix de la quantité de la sonde utilisée, il est important de s'assurer qu'une modification ou une coupure se produisent au maximum par molécule d'ARN, afin d'éviter toute réaction secondaire

non spécifique dûe aux changements structuraux des molécules d'ARN modifiées ou coupées. Un contrôle de spécificité de coupure de la sonde est systématiquement effectué en parallèle, dans les mêmes conditions mais en absence de la sonde testée, afin de voir si elle est bien à l'origine de ces coupures. Enfin, il est également possible de tester plusieurs sondes différentes, qui peuvent apporter des données complémentaires, utiles dans l'établissement d'un modèle le plus fidèle possible de l'architecture d'un ARN (Chevalier et al., 2009)(Ehresmann et al., 1987)(Brunel and Romby, 2000).

Une grande variété de sondes chimiques et enzymatiques a été largement caractérisée et leur utilisation a permis la prédiction d'un grand nombre de structures secondaires d'ARN entiers ou de leurs fragments (exemple des ARNt ou des IRES). Les caractéristiques des sondes que j'ai utilisées lors du sondage de l'ARNm d'H3 sont présentées ci-dessous.

L'endoribonucléase V1 (RNase V1), provenant d'un venin de cobra *Naja naja oxiana*, est la seule sonde spécifique du double brin des ARN. Elle coupe sans une spécificité de base les résidus appariés ou empilés dans la structure d'un ARN, générant des fragments 5' phosphate (Sobczak et al., 2010).

La nucléase S1 (RNase S1), provenant d'*Aspergillus oryzae*, est une sonde enzymatique spécifique des régions simples brins. Elle coupe sans spécificité de bases les résidus non appariés, produisant des mono ou oligonucléotides 5' phosphate (Sobczak et al., 2010).

L'endoribonucléase T1 (RNase T1), provenant d'*Aspergillus oryzae*, est une sonde enzymatique spécifique des résidus G non appariés. Elle coupe la liaison phosphodiester entre l'acide guanylique en 3' et le groupement OH en 5' du nucléotide adjacent. Cette réaction conduit à la formation d'un groupement phosphate 2' 3'-cyclique et à la libération des produits sous forme de 3'GMP ou de fragments terminés par un groupement phosphate en 3' (Sobczak et al., 2010).

Le sulfate de diméthyle (DMS) est un agent alkylant, possédant une affinité

5.3 Prédiction de la structure secondaire par une approche expérimentale

pour les résidus A et C non appariés au sein de la structure secondaire d'un ARN. Il réagit avec ces résidus en ajoutant un groupement méthyle à la position N1 de l'adénine et plus faiblement à la position N3 de la cytosine. Une méthylation de N7 de la guanine a également été répertoriée, dont l'utilité s'est avérée importante dans l'étude de la structure tertiaire des ARN (Peattie and Gilbert, 1980). Enfin, la détection des adénines et des cytosines modifiées peut être réalisée par l'expérience d'arrêt d'une rétro-transcriptase (Sobczak et al., 2010).

Le métho - p - toluène sulfonate de 1 - cyclohexyl - 3 - (2 - morpholinoéthyl) - carbodiimide (CMCT) est un dérivé de carbodiimide ayant une affinité pour les résidus U et G libres et donc accessibles dans une molécule d'ARN repliée. La réaction entre cette sonde chimique et ces résidus conduit à l'ajout d'un groupement formamidine à la position N3 de l'uridine et plus faiblement à la position N1 de la guanine. La détection des résidus modifiés par le CMCT peut être effectuée de la même façon que pour ceux modifiés par le DMS.

L'anhydride N-méthyl-isatoïque (NMIA) est un composé chimique présentant une affinité pour la position 2' du ribose des nucléotides non appariés. Il réagit sans spécificité de base avec les groupements hydroxyles pour former un ester 2-(-méthyl-amino)-benzoïque de nucléotide. Cette modification peut être détectée de la même manière que celles produites par la réaction du DMS et du CMCT (Wilkinson et al., 2005)(Merino et al., 2005)(Wilkinson et al., 2009).

L'ion plomb (Pb^{2+}) est un ion divalent capable de promouvoir une réaction de transestérification d'un ARN, réalisée par une attaque de l'hydroxyle en 2' sur le phosphate en 3', produisant ainsi des mono- ou des oligo-nucléotides contenant un groupement hydroxyle en 5' et un phosphate 2' 3' cyclique en 3'. Deux types de clivage d'ion Pb^{2+} sont constatés pour une molécule d'ARN. Le premier correspond à de fortes coupures se produisant au niveau des sites de fixation des ions magnésiums. Le second, à des clivages de plus faible intensité au niveau des régions flexibles de l'ARN, correspondant aux régions non appariées telles que : les inter-hélices, les boucles et les

renflements (Lindell et al., 2002)(Sobczak et al., 2010).

Enfin, l'hydrolyse spontanée de l'ARN est une autre stratégie de sondage en solution de ces molécules, couramment employée dans l'étude structurale, notamment des riboswitches (Mandal and Breaker, 2004)(Nahvi et al., 2002). Analogue à la réaction aux ions plomb, le principe de ce mécanisme repose sur le clivage spontané des ARN au niveau des liaisons phosphodiester se produisant à 25°C dans un tampon réactionnel contenant 20mM de MgCl₂, 50mM Tris-HCl (pH 8,3 25°C) et 100mM KCl. Il a été montré que dans ces conditions, l'ARN se clive spontanément au niveau des régions non structurées ou celui de certaines structures tridimensionnelles (Nahvi et al., 2002)(Soukup and Breaker, 1999).

La révélation des résidus ayant réagi aux sondes utilisées peut s'effectuer de deux manières différentes selon la taille et la région de l'ARN. La première méthode, dite « *directe* », fait intervenir les ARN marqués à leur extrémité 5' ou 3', et est limitée à des ARN de petite taille (inférieure à 200nt). Elle peut également être utilisée pour identifier les résidus aux extrémités 5' et 3' d'un ARN de plus grande taille. Ainsi, dans cette approche, les fragments des ARN marqués sont révélés directement sur un gel de polyacrylamide dénaturant, en présence d'une échelle constituée d'une hydrolyse alcaline et des ARN coupés à la RNase T1 (spécifique des résidus G non appariés) qui permet de retrouver la séquence de l'ARN. La deuxième méthode, dite « *indirecte* », est adaptée pour les ARN de plus grande taille (supérieure à 200nt), dont les nucléotides clivés ou modifiés sont révélés par extension d'amorce à l'aide d'une rétro-transcriptase (RT). Les fragments d'ADNc sont ensuite résolus sur un gel de polyacrylamide dénaturant et comparés au séquençage de l'ARN obtenu avec la même amorce (Chevalier et al., 2009)(Ehresmann et al., 1987)(Brunel and Romby, 2000).

5.3.3 Résultats et discussions

Dans les expériences de sondage en solution que j'ai réalisées pour cette grande séquence d'ARN, la révélation des résidus ayant réagi en présence d'une sonde donnée a été effectuée principalement par la méthode indirecte. Cette stratégie d'identification des résidus implique une transcription inverse à partir de multiples amorces, hybridées en différents endroits et permettant de couvrir la totalité de la séquence. Cependant, cette méthode ne m'a pas permis de visualiser les résidus localisés à l'extrémité 3' de cet ARN, conduisant ainsi à une étude de cette région par la méthode directe.

La méthode indirecte a été essentiellement appliquée pour les expériences de sondage en solution impliquant les sondes : RNase V1, RNase S1, DMS, CMCT, NMIA et Pb^{2+} , mais également celles utilisant la stratégie d'un clivage spontané de l'ARN. Pour chaque sonde, j'ai adapté les conditions optimales de la réaction sur l'ARNm de l'histone H3 en me basant sur les protocoles standards (Chevalier et al., 2009) (Ehresmann et al., 1987)(Brunel and Romby, 2000) et en testant une vaste gamme de milieux réactionnels (*cf.* §A.5). La quantité de sonde conduisant à des coupures ou des modifications statistiques de l'ARN a été déduite à partir des expériences de sondage en solution que j'ai effectuées en présence d'une gamme de concentration croissante de chaque sonde étudiée (résultats non montrés). Les expériences que j'ai effectuées pour le messager de l'histone H4, pouvant être consulté au chapitre 2, constituent un exemple de recherche des conditions optimales.

FIG. 5.5 – Sondage enzymatique de l'ARNm de l'histone H3 par voie indirecte

Gels représentatifs des expériences de sondage enzymatique en solution par voie indirecte de l'ARNm de l'histone H3, couvrant la quasi-totalité de la séquence de ce messenger dans le sens 3' vers 5'. 0,1µg d'ARN ont été hydrolysés par $1,5 \times 10^{-4}$ U de RNase V1 (pistes 2) ou par 7×10^{-2} U (pistes 4) de RNase S1. L'ADNc a ensuite été obtenu par transcription inverse des ARNm sondés, en utilisant des amorces marquées radioactivement (parmi sept extensions différentes seules six sont montrées). Les produits obtenus ont ensuite été révélés grâce à une migration électrophorétique sur un gel de polyacrylamide dénaturant, avec un temps court, long ou plus long, et comparés au séquençage de l'ARN réalisé en parallèle et obtenu avec la même amorce. La présence de la sonde est indiquée par (+) et son absence par (-). Les positions de certaines coupures à l'une des deux RNases sont indiquées par des flèches.

La spécificité de coupure ou de modification a été établie par comparaison avec les ARN témoins non traités par de la sonde étudiée, par exemple les pistes 1 et 3 du sondage enzymatique de l'ARNm de l'histone H3 (*cf. Fig. 5.5*). Dans le cas de la méthode de l'hydrolyse spontanée de l'ARN, le témoin n'était pas incubé dans le tampon réactionnel (*cf. Fig. 5.6-pistes 3*). Ainsi, lorsqu'un arrêt d'une rétro-transcriptase (RT) apparaissait dans le cas des ARN traités et témoins, la coupure de la sonde ne pouvait pas être prise en compte en considérant que cette dernière pourrait résulter d'une dégradation de l'ARN ou d'un arrêt non spécifique de l'enzyme. Il était donc important de s'assurer de la pureté de l'ARN et d'établir le protocole d'une transcription inverse permettant d'éviter les arrêts non spécifiques de la RT. En conséquence, je purifiais systématiquement les ARN néosynthétisés sur un gel de polyacrylamide dénaturant, selon les protocoles décrits dans la partie §A.3.5. Enfin, à partir des protocoles standards (Chevalier et al., 2009)(Ehresmann et al., 1987) (Brunel and Romby, 2000), j'ai également amélioré la réaction de l'extension d'amorce et j'ai retenu une rétro-transcriptase MMLV « *Moloney Murine Leukemia Virus* », parmi d'autres que j'ai testées (AMV et SuperScript). En effet, celle-ci présentait une meilleure processivité sur l'ARNm de l'histone H3 à partir des différentes amorces utilisées dans ces expériences (résultats non montrés).

Au cours des réactions de transcription inverse, j'ai utilisé sept amorces différentes, marquées au [γ - 32 P] ATP et espacées environ de 70nt, permettant ainsi

5.3 Prédiction de la structure secondaire par une approche expérimentale

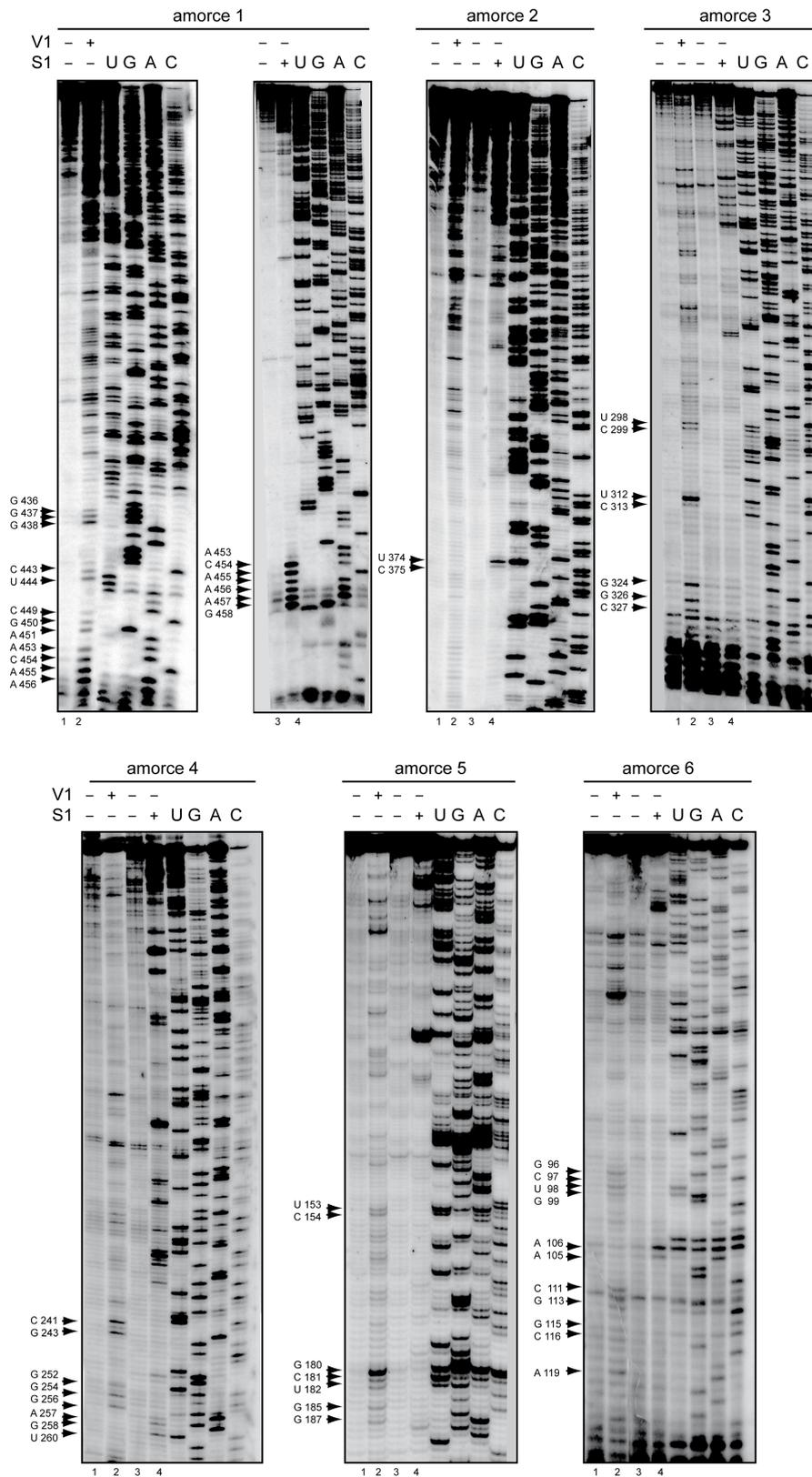


FIG. 5.5 – Sondage enzymatique de l'ARNm de l'histone H3 par voie indirecte

de couvrir la totalité de la séquence du messager de 497nt. Les produits radioactifs obtenus dans ces réactions ont été visualisés sur des gels de polyacrylamide dénaturants, parallèlement aux expériences de séquençage de l'ARN effectuées avec la même amorce. Toutefois, avec l'augmentation de la taille des fragments d'ADNc et en fonction de la qualité des gels, la migration logarithmique de ces produits rendait difficile l'identification des résidus. Ainsi, pour chaque extension d'une amorce radioactive, trois types de migrations ont souvent été nécessaires : une migration courte (pour une révélation des fragments les plus petits obtenus avec une amorce) ; une migration longue (après une sortie des fragments d'une vingtaine de nucléotides) et une migration plus longue (après une sortie des fragments d'une quarantaine de nucléotides).

Par ailleurs, afin de vérifier la reproductivité de ces expériences, j'ai réalisé au moins deux fois le sondage en solution de la molécule de l'ARNm de l'histone H3, pour la plupart des sondes citées précédemment. Les résultats de ces tests se sont révélés similaires, suggérant que cet ARN adopterait le même repliement et que celui-ci serait stable. Dans le cas de la réaction de l'ARN avec les sondes chimiques DMS et CMCT, deux conditions de réactions ont été utilisées : native et semi-dénaturante, qui se différencient respectivement par la présence ou l'absence d'ions (*cf. Fig. 5.6-pistes 8 et 12 pour les conditions natives ; 10 et 14 pour les conditions semi-dénaturantes*).

FIG. 5.6 – Sondage chimique de l'ARNm de l'histone H3 par voie indirecte

Gels représentatifs des expériences de sondage chimique en solution par voie indirecte de l'ARNm d'H3, couvrant la quasi-totalité de la séquence de ce messager dans le sens 3' vers 5'. 0,1µg d'ARN ont été soumis à des coupures par les ions plomb (Pb^{2+} , pistes 6) ou par un traitement de clivage spontané (CS, pistes 4), ou bien aux modifications chimiques par NMIA (pistes 2), DMS (pistes 8 et 10) ou CMCT (pistes 12 et 14). Les sondes chimiques DMS et CMCT ont été testées dans les conditions natives (N) ou semi-dénaturantes (SD). L'ADNc a ensuite été obtenu par transcription inverse des ARNm sondés, et révélé sur un gel de polyacrylamide dénaturant, avec un temps court, long ou plus long, puis comparé au séquençage de l'ARN réalisé en parallèle et obtenu avec la même amorce (parmi sept extensions différentes seules six sont montrées). La présence de la sonde est indiquée par (+) et son absence par (-). Les positions de certaines coupures ou modifications sont indiquées par des flèches.

5.3 Prédiction de la structure secondaire par une approche expérimentale

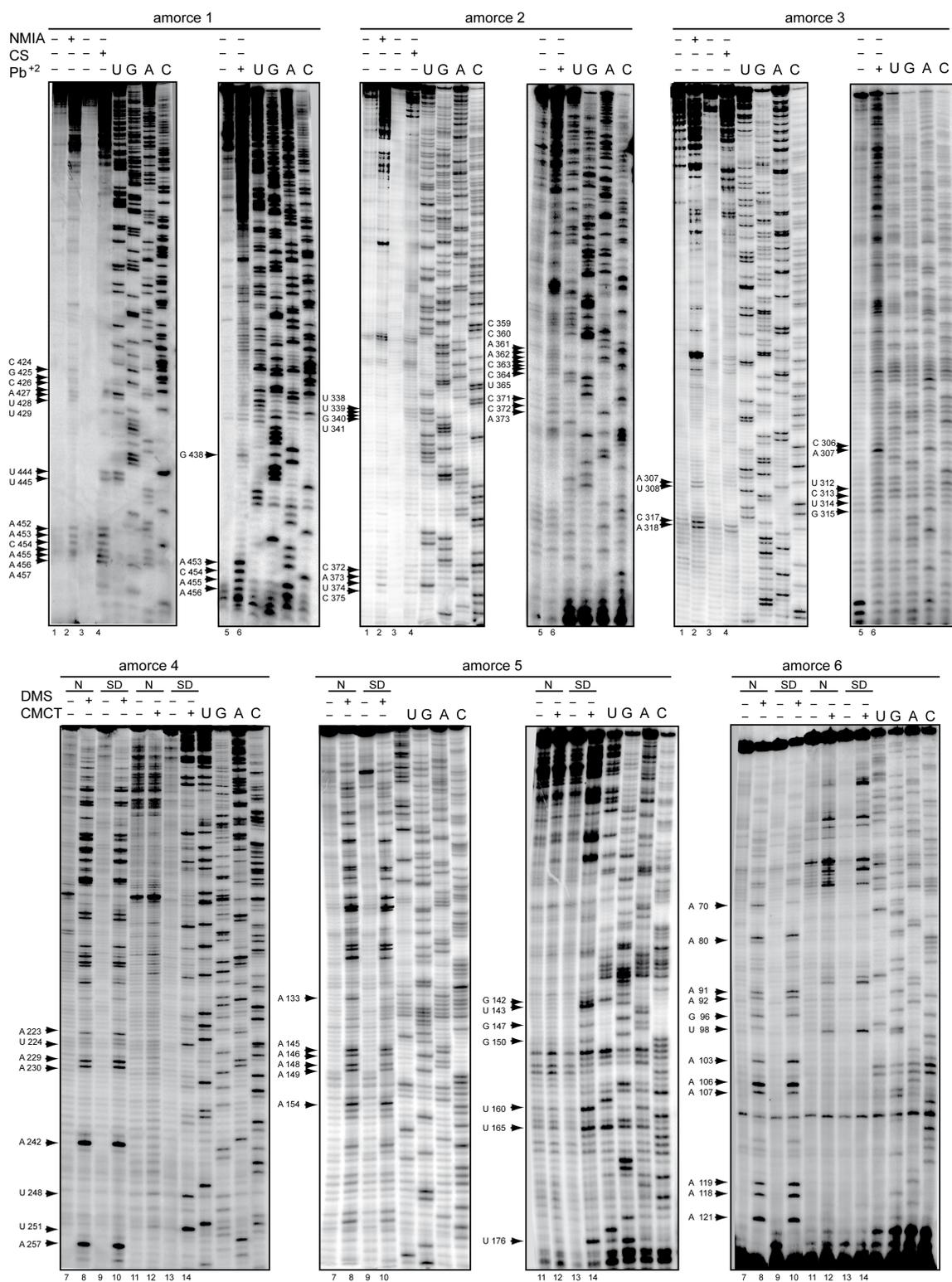


FIG. 5.6 – Sondage chimique de l'ARNm de l'histone H3 par voie indirecte

Ainsi, la première a été nécessaire dans l'identification des interactions à longue distance, stabilisées par les ions magnésiums, tandis que la seconde a été utilisée afin de déterminer les interactions secondaires stables.

Les résultats de l'ensemble de ces expériences ont montré une bonne réactivité des sondes utilisées sur l'ARNm d'H3. Toutefois, cette réactivité s'est révélée différente selon les régions de l'ARN étudié, suggérant une accessibilité variable des résidus au sein de la structure de cette molécule. Ainsi, j'ai classé la réactivité mesurée pour ces nucléotides en trois groupes en fonction de l'intensité : faible, moyenne ou forte. Par exemple, le résidu U₃₁₂ est coupé fortement par la RNase V1, tandis que les résidus G₃₂₄, G₃₂₆ et C₃₂₇ le sont moyennement, et les résidus U₂₉₈ et C₂₉₉ sont coupés faiblement (*cf. Fig. 5.5-amorce 3, piste 2*).

Il est intéressant de noter que certaines régions de cette séquence d'ARN se sont révélées très réactives à la fois vis à vis des sondes enzymatique spécifiques du double brin (RNase V1) et du simple brin (RNase S1). C'est par exemple le cas des résidus C₄₅₄, A₄₅₅ et A₄₅₆, localisés à l'extrémité 3' de ce messenger. Ces résultats pourraient s'expliquer par l'existence de plusieurs conformations alternatives de cet ARN ou bien par l'instabilité de certaines régions appariées (Herbreteau et al., 2005)(Lorsch and Herschlag, 1999). Afin d'éclaircir ce point, j'ai vérifié l'éventuelle existence d'une forme alternative de ce messenger par une analyse sur gel de polyacrylamide non dénaturant. Le suivi de la migration a été possible grâce au marquage en 3' de l'ARN au [³²P]-pCp. Les résultats de ces expériences n'ont révélé qu'une seule bande, suggérant l'absence d'une forme alternative stable (*cf. Fig. 5.7*). Ainsi, il est plus probable que certains résidus, réactifs à la fois aux sondes spécifiques du simple et double brin, seraient impliqués dans des interactions instables, plutôt que dans les interactions alternatives.

L'analyse de mes résultats a montré que pour certains résidus la réactivité aux sondes chimiques DMS et CMCT pouvait varier en fonction de la présence ou de

5.3 Prédiction de la structure secondaire par une approche expérimentale

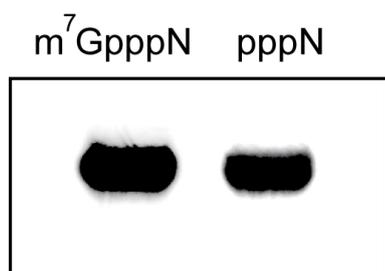


FIG. 5.7 – Mise en évidence d'une seule conformation de l'ARNm d'H3

Migration des ARNm de l'histone H3 coiffés (m^7GpppN) et non coiffés ($pppN$) sur un gel natif. Aucune conformation alternative n'a été mise en évidence, ni en présence de la coiffe ni en son absence, suggérant que l'ARNm n'adopterait qu'une seule conformation.

l'absence d'ions. Par exemple, en conditions semi-dénaturantes, les résidus U_{98} et A_{103} se montrent plus réactifs aux sondes CMCT et DMS respectivement, tandis que le résidu A_{70} le devient moins dans les mêmes conditions (*cf. Fig. 5.6-amorce 6*). Ce constat suggère donc que ces ions peuvent participer dans certaines interactions intra moléculaires, conduisant en une protection ou au contraire à une exposition de certains nucléotides de cet ARN. Par ailleurs, en association avec les résultats obtenus grâce au sondage de l'ARN aux ions Pb^{2+} , un site de fixation des ions Mg^{2+} a également été prédit. En effet, une forte coupure au Pb^{2+} au niveau du résidu A_{103} associée à une protection de ce résidu à la modification par le DMS en condition native, suggèrent qu'il serait localisé dans un site de fixation des ions magnésium (Lindell et al., 2002) (Sobczak et al., 2010). Ainsi, au delà de l'information sur la structure secondaire, les données obtenues grâce à ce type d'expériences peuvent également être très utiles dans la prédiction de la structure tridimensionnelle de cet ARN (Draper, 2004) (Woodson, 2005).

La méthode directe a été appliquée à une étude structurale de l'extrémité 3' de l'ARNm de l'histone H3, grâce aux sondes enzymatiques (RNase V1, S1 et T1), chimique (AcPb), et à une stratégie du clivage spontanée de cette molécule. Comme pour la méthode indirecte, j'ai établi les conditions optimales et les quantités de sonde nécessaires pour un sondage de cette séquence, respectivement à partir des protocoles standards et d'une gamme de concentration de sonde étudiée (*cf. §A.5*).

La révélation des produits de la réaction à la sonde utilisée a été réalisée sur un gel de polyacrylamide dénaturant, grâce à un marquage de l'ARN en 3' au $[^{32}P]$ -pCp.

Enfin, les résidus ayant réagi ont été identifiés grâce aux ARNm d'histone H3 témoins soumis à une hydrolyse alcaline (constituant une échelle de migration de fragments de toutes tailles), et une hydrolyse partielle par la RNase T1 en conditions dénaturantes (coupant tous les résidus G et permettant ainsi de retrouver la séquence de l'ARN) (*cf. §A.5.3.1*).

Les résultats de ces expériences ont montré des régions coupées aux sondes spécifiques du double brin (RNase V1) et du simple brin (RNase S1, T1, Pb^{2+} , clivage spontané) suggérant que l'extrémité 3' de ce messenger pourrait également être structurée (*cf. Fig. 5.8*). Cependant, l'identification des résidus ayant réagi à la sonde s'est révélée plus délicate en raison d'une hydrolyse atypique par la RNase T1. En effet, malgré une répétition des expériences, et dans les conditions que j'ai utilisées, il semblerait que celle-ci pourrait couper non spécifiquement certaines régions apparaissant à proximité immédiate de son substrat habituel. Dans l'exemple de l'extrémité 3' de l'ARNm de l'histone H3, elle semble hydrolyser les résidus A et U, localisés à proximité des résidus G (*cf. Fig. 5.8-pistes 3 et 10*).

En tenant compte des caractéristiques de l'hydrolyse de la RNase T1, j'ai analysé l'ensemble de coupures obtenues à l'aide des sondes utilisées dans ces expériences. Ainsi, grâce aux coupures à la RNase V1 détectées dans les régions G_{477} - C_{481} et C_{486} - C_{491} (*cf. Fig. 5.8-piste 12*), j'ai pu confirmer l'existence de la tige boucle reconnue par SLBP, prédite par Williams et Marzluff (Williams and Marzluff, 1995).

À la fin des expériences de sondage en solution, j'ai répertorié tous les résultats en fonction de la réactivité des résidus en leur attribuant un score selon l'intensité de leur réaction. Après une vérification de leur reproductivité avec la même sonde et de la cohérence avec l'ensemble de résultats obtenus avec les différentes sondes, j'ai retenu les coupures les plus significatives. Les données ainsi sélectionnées, m'ont servi de contrainte dans la recherche des structures énergétiquement les plus stables via les programmes Mfold et RNAfold.

5.3 Prédiction de la structure secondaire par une approche expérimentale

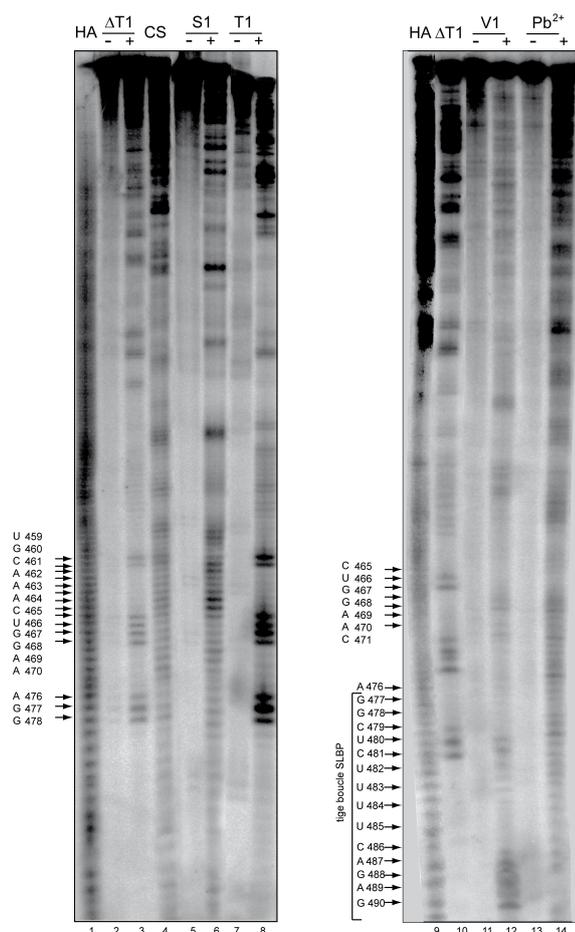


FIG. 5.8 – Sondages chimique et enzymatique de l'ARNm de l'histone H3 par voie directe

Gels représentatifs des expériences de sondages enzymatique et chimique en solution par la voie directe, visualisant l'extrémité 3' de l'ARNm de l'histone H3. 25 000cpm d'ARN ont été coupés par $1,5 \times 10^{-4}$ U de RNase V1 ; 7×10^{-2} U de RNase S1 ; 10mM de Pb^{2+} ; 0,1U de RNase T1 ou incubés à 25°C pendant 40h dans un tampon contenant 20mM de $MgCl_2$, 50mM Tris-HCl (pH 8,3 25°C) et 100mM KCl (CS). Les produits obtenus ont ensuite été révélés grâce à une migration électrophorétique sur un gel de polyacrylamide dénaturant, et comparés aux ARN témoins soumis à une hydrolyse alcaline (HA) ou à une hydrolyse partielle par la RNase T1 en conditions dénaturantes (ΔT). La présence de la sonde est indiquée par (+) et son absence par (-). Les positions de certaines coupures sont indiquées par des flèches.

Parmi de nombreuses structures proposées, j'ai recherché la structure qui concorde avec les résultats obtenus lors des études effectuées par analyse comparative de séquences (*cf.* §5.2). Par exemple, j'ai tenu compte qu'afin de préserver l'architecture de l'ARNm de l'histone H3, les variations observées dans l'étude comparative (*cf.* §5.2.2) ne doivent pas perturber la structure de cet ARN, ou que ces variations seraient localisées dans les régions simple brin.

Malgré de multiples contraintes imposées, aucun modèle complet de structure secondaire cohérent n'a été proposé. Ces résultats peu satisfaisants pourraient être dûs à deux limitations majeures de ces programmes. La première est que les structures qu'ils proposent sont calculées de façon optimale d'un point de vue énergétique, pourtant l'ARN n'adopte pas toujours le repliement dicté par la maximisation des paires Watson-Crick ou Wooble. Ainsi, certains motifs structuraux locaux, entraînant un repliement global de la molécule énergétiquement moins stable, ne sont pas proposés par ces algorithmes, en dépit de leur possible existence. La deuxième limitation est due à la grande taille de la séquence du messenger étudié, affectant la qualité des résultats proposés par ces algorithmes.

Les multiples conformations théoriques proposées par les algorithmes de programmation dynamique m'ont permis d'établir un premier jet de modèle de structure secondaire pour la molécule de l'ARNm de l'histone H3. Afin de rester dans un contexte cohérent avec les résultats que j'ai obtenus et les caractéristiques du repliement des ARN, j'ai ensuite ajusté à la main le modèle de la structure secondaire de cette séquence. Ainsi, à partir des paires de bases proposées par ces algorithmes, dont le pourcentage de prédiction est le plus élevé, j'ai recherché un repliement de l'ARN en privilégiant les interactions les plus stables à courte distance et en accord avec mes résultats, sachant que celles-ci ont plus de chance de se former dans un contexte physiologique (Jackson et al., 2006)(Cruz and Westhof, 2009).

FIG. 5.9 – Modèle de la structure secondaire de l'ARNm de l'histone H3

Les coupures et les modifications de l'ARNm de l'histone H3, obtenus grâce aux expériences de sondage en solution, sont indiquées sur la figure. Les coupures enzymatiques (V1, S1 et T1) sont indiquées par un cône, tandis que les coupures spontanées (CS) et celle obtenues en présence des ions plombs sont indiquées par un trait. Les modifications obtenues en présence du DMS, CMCT et NMIA sont représentées par des ronds, et les différences de réactivités en présence des ions magnésiums sont indiquées par une étoile et un ovale. La taille des symboles et l'intensité de leur couleur sont proportionnelles à la réactivité des sondes.

Dans le modèle de la structure secondaire que j'ai obtenu pour l'ARNm de l'histone H3 (*cf. Fig. 5.9*), la majorité des résidus modifiés par le CMCT, le DMS ou le NMIA, ou coupés par les sondes telles que la RNase S1 ou les ions Pb^{2+} , sont localisés au sein des régions simples brin. Ils peuvent également être retrouvés dans des régions doubles brins susceptibles de s'ouvrir. Les coupures à la RNase V1, la seule sonde indiquant un double brin ou un empilement de base, sont essentiellement retrouvées dans les domaines pris dans une hélice. Toutefois, les coupures à la RNase V1, retrouvées dans certaines boucles (exemple des boucles apicales des hélices D8, D11, D13, D14, D15 ou D16), peuvent également suggérer des interactions à longue distance entre les bases. Ces appariements de bases peuvent ainsi participer dans le repliement tridimensionnel, par l'intermédiaire des interactions de type Watson Crick ou non canoniques (Westhof, 2010)(Das et al., 2010).

Le modèle de la structure secondaire de l'ARNm de l'histone H3 que j'ai proposé est caractérisé par une forme compacte, présentant 21 hélices (D) et repliée sur elle même par les interactions entre les extrémités 5' et 3' de cette molécule, qui forment les hélices D2, D3 et D4 (*cf. Fig. 5.10*). Cette structure est grandement stabilisée par le fort pourcentage d'interactions entre G et C (triple liaison hydrogène), représentant approximativement 73% de l'ensemble des appariements de bases au sein de la séquence codante de ce messager.

L'analyse de la structure secondaire de cet ARN montre que certaines hélices forment des motifs structuraux, tels que les épingles à cheveux ou les jonctions d'hélices. Ces dernières peuvent jouer un rôle important dans le repliement des ARN en déterminant la forme globale de cette molécule et de ce fait elles pourraient également être cruciales dans le fonctionnement de cette molécule d'ARN. Au sein de certaines hélices, il est également possible d'observer quelques mésappariements de bases ou des régions simples brins de type boucles internes symétriques (D1 et D8) ou asymétrique (D2, D4, D6, D7, D15, D18 et D19) ou encore des renflements (D2, D3, D9, D11, D16, D18 et D19). Ces interruptions de duplexes peuvent apporter à l'ARN une flexibilité et

5.3 Prédiction de la structure secondaire par une approche expérimentale

donc jouer un rôle important dans sa fonction (Chu et al., 2009)(Laing et al., 2009).

Le modèle de structure secondaire de l'ARNm de l'histone H3 que j'ai proposé peut être divisé en deux parties (*cf. Fig. 5.10*). La première est très compacte, adoptée par la partie centrale de la séquence codante, constituant ainsi le cœur de cette architecture. Au sein de cette partie de la structure, il est possible de distinguer cinq tiges boucles (formées par des hélices D9, D10, D11 D15 et D16) et des jonctions à trois ou quatre hélices (J3 et J4). Il est intéressant de noter que la jonction à quatre hélices qu'adopte une partie de la séquence codante ressemble fortement à celle d'un riboswitch de type SAM I. Il a été montré que ce riborégulateur participe au contrôle de l'initiation de la traduction chez certaines bactéries par l'intermédiaire de la fixation de la S-adénosylméthionine (Wang and Breaker, 2008). Dans le cas de l'ARNm de l'histone H3, le rôle de cette structure n'a pas encore été élucidé. La deuxième partie de cette structure comprend principalement deux jonctions à trois hélices (J1 et J2), donnant un aspect allongé à cette région du messenger. Elles participent également aux interactions se produisant entre les extrémités 5' et 3' de cet ARN, rejetant les séquences non traduites à l'extérieur du cœur de cette architecture.

Ainsi, la structure des séquences non codantes se montre plutôt indépendante du repliement global du messenger de l'histone H3. En accord avec la prédiction par l'approche bioinformatique (*cf. §5.2.2*), j'ai confirmé par l'approche expérimentale l'existence d'une structure en tige boucle (D1) à l'extrémité 5' de cet ARN, dans laquelle est imbriquée la structure coiffe. Du côté 3' de ce messenger, j'ai également confirmé une structure en tige boucle (D21), faisant partie de la cible de la protéine SLBP et prédite précédemment par Williams et Marzluff (*cf. Fig. 5.2*) (Williams and Marzluff, 1995).

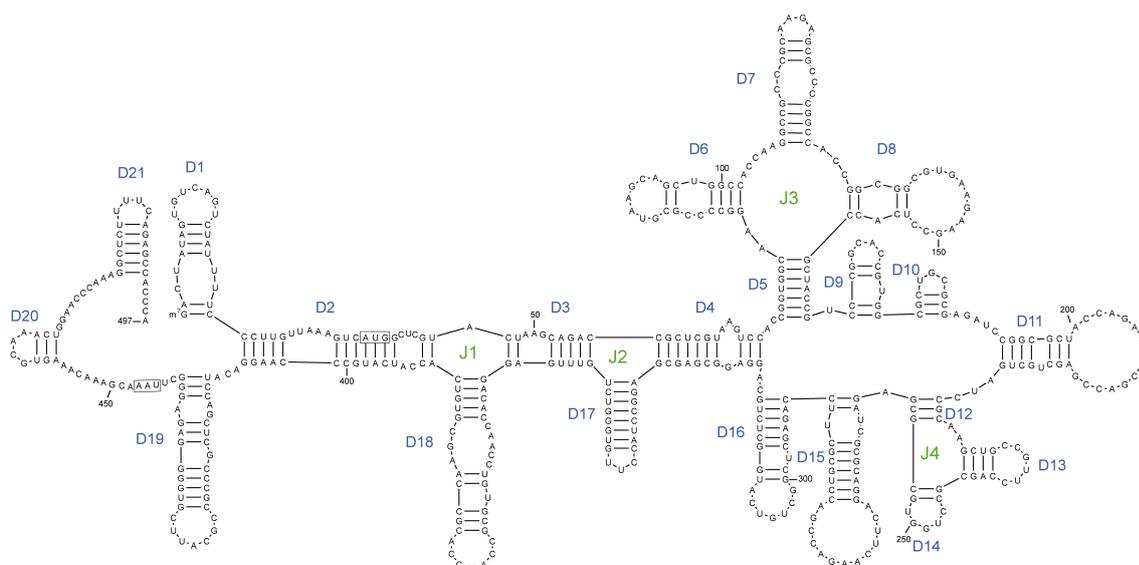


FIG. 5.10 – Annotation de la structure secondaire de l'ARNm de l'histone H3

Les type de motifs structuraux présentés sur ce modèle sont les hélice (D2, D3, D4, D5 et D12), les jonctions à trois (J1, J2, J4) ou à quatre (J3) hélices, ainsi que les tiges boucles (D1, D6, D7, D8, D9, D10, D11, D13, D14, D15, D16, D17, D18, D19, D20 et D21), dont la dernière (D21) est la cible de la protéine SLBP, « *stem loop binding protein* ». Les codons d'initiation et de terminaison sont encadrés.

Pour conclure, en combinant les approches bioinformatiques et expérimentales, j'ai proposé un modèle de structure secondaire pour l'ARNm d'H3. Celui-ci présente une architecture très compacte, dont la séquence traduite constitue le cœur. L'absence d'interactions entre les extrémités 5' ou 3' non traduites et le cœur de cette structure corrobore le caractère non essentiel des UTR, que j'ai observé au cours de mes expériences de délétions de ces UTR (cf. §3.4.3). De même, la dissimulation de la coiffe $m^7G(5')ppp(5')N$ au sein de l'hélice D1 en 5'UTR pourrait rendre la formation du complexe « $m^7G(5')ppp(5')N-eIF4E$ » difficile et résulter en forte sensibilité à l'analogue de la coiffe, que j'ai pu observer durant mes expériences de traduction *in vitro* (cf. §3.5.3).

5.4 Étude du site de fixation du facteur eIF4E au regard de la structure secondaire de l'ARNm de l'histone H3

5.4.1 Présentation de la problématique

Après avoir proposé un modèle de structure secondaire de l'ARNm de l'histone H3, j'ai cherché à comprendre son fonctionnement dans le mécanisme de l'initiation de sa traduction. Afin d'expliquer le comportement atypique de ce messager, j'ai évoqué la possibilité selon laquelle certains motifs structuraux pourraient participer dans des interactions avec les composantes de la machinerie traductionnelle.

Précédemment, je me suis intéressée plus particulièrement au facteur d'initiation classique eIF4E, spécifique de la coiffe, qui permet indirectement le recrutement de la petite sous-unité ribosomique. Ainsi, j'ai montré que ce facteur peut se fixer de façon interne sur cet ARN (*cf.* §4.3.2.3), plutôt que sur son site conventionnel, la coiffe, rendue difficilement accessible par la conformation qu'adopte le 5'UTR de ce messager (*cf.* §5.3.3). Enfin, le site de fixation du facteur eIF4E, que j'ai mis en évidence, est caractérisé par trois domaines, capables d'interagir de manière indépendante avec ce facteur (*cf.* §4.3.2.3).

Dans le but de mieux comprendre le rôle de la structure de l'ARNm de l'histone H3 dans la fixation du facteur eIF4E, je me suis intéressée davantage aux interactions se produisant entre ces deux partenaires. Au cours de cette section, je présenterai la façon dont j'ai procédé afin d'obtenir une localisation plus précise des régions du messager impliquées dans ces interactions, en vue d'une identification des éléments structuraux qui pourraient prendre part dans la fixation de ce facteur.

5.4.2 Approche expérimentale utilisée

L'une des approches permettant de localiser les régions d'ARN interagissant avec la protéine est l'expérience de « *toe-print* », consistant en un arrêt de la rétro-transcriptase par le facteur fixé sur l'ARN, et dont le principe est similaire au « *toe-print* » du ribosome (*cf.* §4.2.2.2).

Dans le cadre de l'étude des interactions entre le facteur eIF4E et les séquences internes du messager de l'histone H3, j'ai effectué ces expériences en deux étapes. La première a consisté en la formation du complexe « *ARN non coiffé-eIF4E* » dans les conditions natives. La seconde étape était la transcription inverse de l'ARN complexé à la protéine, à l'aide des amorces utilisées dans les expériences de sondage en solution, permettant ainsi de couvrir la totalité de la séquence. Enfin, j'ai identifié les arrêts de la rétro-transcriptase par le facteur complexé à l'ARN sur un gel de polyacrylamide dénaturant, parallèlement au séquençage de l'ARN obtenu avec la même amorce.

5.4.3 Résultats et discussions

À la fin des expériences de « *toe-print* » d'eIF4E, j'ai répertorié les arrêts de la rétro-transcriptase par le facteur complexé à l'ARNm d'H3 (*cf.* Fig. 5.11-A-B-C, pistes 2), par comparaison avec les ARNm témoins, soumis aux mêmes conditions expérimentales en absence de cette protéine (*cf.* Fig. 5.11-A-B-C, pistes 1). Les « *toe-print* » du facteur eIF4E sont résumés sur le modèle de la structure secondaire de l'ARNm de l'histone H3 (*cf.* Fig. 5.11-D).

L'analyse de ces résultats montre que de nombreux arrêts de la rétro-transcriptase peuvent être retrouvés dans les trois régions minimales de fixation du facteur eIF4E, mais également en dehors de celles-ci.

Ainsi, au niveau du domaine minimal en 5', il est possible de distinguer les « *toe-print* » du facteur eIF4E dans la boucle interne (C₈₅ et C₈₆) et dans la boucle terminale

5.4 Étude du site de fixation du facteur eIF4E au regard de la structure secondaire de l'ARNm de l'histone H3

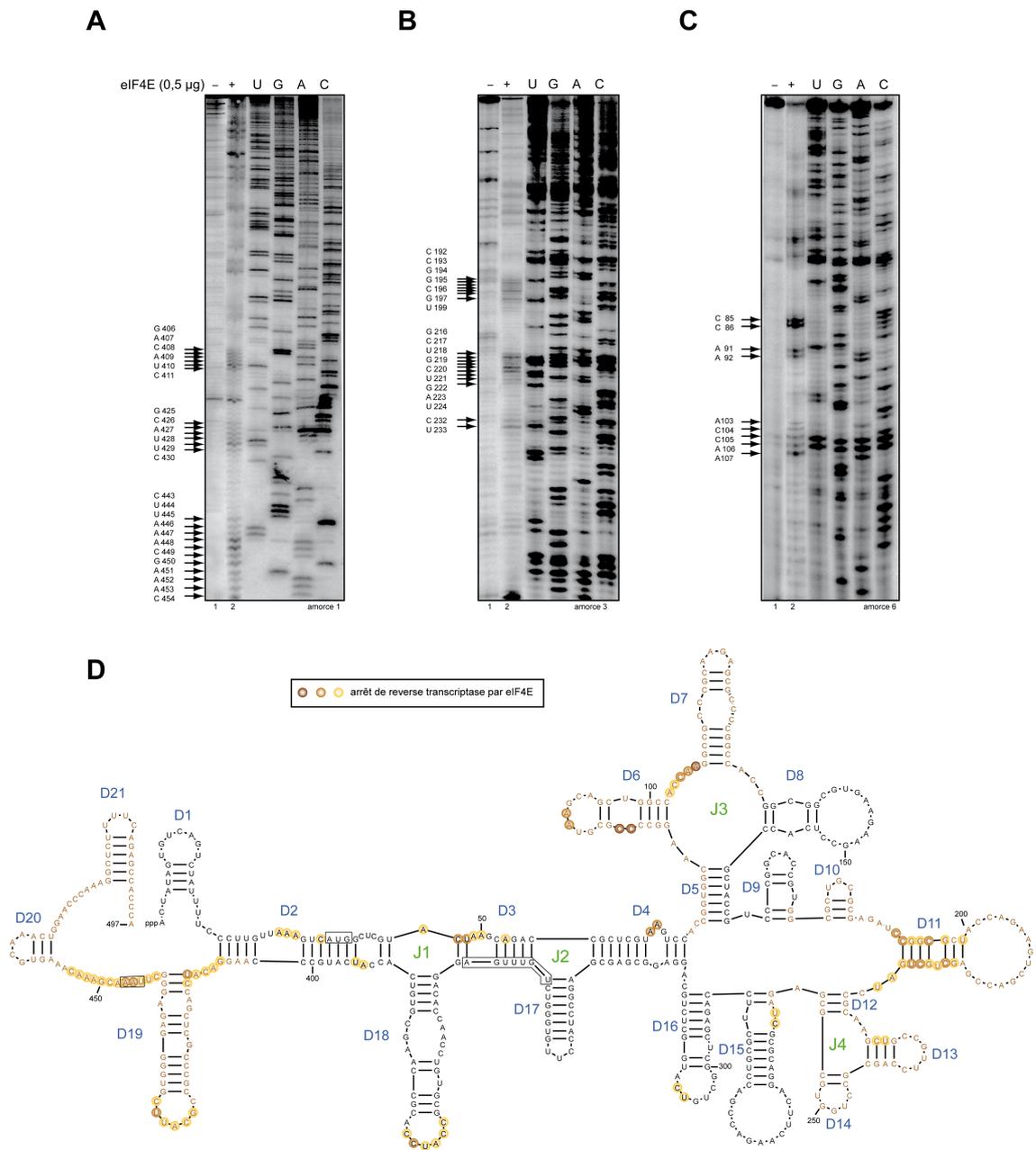


FIG. 5.11 – Identification des motifs structuraux impliqués dans la fixation interne du facteur eIF4E

(A-C) Trois gels représentant les expériences de « toe-print » du facteur eIF4E, obtenus par une transcription inverse des ARNm non coiffés, libres (-) ou complexés à la protéine (+). (D) Représentation des arrêts de la RT spécifiques au facteur eIF4E sur le modèle de la structure secondaire. Les « toe-print » du facteur eIF4E sont symbolisés par des ronds dont l'intensité décroissante est représentée de gauche à droite. Les trois domaines minimaux fixant indépendamment ce facteur sont indiqués par une couleur beige clair. Les codons d'initiation (AUG), de terminaison (UAA) et la séquence consensus UX_2UX_2A sont encadrés.

(A₉₁ et A₉₂) de la structure en épingle à cheveux que forme l'hélice D6. La région simple brin entre les hélices D6 et D7, contenant un site de fixation de Mg²⁺ présente également des arrêts de la RT dus à cette protéine. Ce constat suggère que les ions Mg²⁺ pourraient participer dans les interactions se produisant entre le facteur eIF4E et le messager de l'histone H3. Toutefois, le rôle exact de ces ions dans ces interactions reste à déterminer. Par exemple, ils pourraient être impliqués dans la stabilisation de la structure de l'ARN, nécessaire à la fixation du facteur eIF4E, ou encore stabiliseraient les interactions se produisant entre l'ARN et la protéine.

Dans le cas du domaine central, qui est la région la plus conservée du messager de l'histone H3, ces « *toe-print* » sont principalement observés au niveau des hélices D11 et D13. En particulier, l'hélice D11 est concernée dans sa totalité, suggérant qu'elle pourrait jouer un rôle important dans la fixation du facteur eIF4E.

Le troisième domaine minimal, localisé à l'extrémité 3' de l'ARN, présente des arrêts de la rétro-transcriptase au niveau des régions simples brins entre les hélices D2 et D19 ou encore D19 et D20, qui contient le codon stop. La boucle de la structure en épingle à cheveux D19 semble également participer à la fixation de ce facteur.

Enfin, dans le cas des « *toe-print* » du facteur eIF4E retrouvés en dehors des trois domaines minimaux de fixation de cette protéine, les régions impliquées sont localisées majoritairement dans la partie allongée de cet ARN, et plus particulièrement dans les hélices D2, D3 et D4, et dans la boucle apicale de l'hélice D18. Deux autres « *toe-print* » peuvent également être distingués dans la boucle de l'hélice D16, au cœur de la structure secondaire de l'ARN. Ainsi, les données que j'ai obtenues au cours des expériences de « *toe-print* » du facteur eIF4E suggèrent que les trois hélices (D2, D3 et D4) pourraient constituer un quatrième domaine minimal fixant indépendamment le facteur eIF4E. Ce domaine n'a pas été révélé par la technique d'EMSA (*cf.* §4.3.2.3), car les hélices qui le composent sont toutes trois constituées d'un brin provenant de l'extrémité 5' et d'un brin provenant de l'extrémité 3' de l'ARNm. Ainsi, les ARNm tronqués durant ces

5.4 Étude du site de fixation du facteur eIF4E au regard de la structure secondaire de l'ARNm de l'histone H3

expériences ne possédaient pas simultanément les deux brins nécessaires à la formation de ce domaine.

Il est intéressant de noter que l'hélice D2 contient le codon initiateur AUG et l'hélice D3 une séquence consensus UX₂UX₂A. On pourrait *a priori* s'attendre à ce que cette séquence appartienne à un élément structural de motif 4E-SE, comme cela a été mis en évidence dans l'ARNm d'H4 (*cf. Chap. 2*), de Pim1 et cycline D1 (Culjkovic et al., 2006). Toutefois, au regard de la structure secondaire d'H3, il apparaît que cette séquence consensus n'adopte pas la conformation en double tige boucle constituant ce motif et ne serait donc pas l'équivalent de l'élément H4-12 4E-SE-like. En conséquence, il est possible que cette séquence ne joue pas de rôle dans la fixation du facteur eIF4E ou qu'elle y participe de façon différente à ce qui a été observé dans le cas de l'ARNm d'H4.

L'examen de l'ensemble de ces résultats montre que les « *toe-print* » du facteur eIF4E peuvent être observés en des points pouvant être éloignés au regard de la structure secondaire de ce messenger. Ainsi, comme suggéré en § 4.3.2.3, ces domaines minimaux pourraient soit interagir entre eux au niveau de la structure tridimensionnelle du messenger en vue de la création d'un site pour cette protéine, soit agir sur des régions différentes du facteur eIF4E.

Par ailleurs, l'alignement des séquences homologues, que j'ai réalisé précédemment (*cf. Fig. 5.4*), montre une conservation particulièrement forte au niveau des nucléotides présentant des « *toe-print* », suggérant que le rôle crucial de ces résidus dans la fixation du facteur eIF4E exercerait une pression de sélection sur la séquence de ces messagers.

En conclusion, les expériences de « *toe-print* » du facteur eIF4E sur l'ARNm d'H3 m'ont permis d'affiner la localisation des régions fixant ce facteur et de mieux définir certains motifs structuraux prenant part dans les interactions entre ces deux partenaires. En particulier, un quatrième domaine de fixation du facteur, constitué par

les hélices D2, D3 et D4 a pu être identifié. Enfin, mes résultats ont suggéré que les ions Mg^{2+} pourraient également intervenir dans ces interactions. Pour être validées, ces expériences devront être reproduites dans des conditions où l'intégrité de l'ARNm sondé pourra être vérifiée. En effet, la présence de très peu de produits d'élongation complets dans les pistes contenant le facteur eIF4E suggère que l'ARNm pourrait être dégradé ce qui remettrait en cause les conclusions présentées ceci-dessus. Il conviendra d'inclure un contrôle où l'ARNm sera incubé en présence d'eIF4E, ce dernier étant retiré par extraction au phénol avant l'étape d'élongation par la rétro-transcriptase.

5.5 Conclusions

La présence d'éléments structuraux, cruciaux au démarrage de la synthèse d'H3, ayant été suggérée au sein de son messager (*cf. Chap. 3 et Chap. 4*), il m'a paru indispensable de connaître le repliement en deux dimensions de cet ARN. L'établissement de la structure secondaire d'un ARNm de la taille de celui d'H3 étant relativement complexe, ce projet a occupé la plus grande partie de mon travail de thèse. La construction d'un modèle le plus fidèle possible de cette structure a nécessité deux approches, qui m'ont permis d'apporter des informations sur la participation de certains résidus à la formation d'éléments structuraux au sein de ce messager. La première méthode faisait intervenir des études *in silico*, telles que l'utilisation d'algorithmes de programmation dynamique et les études de covariations de séquences codant pour l'histone H3, provenant d'organismes différents. La seconde approche que j'ai utilisée a été une étude expérimentale qui m'a permis d'identifier par sondage les nucléotides impliqués dans la formation d'hélices et ceux restant libres. Ainsi, j'ai confronté les informations obtenues par ces deux approches afin d'obtenir un modèle de structure secondaire cohérent avec l'ensemble des contraintes évolutives, énergétiques et expérimentales dont je disposais. Celui-ci est caractérisé par une forme compacte, avec un « cœur » constitué par la partie centrale de la séquence codante, qui se replie

sur elle-même, formant une partie allongée et rejetant les UTR à l'extérieur. Enfin, bien que la structure secondaire du messenger d'H3 soit globalement différente de celle de l'ARNm d'H4, il est intéressant de noter que certaines caractéristiques communes à ces deux messagers peuvent être corrélées à leur mode d'initiation de la traduction. En effet, le rejet des UTR à l'extérieur de la structure concorde avec leur caractère non essentiel dans le démarrage de la synthèse de ces histones. De plus, la dissimulation de la coiffe au sein de motifs structuraux pourrait expliquer la faible affinité entre celle-ci et le facteur eIF4E, qui est par conséquent fixé de façon interne sur ces messagers. Dans ce chapitre, j'ai identifié certains motifs structuraux prenant part à son recrutement, en effectuant des expériences de « *toe-print* » de cette protéine sur le messenger non coiffé de l'histone H3. Ainsi, en accord avec mes précédents résultats, des arrêts de la RT spécifiques au facteur eIF4E ont été retrouvés dans les trois domaines minimaux capables de fixer indépendamment cette protéine. De plus, j'ai également identifié un quatrième domaine minimal de fixation de ce facteur. Enfin, malgré une mise en évidence de la différence des motifs structuraux fixant eIF4E entre les ARNm d'H3 et H4, il n'est pas exclu que ceux-ci pourraient présenter des similarités au niveau tridimensionnel et partager la même fonction.

Chapitre 6

Conclusions générales et perspectives

La synthèse massive des histones canoniques durant la phase S du cycle cellulaire a soulevé de nombreuses questions sur la régulation de l'initiation de la traduction de leurs messagers, qui constitue une étape clé dans l'expression génétique.

Au laboratoire, les études menées sur la traduction de l'ARNm de l'histone H4, ont mis en évidence sa grande efficacité et des caractéristiques d'un mode atypique de son initiation, dans lequel la séquence codante de ce messenger joue un rôle prépondérant, notamment de par sa structure. En effet, il a été montré que la séquence codante du messenger d'H4 recrutait le ribosome par l'interaction, avec le facteur de la coiffe eIF4E, de certains éléments structuraux qu'elle contient [résultats non publiés].

Au cours de ma thèse, j'ai entrepris d'étudier plus précisément ces interactions et, grâce aux expériences d'empreinte de ce facteur sur l'ARNm d'H4, j'ai confirmé la participation de la structure H4-12 4E-SE-like, prédite par des expériences d'EMSA sur les ARNm délétés. De plus, j'ai également identifié d'autres éléments structuraux prenant part à cette fixation, notamment les hélices P8, P12 et P12A qui forment une configuration particulière comprenant un pseudonœud. De plus, j'ai révélé des remaniements de la structure secondaire de cet ARNm dûes à la fixation de cette protéine, qui pourraient avoir un impact sur le déroulement de la traduction. Ces

résultats pourraient être complétés par l'identification plus précise des nucléotides cruciaux, au sein de chaque motif structural, dans la fixation de ce facteur, en réalisant des expériences de mutagenèse dirigée couplées à des tests d'EMSA. Par ailleurs, il serait également intéressant de connaître les résidus de la protéine impliqués dans l'interaction avec l'ARNm. Cette fixation pouvant se produire en présence d'analogues de la coiffe, il a été montré que le site spécifique de la coiffe du facteur eIF4E n'était pas impliqué dans cette interaction [résultats non publiés]. L'identification des résidus de la protéine mis en jeu peut s'effectuer grâce aux expériences de retard de migration sur gel, par une discrimination des protéines eIF4E mutées qui présenteraient encore l'affinité pour les séquences internes de l'ARNm d'H4.

Ce mode d'initiation atypique de la traduction de l'ARNm de l'histone H4 m'a conduit à étudier ce processus pour les messagers des trois autres classes d'histones d'octamères (H2A, H2B et H3). Ces histones étant présentes en quantité stœchiométrique, j'ai d'abord cherché à vérifier si leurs ARNm étaient aussi efficacement traduits que celui d'H4. Mes premiers résultats ont toutefois révélé des différences dans le comportement traductionnel *in vitro* de ces messagers et m'ont permis de les classer en deux groupes. D'un côté les ARNm d'H2A et H2B qui ont un niveau de traduction proche de celui des ARNm classiques testés, et de l'autre les messagers d'H3 et H4 qui sont bien plus efficacement traduits. Ces résultats montrant des fortes similitudes entre la traduction des ARNm d'H3 et H4, je me suis demandée si ces messagers ne partageaient pas un même mode d'initiation de la traduction. Ainsi, au cours de ma thèse, je me suis principalement intéressée, à l'étude de ce mécanisme pour l'ARNm d'H3.

Les études de traduction, que j'ai menées sur l'ARNm d'H3, ont révélé le rôle essentiel de sa séquence codante dans ce processus. En effet, mes expériences de gradient de sucrose et de « *toe-print* » des complexes d'initiation ont montré que cette séquence contenait tous les éléments nécessaires à l'assemblage du ribosome sur le bon

codon initiateur, assurant à une traduction efficace, même en l'absence des UTR.

Par ailleurs, la forte inhibition de la traduction de l'ARNm d'H3 en présence d'analogue de la coiffe a montré que ce processus était coiffe dépendant, et nécessitait donc le facteur eIF4E. De plus, les expériences d'inhibition de la traduction par les aptamères ont également montré que le facteur eIF4G, qui forment avec eIF4E et eIF4A le complexe de la coiffe, était également essentiel à la traduction, notamment en raison de ses interactions avec eIF4A et eIF3. La nécessité de l'hélicase eIF4A dans l'initiation de la traduction de ce messenger pourra être vérifiée à l'aide d'aptamères ciblant spécifiquement l'activité de ce facteur (Oguro et al., 2003)(Oguro et al., 2009) ainsi qu'à l'aide d'un mutant de cette protéine, le rendant non fonctionnel et ayant un effet « *dominant négatif* » (Pause et al., 1994). Tandis que l'étude du facteur eIF3 pourra être effectuée, par exemple, grâce à l'utilisation de caspases ou de protéases virales capables de cliver cette protéine (Komar and Hatzoglou, 2005)(Kim et al., 2006). Par ailleurs, il serait intéressant d'identifier d'autres facteurs participant à l'initiation de la synthèse de l'histone H3, et de caractériser leur rôle dans ce processus. Ce point pourra être résolu grâce à de multiples approches expérimentales, parmi lesquelles on retrouve des tests de traduction *in vitro* en présence de certains inhibiteurs ou de protéases rendant inactifs les facteurs en question. Une alternative à cette méthode pourra être une reconstitution de la traduction à partir des facteurs synthétisés et purifiés *in vitro* (Pestova et al., 1998). Des études analogues pourront également être menées sur l'ARNm de l'histone H4.

La forte sensibilité de la traduction de l'ARNm d'H3 à la présence d'analogue de la coiffe a également révélé une affinité plus faible du facteur eIF4E pour la coiffe de cet ARNm que pour celle des messagers classiques. Les expériences d'EMSA ont suggéré que la coiffe ne serait pas impliquée dans le recrutement du facteur eIF4E, qui se ferait, comme cela a été montré pour le messenger d'H4, de façon interne. La recherche du site de fixation de ce facteur, par des expériences d'EMSA sur les ARNm d'H3 délétés progressivement, a mis en évidence trois domaines minimaux d'interaction sur

ce messager. Des analyses plus approfondies, par « *toe-print* » du facteur, m'ont permis de confirmer l'existence de ces domaines, d'en identifier un quatrième, ainsi que de révéler l'implication des ions Mg^{2+} dans cette fixation. Dans la suite de cette étude, il serait intéressant d'approfondir l'analyse des interactions du complexe eIF4E/ARNm d'H3 et de comparer sa spécificité avec d'autres complexes identifiés pour cette protéine, par exemple, en examinant sa constante de dissociation et celles retrouvées dans les interactions canoniques (avec la coiffe des ARNm, (Niedzwiecka et al., 2002)) ou non canoniques (par exemple avec la séquence PTE de l'ARN viral de PEMV, (Wang et al., 2009)). Ce point pourrait être résolu grâce à de multiples méthodes parmi lesquelles on retrouve la calorimétrie isotherme à titration (ITC) (Salim and Feig, 2009) ou encore « *filter binding assay* » (Wang et al., 2009). Par ailleurs, comme cela a été proposé ci-dessus dans le cadre de l'étude de l'ARNm d'H4, des expériences de mutagenèse dirigée sur le messager d'H3 et sur eIF4E, suivies de tests d'EMSA, permettraient d'identifier précisément les résidus de chaque partenaire, cruciaux à cette interaction. Dans le cas de la protéine, il est très probable que ces résidus soient localisés hors de la cavité fixant spécifiquement la « *structure-coiffe* » des messagers, car cette interaction ne semble pas être perturbée par la présence de l'analogue de la coiffe (*cf.* §4.3.2.3).

L'ensemble des résultats que j'ai obtenus précédemment a montré une grande importance de la structure de l'ARNm d'H3, ce qui m'a conduit à établir son repliement secondaire par des approches expérimentales et bioinformatiques. Ainsi, des prédictions de structures reposant sur la minimisation de l'énergie libre, associées à des alignements de séquences et de très nombreuses expériences de sondages chimiques et enzymatiques m'ont permis de proposer un modèle de structure secondaire pour cet ARNm, cohérent avec l'ensemble des informations connues à son sujet.

L'étude du modèle obtenu m'a permis de comprendre le caractère non essentiel des UTR, rejetés hors du cœur de la structure du messager, ainsi que d'expliquer la plus faible affinité entre eIF4E et la coiffe, dissimulée au sein d'éléments structuraux

du messenger d'H3. De plus, l'analyse de la structure secondaire du messenger d'H3 m'a permis d'identifier les éléments structuraux correspondant aux quatre domaines de fixation de ce facteur. Afin de mieux comprendre le rôle des motifs constituant ces éléments structuraux, des expériences de mutagenèse dirigée pourront être réalisées. De plus, il serait intéressant de mesurer l'incidence de la fixation du facteur eIF4E sur la conformation de l'ARNm d'H3. En effet, il n'est pas exclu que la fixation non conventionnelle de ce facteur provoque quelques changements structuraux globaux ou ponctuels, ce qui pourrait avoir un impact sur le déroulement du mécanisme de l'initiation de la traduction. De manière analogue aux études que j'ai menées sur l'ARNm d'H4, cette question pourra être résolue à l'aide d'expériences d'empreinte du facteur eIF4E sur l'ARNm d'H3, qui pourront également apporter des informations supplémentaires sur les résidus d'ARN interagissant avec la protéine.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats a montré une très grande ressemblance des mécanismes d'initiation de la traduction des ARNm d'H3 et H4. Si des différences apparaissent entre les structures secondaires de ces deux messagers, il n'est pas exclu que l'étude de leurs structures tridimensionnelles révèle des motifs structuraux communs, qui pourraient expliquer les similarités observées. La résolution de ces structures pourra être abordée au moyen des multiples méthodes, par exemple grâce aux expériences de cristallographie par diffraction de rayons X ou encore celle de cryo-microscopie électronique, permettant la visualisation directe de la molécule, à des résolutions variant selon la technique utilisée. Sur la base des structures secondaires connues pour ces deux molécules, leurs structures tertiaires pourront également être déterminées par l'intermédiaire d'expériences de sondage mettant en évidence les interactions à longues distances. Ces expériences pourront donc être réalisées à l'aide de sondes ciblant spécifiquement certaines positions des nucléotides qui peuvent être impliquées dans des appariements non canoniques de l'ARN. Parmi les sondes ayant cette spécificité on peut retrouver le DMS modifiant les résidus G à la position N7 ou encore DEPC spécifique du résidu A à la position N7. Il est intéressant de noter,

que dans le modèle de la structure secondaire que j'ai proposé pour le messenger de l'histone H3, plusieurs coupures à la RNase V1 (sonde spécifique du double brin) retrouvé au seins de certaines boucles apicales suggèrent l'existence de ce type d'interactions entre les boucles. Un autre aspect de la structure en 3D pouvant être utilisé pour sa prédiction est la présence des ions qui sont souvent impliqués dans la stabilisation des interactions tertiaires (Shiman and Draper, 2000). Au cours des expériences de sondage, réalisées à l'aide des sondes chimiques DMS et CMCT dans les conditions natives et semi dénaturantes, j'ai pu montrer la sensibilité structurale aux ions magnésiums et potassiums, suggérant leur implication dans la stabilisation de la conformation tridimensionnelle de l'ARNm d'H3. Ainsi, en association avec des expériences complémentaires réalisées à l'aide d'autres sondes, les résultats que j'ai obtenus pour ces expériences pourront être très utiles dans l'établissement de la structure 3D de ce messenger. Ces approches expérimentales étant relativement longues et complexes, une construction des architectures 3D des ARNm d'H3 et H4 pourra être effectuée parallèlement au moyen de programmes bioinformatiques, tels que « *Assemble* », permettant une modélisation simple et rapide à partir de la structure secondaire de ces messagers (Jossinet et al., 2010).

Par ailleurs, afin de mieux comprendre le mécanisme d'initiation de la traduction des ARNm d'H3 et H4, une analyse plus approfondie des complexes ribosomiques fixés sur ces ARNm pourra être réalisée par cryo-microscopie électronique ou par cristallographie. Ces expériences pourraient en effet apporter d'importantes informations structurales sur la localisation des composantes de la machinerie traductionnelle sur les éléments en *cis* de ces messagers et prédire quelles interactions pourraient régir le recrutement et le positionnement correct du ribosome.

Enfin, notons que l'ensemble des résultats concernant la traduction des ARNm d'H3 et H4 se basent sur des expériences menées *in vitro*. Il pourrait donc être important de comparer les résultats obtenus jusqu'ici avec ceux d'expériences similaires réalisées *in vivo*. En effet, il a été montré que pour certains ARN l'obtention de la

conformation fonctionnelle nécessite l'intervention de plusieurs chaperons, qui vont dicter le repliement des molécules d'ARN (Mahen et al., 2005). Ainsi, des expériences de sondage en solution réalisées en employant des sondes ayant la capacité de traverser la membrane cellulaire, telles que les ions Pb^{2+} ou encore le DMS (Lindell et al., 2002), permettraient l'établissement d'un modèle affiné de la structure secondaire des ARNm d'H3 et H4, et ainsi une meilleure compréhension des mécanismes régissant leur traduction.

Dans le cas des histones H2A et H2B, les résultats se sont avérés très différents de ceux obtenus pour les histones H3 et H4, en particulier au niveau de l'efficacité de la traduction *in vitro* de leur messenger, suggérant que ces deux groupes d'histones pourraient faire appel à des modes distincts d'initiation de la traduction. Toutefois, la délétion de leur extrémité 3' permet de retrouver un niveau de traduction très supérieur à celui des messagers classiques, suggérant une possible interaction entre cette région et des éléments structuraux importants au mécanisme d'initiation. A l'issue de ces expériences, j'ai proposé que cette interaction pourrait être empêchée *in vivo* par l'action de la protéine SLBP, ciblant la structure en tige boucle du 3'UTR. Afin de confirmer cette hypothèse, des expériences de traduction *in vitro*, en présence de SLBP peuvent être réalisées. De plus, les histones et la protéine SLBP étant massivement exprimées durant la phase S du cycle cellulaire, il serait également intéressant de comparer l'efficacité la traduction des ARNm des histones d'octamère dans des cellules synchronisées dans cette phase. Au regard de l'effet délétère de l'extrémité 3' sur la traduction des messagers d'H2A et H2B, il serait intéressant de voir comment le ribosome est recruté sur ces ARNm en présence ou en absence de cette région. Ce point pourra être résolu par des expériences de gradient de sucrose et d'arrêt de la rétro-transcriptase par le ribosome, permettant la localisation de ce dernier.

De plus, comme cela avait été observé pour les messagers d'H3 et H4, la traduction des ARNm d'H2A et H2B est très sensible à la présence d'analogue de la coiffe, impliquant d'une part une traduction coiffe dépendante, et de l'autre, une faible

affinité de leur coiffe pour le facteur eIF4E. Il serait donc important d'étudier la structure secondaire de leurs messagers, afin d'identifier le contexte structural dans lequel se situe leur coiffe. La résolution de la structure secondaire de ces deux ARN pourrait également apporter une information sur le repliement de leur 3'UTR et mettre en évidence les éventuelles interactions délétères entre le 3'UTR et d'autres éléments en *cis* importants à la traduction.

Malgré une certaine ressemblance dans la traduction des messagers d'H2A et H2B, quelques différences ont cependant été constatées, suggérant que leurs initiations reposent sur des mécanismes différents. En effet, mes expériences ont montré que la traduction de l'ARNm d'H2A n'était que peu affectée par l'absence de son extrémité 5' non codante, tandis que cette région s'est révélée cruciale à la synthèse de l'histone H2B. Il serait donc intéressant de vérifier si la traduction de l'ARNm d'H2A est initiée par les mêmes mécanismes en absence et en présence de son 5'UTR. Dans ce but, des expériences similaires à celles présentées dans le chapitre 4 pourront être menées sur ce messager. Dans le cas de l'histone H2B, la région 5' non codante s'est révélée importante à la synthèse de cette histone, suggérant que l'initiation de la traduction pourrait emprunter une voie classique ou bien que cette région contiendrait des éléments clés pour la machinerie traductionnelle. Il serait donc intéressant d'étudier davantage cette région. Par exemple, en variant sa taille et en déplaçant le codon AUG, il serait possible de voir si le ribosome est capable de balayer cette région, comme cela est habituellement observé dans la voie classique.

Pour conclure, le modèle actuel, postulant que la protéine SLBP serait responsable de la forte efficacité de traduction des messagers des histones d'octamère (Marzluff et al., 2008), a été remis en question au laboratoire. En effet, les études menées sur la synthèse d'H4, ainsi que les résultats que j'ai obtenus au cours de ma thèse sur la traduction du messenger d'H3, ont infirmé la nécessité du rôle joué par la SLBP dans ce processus, s'appuyant selon nos résultats sur l'importance d'un certain nombre d'éléments structuraux présents au sein de la séquence codante de ces messagers. Dans

le cas des ARNm d'H2A et H2B, dont les résultats ont été différents de ceux obtenus pour les messagers des histones H3 et H4, des caractéristiques d'une initiation atypique de leur traduction ont tout de même été révélées. Ainsi, au delà de l'éventuel rôle joué par la SLBP, le démarrage de la synthèse de ces histones pourrait être régulé à un niveau différent. Enfin, si l'on comprend aujourd'hui mieux comment la traduction des ARNm d'H3 et H4 est initiée, il apparaît nécessaire de mener des études de l'initiation de la traduction des ARNm d'H2A et H2B, aussi approfondies que celle réalisées sur H3 et H4 avant de pouvoir proposer un modèle global de la régulation du démarrage de la synthèse des histones d'octamère.

Annexe A

Matériel et méthodes

A.1 Tampons et solutions couramment utilisés

Tampon TAE ($\times 10$)

40mM Tris-base

5mM acétate de sodium

1mM EDTA

le tout ajusté à pH 7,9 par l'acide acétique

Tampon TBE ($\times 10$)

890mM Tris-Base

890mM acide borique

25mM EDTA pH 8,3

Tampon TE

10mM Tris-HCl pH 8

1mM EDTA

Solution BD « *Bleu Dénaturant* »

40mM	Tris-HCl pH 8,8
4% (p/v)	SDS
4% (v/v)	β -mercaptoéthanol
30% (v/v)	glycérol
0,05% (p/v)	bleu de bromophénol

Solution FD « *Formamide Dye* »

20mM	EDTA
95% (v/v)	Formamide
0,1% (p/v)	bleu de bromophénol
0,1% (p/v)	xylène cyanol

Solution SD « *Sarkosyl Dye* »

20% (v/v)	Glycérol
25mM	EDTA
2% (p/v)	sarkosyl
0,3% (p/v)	bleu de bromophénol
0,3% (p/v)	xylène cyanol

A.2 Matériel biologique

Les matériels biologiques, que j'ai utilisés tout au long de ma thèse, sont des constructions que j'ai réalisées au cours de mon stage de master. Il s'agit de clones des gènes d'histones H2A, H2B et H3, insérés dans des plasmides pUC19.

Brièvement, les gènes d'histones ont été amplifiés à partir de l'ADN génomique de la souris grise (*Mus musculus*) selon le protocole de la PCR, à l'aide d'amorces comportant à leur extrémité 5' un site de restriction EcoRI. Les gènes

d'histones ainsi amplifiés ont été insérés dans le plasmide pUC19 selon le protocole décrit précédemment par (Narang and Seawright, 1993). Après la transformation par électroporation de la souche TB1 d'*Escherichia coli* (selon le protocole décrit par Dower et ses collègues (Dower et al., 1988)) en présence des constructions ainsi obtenues (pUC19-H2A, pUC19-H2B et pUC19-H3), la recherche des clones contenant les inserts désirés (parmi les clones résistants à l'ampicilline) a été effectuée par PCR, à l'aide d'amorces complémentaires aux gène d'histones. Enfin, après la vérification de la séquence des gènes clonés, les constructions souhaitées ont été amplifiées et purifiées à l'aide d'une maxipréparation selon le protocole fourni par le fabricant (« *Jet Star Maxi 2* », Genomed).

A.3 Techniques couramment utilisées

A.3.1 Précipitation des acides nucléiques

La précipitation des acides nucléiques est une méthode permettant la concentration de l'ARN ou de l'ADN et d'éliminer certaines substances solubles dans l'éthanol. Un volume de solution d'acides nucléiques est précipité par 1/20 de volume de 5M NaCl et de 3 volumes d'éthanol absolu. Le tout est ensuite placé à -20°C pendant 30 min ou à -80°C pendant 10 min, puis centrifugé à 12 000×g pendant 15 min. Le culot d'acides nucléiques est ensuite lavé par 2 volumes d'une solution éthanol 80% pendant 5 min, afin d'éliminer le sel, puis séché sous vide durant 5 min et enfin repris dans de l'eau milliQ ou un tampon approprié à une concentration souhaitée.

A.3.2 Extraction au phénol et phénol/chloroforme

L'extraction au phénol et phénol/chloroforme est une technique courante, permettant la séparation des acides nucléiques des protéines. Un volume de phénol ou de phénol/chloroforme, saturé en tampon 200mM Tris-HCl pH8, est ajouté à la solution aqueuse contenant un mélange d'acides nucléiques et de protéines, puis agité vigoureusement sur un vortex environ 20 sec. Le tube est ensuite centrifugé pendant 2 min à température ambiante, à 12 000×g et la phase aqueuse supérieure, contenant les acides nucléiques, est soigneusement prélevée en évitant d'entraîner les protéines dénaturées, situées à l'interphase phénol-eau.

A.3.3 Amplification en chaîne par polymérisation (PCR « *Polymerase Chain Reaction* »)

La PCR est une technique qui consiste en une amplification exponentielle de l'ADN et implique plusieurs cycles répétés de trois étapes (dénaturation-hybridation-élongation), chacune étant définie par une température différente (Mullis et al., 1986).

L'amplification est réalisée dans un volume de 50µl de tampon (10mM Tris-HCl, pH 8.8 ; 50mM KCl ; 1,5mM MgCl₂) en présence de 100ng de matrice d'ADN, 0,25mM de chacun des dNTP, 2µM d'amorces (sens et anti-sens) et 1U d'ADN polymérase DyNAzyme EXT (Finnzymes).

25 cycles de PCR ont été réalisés dans un appareil automatisé (Applied Biosystems) suivant les étapes :

- Etape de dénaturation : 15 sec à 95°C (52 sec au premier cycle)
- Etape d'hybridation d'amorces : 15 sec à 55°C
- Etape d'élongation d'amorces : 1 min à 72°C (7 min au dernier cycle)

Les produits amplifiés par PCR ont été contrôlés par électrophorèse d'une aliquote du milieu réactionnel (5 μ l, additionné à 5 μ l d'une solution SD) sur gel d'agarose 1,5% à 50V pendant 1h dans un tampon TAE, et les produits ont été visualisés sous UV, après l'immersion du gel dans une solution de bromure d'éthidium. Les 45 μ l restant du milieu réactionnel ont été purifiés par une extraction au phénol et phénol/chloroforme. Le mélange contenant l'ADN a été précipité par l'éthanol absolu, puis lavé, séché et repris dans de l'eau milliQ ou un tampon approprié à la concentration souhaitée.

A.3.4 Transcription par la T7 ARN polymérase

La transcription par la T7 ARN polymérase a été réalisée à partir d'une matrice d'ADN, préalablement préparée par PCR à partir des plasmides pUC19 contenant les quatre classes d'histones. Cette PCR a été effectuée à l'aide des amorces « *sens* », contenant une séquence promotrice de l'ARN polymérase du phage T7 en 5', suivie d'une séquence de 20 nucléotides complémentaires aux régions des gènes d'histones désirées et des amorces « *anti-sens* » s'achevant au nucléotide souhaité en 3' du gène. En résumé, cette technique permettait donc de synthétiser des fragments des gènes entiers ou délétés de leur différentes parties 5' ou 3' et contenant une séquence promotrice de l'ARN polymérase du phage T7 en 5'.

La transcription a donc été réalisée sur 10 μ g de matrice issue de la PCR, dans 100 μ l du milieu de transcription (40mM Tris-HCl, pH 8.1; 22mM MgCl₂; 1mM spermidine; 5mM dithiothréitol; 0,01% (v/v) Triton X-100) contenant 5mM d'ATP, de CTP, d'UTP, et de GTP, ainsi que 40U de RNAsin (Promega) et 300U de T7 ARN polymérase.

Afin d'obtenir un transcrit coiffé en 5', la GTP est remplacée par 0,5mM d'analogie de la coiffe (m⁷GpppG) (New England Biolabs), puis rajoutée à raison de

2 μ l toutes les 10 min jusqu'à l'obtention d'une concentration finale en GTP de 5 mM (5 additions).

Un précipité blanc de pyrophosphate inorganique se forme fréquemment après une heure d'incubation à 37°C, l'ajout de 2 μ g de pyrophosphatase de levure (Roche) permet ainsi de dégrader ce pyrophosphate et de déplacer l'équilibre vers la synthèse d'ARN. Après 30 min d'incubation à 37°C, la réaction de transcription est suivie d'une hydrolyse des matrices de transcription par 2U de DNase I (New England Biolabs) durant une heure à 37°C.

Les produits de transcription sont ensuite analysés par un dépôt des aliquotes des milieux réactionnels (0,5 μ l + 9,5 μ l de la solution FD) sur un gel de polyacrylamide 6% dénaturant, puis soumis à une séparation électrophorétique de 1h30 à 100V dans un tampon TBE. Les produits de contrôle ont été visualisés sous UV, après immersion du gel dans une solution de bromure d'éthidium. Le reste du milieu réactionnel est soumis à une purification.

A.3.5 Purification des ARN transcrits

La purification des ARN issus de la transcription consiste à séparer les produits attendus des transcrits incomplets, ainsi que des NTP restants, sur un gel de polyacrylamide 8%. Après une migration de ~3h à une puissance de 29Watt, les bandes correspondant aux ARN transcrits souhaités sont localisées sous UV, puis découpées du gel et placées dans des cuves d'électroélution (Biorad). Ces cuves comportent deux membranes semi-perméables au tampon TBE (stérilisé par autoclave) entre lesquelles est placée une membrane semi-perméable aux ARN. Parmi les deux compartiments ainsi formés, la bande contenant l'ARN d'intérêt est placée dans le compartiment (de 11ml) situé du côté opposé de celui de rétention d'ARN (de 800 μ l). Le tout est soumis

à un champ électrique de 160V durant 2h, puis les ARN sont prélevés deux fois et précipités à l'éthanol absolu.

A.3.6 Marquage radioactif des acides nucléiques

A.3.6.1 Marquage radioactif de l'extrémité 5' par la T4 polynucléotide kinase

Le marquage radioactif de l'extrémité 5' a été couramment utilisé pour les amorces d'ADN composées d'une vingtaine de nucléotides, impliquant une T4 polynucléotide kinase (PNK) qui catalyse le transfert du phosphate terminal de l'ATP à l'extrémité 5' hydroxyle de l'ADN ou ARN (Silberklang et al., 1977).

Le marquage en 5' a été réalisé dans un volume de 50 μ l de tampon PNK (70mM Tris-HCl, pH 7.6 à 25°C; 10mM MgCl₂; 5mM DTT) contenant 10 μ M d'oligonucléotide, 40 μ Ci de [γ -³²P] ATP (3000 Ci/mmmole, Amersham) et 5U de T4 polynucléotide kinase, le tout incubé 30 min à 37°C. La réaction est ensuite arrêtée par une incubation de 10 min à 65°C et le milieu réactionnel est soumis à une purification.

La purification des oligonucléotides marqués est réalisée sur une colonne de résine Sephadex-G25 (Pharmacia), préparée dans une seringue de 1ml, dont le fond est tapissé d'une fine couche de laine de verre stérile. Après avoir éliminer le surplus d'eau de la résine par une centrifugation à 1000 \times g pendant 5 min, le milieu réactionnel est déposé sur la colonne puis resoumis à une centrifugation à 1000 \times g pendant 5 min. Les oligonucléotides marqués sont ensuite précipités par éthanol, puis lavés, séchés et repris dans de l'eau milliQ. Une aliquote d'amorce radioactive (1 μ l) est comptée en mode Cerenkov, puis ajustée au nombre de cpm souhaités.

A.3.6.2 Marquage radioactif de l'extrémité 3' par la T4 ARN ligase

Le marquage radioactif de l'extrémité 3' d'un ARN (England and Uhlenbeck, 1978) est réalisé dans un volume de 25 μ l de tampon T4 ARN ligase (50mM HEPES-NaOH pH 7.5 ; 10mM MgCl₂ ; 5mM DTT et 1mM ATP) en présence de DMSO 10%, 10 μ Ci de [5'-³²P]pCp (3000Ci/m mole, Amersham) et 1U de la T4 ARN ligase. Le tout est incubé à 4°C pendant la nuit et arrêté par une addition de 25 μ l de solution FD, puis purifié sur un gel de polyacrylamide 8%. Après une migration de ~3h à une puissance de 29Watt, les bandes correspondantes aux ARNm radioactifs souhaités sont localisées par autoradiographie, puis découpées du gel et les ARN sont élués passivement dans un tampon d'éluion (10mM Tris-HCl pH 7.5 ; 0,3M NaCl ; 0,5mM EDTA) pendant une nuit à 4°C. L'ARN est ensuite précipité par l'éthanol absolu, lavé à éthanol 80%, séché et repris dans de l'eau milliQ ou un tampon approprié. Une aliquote d'ARN radioactif (1 μ l) est comptée en mode Cerenkov, puis ajustée au nombre de cpm souhaités.

A.4 Traduction des transcrits

A.4.1 Traduction dans le lysat du réticulocyte de lapin (RRL, « *Rabbit Reticulocyte Lysate* »)

La traduction dans le système RRL (Promega) est réalisée sur 5pmol d'ARNm préalablement dénaturé par chauffage à 90°C pendant 2 min puis refroidi dans la glace. La réaction de traduction s'effectue pendant 1h à 30°C dans un volume de 20 μ l du milieu réactionnel contenant 10 μ l de RRL (apportant tous les composants nécessaires à une traduction dont les ribosomes, les ARNt et les facteurs de traduction), un mélange des 19 acides aminés sans méthionine (75 μ M final), 3,75 μ Ci de L-[³⁵S]-Méthionine (1000Ci/m mole) et 20U de RNasin. Dans le cas d'un marquage à la leucine, le milieu

réactionnel contient le mélange d'acides aminés sans leucine à une concentration de $50\mu\text{M}$ et $0,1\mu\text{Ci}$ de [^{14}C]-Leucine (306mCi/mmol). La réaction est ensuite arrêtée par une addition de $10\mu\text{l}$ de la solution de bleu dénaturant (BD) puis analysée par une séparation électrophorétique sur gel d'ABA dénaturant pour protéines.

Deux μl du mélange réactionnel sont prélevés, additionnés à $8\mu\text{l}$ de solution BD, chauffés à 95°C pendant 2 min puis déposés sur gel dénaturant-SDS contenant 15% d'ABA. La séparation électrophorétique est effectuée durant 2h à 100V dans un tampon Tris-glycine (25mM Tris-base ; 192mM glycine ; 0,1% SDS). Les gels sont ensuite colorés dans la solution de bleu de Coomassie, (1g/l (p/v) bleu de Coomassie, 50% (v/v) méthanol, 0,1% (v/v) acide acétique) puis décolorés dans une solution d'acide acétique 7% (v/v), éthanol 5% (v/v) et séchés pendant 2h avant d'être exposés à l'Image Plate (IP).

A.4.2 Traduction dans les extraits du germe de blé (WGE, « *Wheat Germ Extract* »)

La traduction des ARNm dans le système de l'extrait du germe de blé s'effectue d'une manière analogue à celle effectuée dans le système RRL, excepté que la température d'incubation est de 25°C dans le WGE. À la fin de la réaction, $10\mu\text{l}$ de la solution de BD sont rajoutés au milieu réactionnel et $5\mu\text{l}$, du mélange obtenu sont déposés sur gel analytique.

A.4.3 RT-PCR « *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* »

Les expériences de RT-PCR ont été effectuées en parallèle des expériences de traduction, dans le but d'une vérification de l'intégrité des ARNm dans le milieu traductionnel, selon un protocole précédemment décrit (Li and Wang, 2004). $0,25\text{pmol}$

d'ARN traduits ont été prélevés au début de la réaction (t_0) et à la fin de celle-ci (t_{60}), puis purifiés par extraction au phénol et phénol/chloroforme et précipités à l'éthanol absolu. Le culot d'ARN a ensuite été lavé, séché et repris par $8\mu\text{l}$ d'eau milliQ. La réaction de la transcription inverse de ces ARN a été effectuée dans un tampon de AMV (50mM Tris-HCl, pH 8.5 à 25°C ; 8mM MgCl_2 ; 30mM KCl et 1mM DTT) en présence de $333\mu\text{M}$ de chacun des dNTP et de 0,5U de rétro-transcriptase AMV (Fermentas), pendant 1h à 37°C. Les produits de la transcription inverse (ADNc) sont ensuite purifiés par extraction au phénol, phénol/chloroforme, puis précipités à l'éthanol absolu. Enfin, l'amplification de l'ADN a été réalisée selon le protocole standard de la PCR, à l'aide des amorces appropriées, et les produits de la réaction ont été vérifiés sur gel d'agarose 1,5%, migrés à 50V pendant 1h dans un tampon TAE, puis visualisés sous UV, après l'immersion du gel dans une solution de bromure d'éthidium.

A.5 Sondage en solution des ARN

Les conditions optimales de la réaction ont été adaptées à partir des protocoles standards établis précédemment (Brunel and Romby, 2000)(Ehresmann et al., 1987) (Peattie and Gilbert, 1980)(Kawagoe-Takaki et al., 2006)(James and Sargueil, 2008) (Felden et al., 1997)(Wilkinson et al., 2005)(Merino et al., 2005).

A.5.1 Sondage enzymatique

Le sondage enzymatique en solution est effectué sur $0,1\mu\text{g}$ d'ARN (ou 25 000 cpm d'ARN marqué en 3' au [^{32}P]pCp) préalablement dénaturé à 90°C pendant 2 min puis refroidi dans la glace. La réaction est effectuée dans un milieu réactionnel de $20\mu\text{l}$ contenant 80mM HEPES (pH 7.5), 50mM KCl, 10mM MgCl_2 , 2mM de Vanadyl (inhibiteur de RNase, New England Biolabs) accompagné de 2U de RNasin (inhibiteur

de RNase, Promega) et de 0,1 μ g d'ARNt total de levure. Le tout est incubé à 20°C pendant 5 min en présence de (1,1 ou 1,5 U \times 10⁻⁴) de RNase V1 ; (6,7 ou 7 U \times 10⁻², additionné de 0,1mM de Zn²⁺) de RNase S1 ou de 0,1U de RNase T1, puis arrêté dans la glace par une addition de 1 μ g/ μ l d'ARNt total de levure 12,5mM d'EDTA, extrait au phénol, phénol/chloroforme et précipité par l'ajout de 1 μ l de 5M NaCl et de 60 μ l d'éthanol absolu.

A.5.2 Sondage chimique

Le sondage chimique est effectué sur 0,1 μ g d'ARN, préalablement dénaturé à 90°C pendant 2 min puis refroidi dans la glace.

La réaction de DMS dans les conditions natives est effectuée dans un milieu de 20 μ l contenant 80mM HEPES (pH 7.5), 50mM KCl, 10mM MgCl₂, 2mM de Vanadyl, tandis que le milieu réactionnel du CMCT contient 80mM Borate-NaOH (pH 8), 50mM KCl, 10mM MgCl₂, 2mM de Vanadyl. Dans les conditions semi-dénaturantes, le tampon réactionnel pour les sondes DMS et CMCT est dépourvu des ions magnésiums et potassiums, et additionné de 5mM EDTA. Après une incubation de 5 min à 20°C, dans le milieu réactionnel sont ajoutés : 1 μ g d'ARNt total de levure et 10% d'une dilution de DMS ou 4 μ g/ μ l de CMCT. Le tout est ensuite incubé durant 5 à 20 min respectivement. La réaction est arrêtée dans la glace suivi d'une précipitation à l'éthanol absolu 100%.

La réaction aux ions plombs s'effectue dans un milieu réactionnel de 20 μ l contenant 80mM HEPES (pH 7,5), 50mM KCl, 10mM MgCl₂, 2mM de Vanadyl (inhibiteur de RNase, New England Biolabs) en présence de 1 μ g d'ARNt total de levure et de 10mM d'acétate de plomb à 20°C pendant 5 min. La réaction est ensuite arrêtée dans la glace par une addition de 1 μ g/ μ l d'ARNt total 12,5mM d'EDTA et les produits de la réactions sont précipités par l'ajout 1 μ l de 5M NaCl et de 60 μ l d'éthanol absolu.

La réaction de la sonde NMIA s'effectue dans un milieu réactionnel de 20 μ l contenant 100mM HEPES (pH 8), 10mM MgCl₂ 100mM NaCl 2mM de Vanadyl (inhibiteur de RNase, New England Biolabs) en présence de 1 μ g d'ARNt total de levure et de 30mM de sonde NMIA à 37°C pendant 45 min. Le milieu réactionnel est ensuite placé dans la glace et précipité par l'ajout de 1 μ l de 5M NaCl et de 60 μ l d'éthanol absolu.

Dans le cas du clivage spontané de l'ARN, les expériences ont été effectuées selon le protocole précédemment décrit (Nahvi et al., 2002)(Mandal and Breaker, 2004). 0,1 μ g d'ARN ont été incubés dans un tampon contenant 50mM Tris-HCl, pH 8.3 à 25°C, 20mM MgCl₂, et 100mM KCl, pendant 40h à température ambiante. La réaction est arrêtée dans la glace puis additionnée de solution FD.

A.5.3 Détection des coupures ou des modifications obtenues au cours des expériences sondages en solutions

A.5.3.1 Détection directe des coupures des ARN radioactifs

Les ARN radioactifs sondés selon le protocole du sondage en solution de l'ARN, sont repris dans une solution de FD et la radioactivité est comptée en mode Cerenkov. Des quantités équivalentes sont ensuite déposées sur un gel de polyacrylamide 8% et les ARN sont séparés par l'électrophorèse.

Deux témoins ont été migrés en parallèle, constituant l'échelle de séquence d'ARN étudié, obtenus par une hydrolyse alcaline et à la RNase T1 en conditions dénaturantes (coupant tout les résidus G de la séquence en question). Le premier témoin est obtenu par l'incubation de 25 000 cpm d'ARN marqué en 3' au [³²P]pCp dans un milieu réactionnel de 10 μ l contenant 80mM de Na₂CO₃ et 80mM de NaHCO₃, le tout ajusté à pH 9, en présence de 1 μ g d'ARNt totale de levure, à 90°C pendant 3 min, puis

placé dans la glace additionné de 4 μ l de solution FD. Le deuxième témoin, coupé par la RNase T1 en condition dénaturante est effectué selon le protocole décrit par Peattie & Gilbert (Peattie and Gilbert, 1980).

La migration électrophorétique des échantillons est effectuée dans les conditions dénaturantes durant ~4h à température ambiante dans un tampon TBE. Le gel est ensuite fixé dans l'acide trichloroacétique 10% pendant 15 min puis séché à 80°C pendant 2h avant être autoradiographié et exposé à l'Image Plate (IP).

A.5.3.2 Détection indirecte des coupures ou modifications

La détection indirecte des coupures ou des modifications s'effectue sur les ARN sondés selon le protocole du sondage en solution de l'ARN. Ces ARN, non marqués, sont préalablement hybridés à 100 000cpm d'amorce (permettant de visualiser une région spécifique de l'ARN) par chauffage à 90°C pendant 2 min puis un refroidissement immédiat dans la glace. La réaction est suivie d'une incubation à 20°C pendant 5 min dans un tampon MMLV (10mM Tris-HCl, pH8 à 25°C ; 15mM de KCl, 0,6mM MgCl₂ et 2mM DTT) ou dans un tampon de AMV (50mM Tris-HCl, pH 8.5 à 25°C ; 8mM MgCl₂ ; 30mM KCl et 1mM DTT) en présence de 333 μ M de chacun des dNTP. Le milieu réactionnel est ensuite rajouté de 5U de rétro-transcriptase MMLV (Promega) ou de 0,5U de rétro-transcriptase AMV (Fermentas) puis incubé pendant 1h à 37°C. La réaction est arrêtée par une précipitation à l'éthanol absolu.

Le séquençage de l'ARN (Felden et al., 1997) est effectué en parallèle sur un ARN non sondé, hybridé à 100 000cpm de la même amorce selon le protocole décrit ci-dessus. Le séquençage s'effectue à l'aide d'une rétro-transcriptase AMV sur quatre tubes contenant 100 μ M de chacun des dNTP (sauf dXTP), 25 μ M dXTP et 3,33 μ M ddXTP (avec X représentant chacun des quatre nucléotides). L'élongation s'effectue ensuite pendant 1h à 37°C puis arrêtée dans la glace et précipitée à l'éthanol absolu.

La migration électrophorétique des échantillons est effectuée dans les conditions dénaturantes durant ~4h à température ambiante dans un tampon TBE. Le gel est ensuite fixé dans l'acide trichloroacétique 10% pendant 15 min puis séché à 80°C pendant 2h avant être autoradiographié et exposé à l'Image Plate (IP).

A.6 Étude des interactions ARN/protéines

A.6.1 Gel de retard (EMSA, « *Electrophoretic Mobility Shift Assay* »)

L'expérience d'EMSA a été effectuée sur 25 000 cpm d'ARN marqués en 3' au [³²P]pCp préalablement dénaturés à 90°C pendant 2 min et renaturés dans la glace. Le milieu réactionnel de 20µl final contenant 10mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM KCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT glycérol 10% (v/v) 40µg d'ARNt total de levure est additionné de 0,5µg de la protéine (ou bien d'une gamme de concentrations croissantes de protéine, eIF4E, préalablement dialysée contre le tampon de la réaction). Le tout est incubé pendant 20 min dans la glace puis soumis à une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 5%, dans les conditions natives en présence du tampon Tris-Glycine (50mM Tris-base ; 50mM Glycine). L'électrophorèse de ce gel est effectuée à +4°C durant ~1h sous une puissance de 3Watt maximum. Le gel est ensuite séché et exposé à l'Image Plate (IP).

A.6.2 Empreinte de la protéine sur l'ARN

L'expérience d'empreinte s'est effectuée sur 0,1µg d'ARN (H4) complexé à 1,33µM finale de la protéine (eIF4E) selon les conditions utilisées dans les expériences d'EMSA. Les complexes ainsi obtenus sont soumis à une hydrolyse enzymatique par

$1, 1 \times 10^{-4} \text{U}/\mu\text{l}$ de RNase V1 ou par $6, 7 \times 10^{-2} \text{U}/\mu\text{l}$ de RNase S1, selon les conditions décrites dans la partie du sondage enzymatique. La réaction est ensuite arrêtée dans la glace par une addition de $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ d'ARNt total de levure 12,5mM d'EDTA. Les produits de la réaction sont ensuite extraits au phénol, phénol/chloroforme, puis précipités par l'ajout d'un μl de 5M NaCl et de $60 \mu\text{l}$ d'éthanol absolu. Les coupures spécifiques aux deux sondes utilisées sont révélées selon le protocole de la détection indirecte décrite en (cf. §A.5.3.2).

En parallèle du séquençage obtenu avec la même amorce, les échantillons sont ensuite fractionnés sur un gel de polyacrylamide dénaturant 8% durant $\sim 4\text{h}$ à température ambiante dans un tampon TBE. À la fin de la migration, le gel est ensuite fixé dans l'acide trichloroacétique 10% puis séché à 80°C pendant 2h avant être autoradiographié et exposé à l'Image Plate (IP).

A.7 Expériences de « *toe-printing* »

L'expérience de « *toe-print* » du ribosome a été adaptée de (Pestova et al., 1996) (Wilson et al., 2000)(Sachs et al., 2002). Cette expérience s'effectue sur 250nM d'ARN préalablement dénaturés à 90°C pendant 2 min puis renaturés dans la glace, dans un milieu contenant le tampon A (20mM Tris-HCl, pH 7.6; 100mM KAc; 2,5mM $\text{Mg}(\text{Ac})_2$; 2mM DTT; 1mM ATP; 0,1mM GMP-PNP et 0,25mM de spermidine) additionné de 50% (v/v) de RRL, 1U RNasin (inhibiteur de RNase, Promega) de 2mM de GMP-PNP ou de $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de cycloheximide. Le tout est incubé à 30°C pendant 5 min, et à la fin de la réaction, l'échantillon est placé dans la glace, puis centrifugé deux fois à $100\,000 \times g$ pendant 1h (Beckman). Le culot est ensuite repris dans du tampon A puis soumis à une transcription inverse par l'AMV.

L'étape de l'élongation commence par l'hybridation de 4pmol d'oligonucléotide marqués en 5' au $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ à 30°C pendant 3 min. Après l'ajout de 2mM de chacun

des dNTP, 5mM MgCl₂, 1U RNasin et 0,5U d'AMV, le milieu réactionnel est incubé à 30°C pendant 45 min.

En parallèle du séquençage obtenu avec la même amorce, les échantillons sont ensuite fractionnés sur un gel de polyacrylamide dénaturant 8%. À la fin de la migration, le gel est ensuite fixé dans l'acide trichloroacétique 10% puis séché à 80°C pendant 2h avant être autoradiographié et exposé à l'Image Plate (IP).

Les expériences de « *toe-print* » du facteur eIF4E s'effectuent de manière analogue à celle du « *toe-print* » du ribosome, excepté que la formation du complexe « *ARN-eIF4E* » est réalisée sur 0,1µg d'ARN, selon les conditions de l'expérience d'EMSA.

A.8 Séparation des complexes ribosomiques sur gradient de sucrose

Les expériences de gradient de sucrose consistent à séparer les ARN fixés aux complexes ribosomiques et ceux restant libres sur le gradient de sucrose. Au cours de ces expériences, le recrutement des ribosomes sur les ARN en question est effectué de manière analogue aux expériences de « *toe-print* » du ribosome, sur les ARN marqués en 3' au [³²P]pCp, préalablement dénaturés à 90°C pendant 2 min puis renaturés dans la glace. L'incubation à 30°C dure 5 min, dans un milieu contenant le tampon A (20mM Tris-HCl, pH 7.6 ; 100mM KAc ; 2,5mM Mg(Ac)₂ ; 2mM DTT ; 1mM ATP ; 0,1mM GMP-PNP et 0,25mM de spermidine) additionné de 50% (v/v) de RRL, 1U RNasin (inhibiteur de RNase, Promega) de 2mM de GMP-PNP ou de 1µg/µl de cycloheximide.

Le milieu réactionnel est ensuite déposé sur le gradient linéaire de sucrose (7-47%), obtenu par un mélange continu de deux solutions de sucrose 7% et 47% dans un tampon B (25mM Tris-HCl, pH7.4 ; 50mM KCl ; 5mM MgCl₂ et 1mM DTT).

A.8 Séparation des complexes ribosomiques sur gradient de sucrose

Les échantillons sont ensuite soumis à une ultracentrifugation à 37 000 rpm (dans le rotor SW41, Beckman) pendant 2,5h à 4°C. Une fois la centrifugation accomplie, les gradients de sucrose sont fractionnés en plusieurs échantillons à l'aide d'un dispositif préleveur et la radioactivité est comptée pour chaque fraction en mode Cerenkov.

Annexe B

Abbréviations

#0-9

4E-SE eIF4E Sensitive Element

A

A Adénine

ADN Acide désoxyribonucléique

ADNc ADN complémentaire

Ala Alanine

AMV Avian Myeloblastosis Virus

Apaf-1 Apoptotic protease activating factor 1

Arg Arginine

ARN Acide ribonucléique

ARNm ARN messenger

ARNr ARN ribosomique

ARNpré-m ARN pré-messenger

ARNt ARN de transfert

CHAPITRE B : *Abbreviations*

ASF-1	Anti-Silencing Function-1
ATP	Adenosine Triphosphate
Asn	Asparagine
Asp	Acide aspartique

B

Bag-1	Bcl2 associated athanogene-1
Bip	Immunoglobulin heavy chain Binding Protein
BMV	Brome Mosaic Virus

C

C	Cytosine
CAF-1	Chromatin Assembly Factor 1
CDK1	Cyclin-Dependent Kinase 1
CDK2	Cyclin-Dependent Kinase 2
CH	Cycloheximide
CITE	Cap Independent Translation Element
CP	Coat Protein
CPSF	Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor
CrPV	Cricket Paralysis Virus
CycA	Cycline A
Cys	Cystéine

E

eIF	eukaryotic Initiation Factor
EMCV	Encephalomyocarditis Virus

EMSA Electrophoretic Mobility Shift Assay

F

FGF-2 Fibroblast Growth Factor 2

fLuc firefly Luciferase

FMDV Foot and Mouth Disease Virus

G

G Guanine

GAP GTPase Activating Protein

Gcn5 General control nonderepressable 5

GFP Green Fluorescent Protein

Gln Glutamine

Glu Acide glutamique

Gly Glycine

GTP Guanosine Triphosphate

Gtx Gtx homeodomain Transcription Factor

H

H4-12 4E-SE-like élément de l'histone H4-12 similaire à 4E-SE

HAV Hepatitis A Virus

HCV Hepatitis C Virus

HDE Histone Downstream Element

His Histidine

I

Ile Isoleucine
IRES Internal Ribosome Entry Sites
ITAF IRES Trans-Acting Factor

L

La Lupus antigen
Leu Leucine
Lys Lysine

M

Met. Méthionine
Mét-ARNt^{Met}₁ ARNt initiateur
MMLV Moloney Murine Leukemia Virus
Mnk1 Map kinase-actived protein kinase 1

N

N Nucléotide
NASP Nuclear Autoantigenic Sperm Protein
NAP-1 Nucleosome Assembly Protein 1

O

ORF Open Reading Frame

P

PABP	Poly(A) Binding Protein
PCBP	Poly(C) Binding Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEMV	Pea Enation Mosaic Virus
Phe	Phénylalanine
poly(A)	Polyadenosine
Pro	Proline
PSL	Photostimulated luminescence
PTB	Polypyrimidine-Tract-Binding Protein
PTE	PEMV RNA 2 cap independent Translation Element
PV	Poliovirus
Pyl	Pyrrolysine

R

RNase	Ribonucléase
RRL	Rabbit Reticulocyte Lysat
RRM	RNA Recognition Motif
RT	Reverse Transcriptase

S

Sec	Sélénocystéine
Ser	Sérine
SLBP	Stem-Loop Binding Protein
SLIP1	SLBP Interacting Protein 1
snRNA	small nuclear RNA

CHAPITRE B : *Abbreviations*

snRNP small nuclear RiboNucleoProtein

T

Thr Thréonine

Trp Tryptophane

Tyr Tyrosine

U

U Uracil

U7 snRNP U7 small nuclear RiboNucleoProtein

unr upstream of N-ras

UTR UnTranslated Region

V

Val Valine

VCE Vaccina Virus Capping Enzyme

VIH Virus de l'immunodéficience humaine

W

WGE Weat Germ Extract

Z

ZFP100 Zinc Finger Protein 100kDA

Bibliographie

- [Acker and Lorsch, 2008] Acker, M. and Lorsch, J. (2008). Mechanism of ribosomal subunit joining during eukaryotic translation initiation. *Biochem Soc Trans*, 36(Pt 4) :653–7.
- [Andreev et al., 2009] Andreev, D., Dmitriev, S., Terenin, I., Prassolov, V., Merrick, W., and Shatsky, I. (2009). Differential contribution of the m7g-cap to the 5' end-dependent translation initiation of mammalian mRNAs. *Nucleic Acids Res*, 37(18) :6135–47.
- [Andreev et al., 2006] Andreev, D., Terenin, I., Dunaevsky, Y., Dmitriev, S., and Shatsky, I. (2006). A leaderless mRNA can bind to mammalian 80S ribosomes and direct polypeptide synthesis in the absence of translation initiation factors. *Mol Cell Biol*, 26(8) :3164–9.
- [Andrews et al., 2010] Andrews, A., Chen, X., Zevin, A., Stargell, L., and Luger, K. (2010). The histone chaperone Nap1 promotes nucleosome assembly by eliminating nonnucleosomal histone-DNA interactions. *Mol Cell*, 37(6) :834–42.
- [Annamalai and Rao, 2006] Annamalai, P. and Rao, A. (2006). Packaging of brome mosaic virus subgenomic RNA is functionally coupled to replication-dependent transcription and translation of coat protein. *J Virol*, 80(20) :10096–108.
- [Asano et al., 2001] Asano, K., Shalev, A., Phan, L., Nielsen, K., Clayton, J., Valásek, L., Donahue, T., and Hinnebusch, A. (2001). Multiple roles for the C-terminal domain of eIF5 in translation initiation complex assembly and GTPase activation. *EMBO J*, 20(9) :2326–37.
- [Balvay et al., 2009] Balvay, L., Soto Rifo, R., Ricci, E., Decimo, D., and Ohlmann, T. (2009). Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim Biophys Acta*, 1789(9-10) :542–57.
- [Bellolell et al., 2006] Bellolell, L., Cho-Park, P., Poulin, F., Sonenberg, N., and Burley, S. (2006). Two structurally atypical heat domains in the C-terminal portion of human eIF4G support binding to eIF4A and mnk1. *Structure*, 14(5) :913–23.
- [Belsham, 2009] Belsham, G. (2009). Divergent picornavirus IRES elements. *Virus Res*, 139(2) :183–92.

BIBLIOGRAPHIE

- [Berry et al., 2010] Berry, K., Waghray, S., and Doudna, J. (2010). The hcv ires pseudoknot positions the initiation codon on the 40s ribosomal subunit. *RNA*, 16(8) :1559–69.
- [Boehringer et al., 2005] Boehringer, D., Thermann, R., Ostareck-Lederer, A., Lewis, J., and Stark, H. (2005). Structure of the hepatitis c virus ires bound to the human 80s ribosome : remodeling of the hcv ires. *Structure*, 13(11) :1695–706.
- [Bongiorno-Borbone et al., 2010] Bongiorno-Borbone, L., De Cola, A., Barcaroli, D., Knight, R., Di Ilio, C., Melino, G., and De Laurenzi, V. (2010). Flash degradation in response to uv-c results in histone locus bodies disruption and cell-cycle arrest. *Oncogene*, 29(6) :802–10.
- [Bongiorno-Borbone et al., 2008] Bongiorno-Borbone, L., De Cola, A., Vernole, P., Finos, L., Barcaroli, D., Knight, R., Melino, G., and De Laurenzi, V. (2008). Flash and npat positive but not coilin positive cajal bodies correlate with cell ploidy. *Cell Cycle*, 7(15) :2357–67.
- [Bonnal et al., 2003] Bonnal, S., Schaeffer, C., Créancier, L., Clamens, S., Moine, H., Prats, A., and Vagner, S. (2003). A single internal ribosome entry site containing a g quartet rna structure drives fibroblast growth factor 2 gene expression at four alternative translation initiation codons. *J Biol Chem*, 278(41) :39330–6.
- [Boussadia et al., 1997] Boussadia, O., Amiot, F., Cases, S., Triqueneaux, G., Jacquemin-Sablon, H., and Dautry, F. (1997). Transcription of unr (upstream of n-ras) down-modulates n-ras expression in vivo. *FEBS Lett*, 420(1) :20–4.
- [Boussadia et al., 2003] Boussadia, O., Niepmann, M., Créancier, L., Prats, A., Dautry, F., and Jacquemin-Sablon, H. (2003). Unr is required in vivo for efficient initiation of translation from the internal ribosome entry sites of both rhinovirus and poliovirus. *J Virol*, 77(6) :3353–9.
- [Brunel and Romby, 2000] Brunel, C. and Romby, P. (2000). Probing rna structure and rna-ligand complexes with chemical probes. *Methods Enzymol*, 318 :3–21.
- [Burgess and Zhang, 2010] Burgess, R. and Zhang, Z. (2010). Roles for gcn5 in promoting nucleosome assembly and maintaining genome integrity. *Cell Cycle*, 9(15) : .
- [Cakmakci et al., 2008] Cakmakci, N., Lerner, R., Wagner, E., Zheng, L., and Marzluff, W. (2008). Slip1, a factor required for activation of histone mrna translation by the stem-loop binding protein. *Mol Cell Biol*, 28(3) :1182–94.
- [Chakravarthy et al., 2005] Chakravarthy, S., Park, Y., Chodaparambil, J., Edayathumangalam, R., and Luger, K. (2005). Structure and dynamic properties of nucleosome core particles. *FEBS Lett*, 579(4) :895–8.

- [Chappell et al., 2000] Chappell, S., Edelman, G., and Mauro, V. (2000). A 9-nt segment of a cellular mrna can function as an internal ribosome entry site (ires) and when present in linked multiple copies greatly enhances ires activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(4) :1536–41.
- [Chappell et al., 2006] Chappell, S., Edelman, G., and Mauro, V. (2006). Ribosomal tethering and clustering as mechanisms for translation initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(48) :18077–82.
- [Chatterjee and Pal, 2009] Chatterjee, S. and Pal, J. (2009). Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol Cell*, 101(5) :251–62.
- [Chevalier et al., 2009] Chevalier, C., Geissmann, T., Helfer, A., and Romby, P. (2009). Probing mrna structure and srna-mrna interactions in bacteria using enzymes and lead(ii). *Methods Mol Biol*, 540 :215–32.
- [Chi et al., 2010] Chi, P., Allis, C., and Wang, G. (2010). Covalent histone modifications—miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat Rev Cancer*, 10(7) :457–69.
- [Chu et al., 2009] Chu, V., Lipfert, J., Bai, Y., Pande, V., Doniach, S., and Herschlag, D. (2009). Do conformational biases of simple helical junctions influence rna folding stability and specificity? *RNA*, 15(12) :2195–205.
- [Costantino and Kieft, 2005] Costantino, D. and Kieft, J. (2005). A preformed compact ribosome-binding domain in the cricket paralysis-like virus ires RNAs. *RNA*, 11(3) :332–43.
- [Cowling, 2009] Cowling, V. (2009). Regulation of mrna cap methylation. *Biochem J*, 425(2) :295–302.
- [Cruz and Westhof, 2009] Cruz, J. and Westhof, E. (2009). The dynamic landscapes of rna architecture. *Cell*, 136(4) :604–9.
- [Culjkovic et al., 2007] Culjkovic, B., Topisirovic, I., and Borden, K. (2007). Controlling gene expression through rna regulons : the role of the eukaryotic translation initiation factor eif4e. *Cell Cycle*, 6(1) :65–9.
- [Culjkovic et al., 2005] Culjkovic, B., Topisirovic, I., Skrabanek, L., Ruiz-Gutierrez, M., and Borden, K. (2005). eif4e promotes nuclear export of cyclin d1 mRNAs via an element in the 3'utr. *J Cell Biol*, 169(2) :245–56.
- [Culjkovic et al., 2006] Culjkovic, B., Topisirovic, I., Skrabanek, L., Ruiz-Gutierrez, M., and Borden, K. (2006). eif4e is a central node of an rna regulon that governs cellular proliferation. *J Cell Biol*, 175(3) :415–26.
- [Das et al., 2010] Das, R., Karanicolas, J., and Baker, D. (2010). Atomic accuracy in predicting and designing noncanonical rna structure. *Nat Methods*, 7(4) :291–4.
- [Dasso and Jackson, 1989] Dasso, M. and Jackson, R. (1989). Efficient initiation of mammalian mrna translation at a cug codon. *Nucleic Acids Res*, 17(16) :6485–97.

BIBLIOGRAPHIE

- [Davey et al., 2002] Davey, C., Sargent, D., Luger, K., Maeder, A., and Richmond, T. (2002). Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol*, 319(5) :1097–113.
- [de Breyne et al., 2009] de Breyne, S., Yu, Y., Unbehaun, A., Pestova, T., and Hellen, C. (2009). Direct functional interaction of initiation factor eif4g with type 1 internal ribosomal entry sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(23) :9197–202.
- [DeJong et al., 2002] DeJong, E., Marzluff, W., and Nikonowicz, E. (2002). Nmr structure and dynamics of the rna-binding site for the histone mrna stem-loop binding protein. *RNA*, 8(1) :83–96.
- [Deniz et al., 2009] Deniz, N., Lenarcic, E., Landry, D., and Thompson, S. (2009). Translation initiation factors are not required for dicistroviridae ires function in vivo. *RNA*, 15(5) :932–46.
- [DeRan et al., 2008] DeRan, M., Pulvino, M., Greene, E., Su, C., and Zhao, J. (2008). Transcriptional activation of histone genes requires npat-dependent recruitment of trrap-tip60 complex to histone promoters during the g1/s phase transition. *Mol Cell Biol*, 28(1) :435–47.
- [Dorner et al., 2006] Dorner, S., Brunelle, J., Sharma, D., and Green, R. (2006). The hybrid state of trna binding is an authentic translation elongation intermediate. *Nat Struct Mol Biol*, 13(3) :234–41.
- [Dower et al., 1988] Dower, W., Miller, J., and Ragsdale, C. (1988). High efficiency transformation of e. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, 16(13) :6127–45.
- [Draper, 2004] Draper, D. (2004). A guide to ions and rna structure. *RNA*, 10(3) :335–43.
- [Ehresmann et al., 1987] Ehresmann, C., Baudin, F., Mougel, M., Romby, P., Ebel, J., and Ehresmann, B. (1987). Probing the structure of rnas in solution. *Nucleic Acids Res*, 15(22) :9109–28.
- [Eliassen et al., 1998] Eliassen, K., Baldwin, A., Sikorski, E., and Hurt, M. (1998). Role for a yy1-binding element in replication-dependent mouse histone gene expression. *Mol Cell Biol*, 18(12) :7106–18.
- [England and Uhlenbeck, 1978] England, T. and Uhlenbeck, O. (1978). Enzymatic oligoribonucleotide synthesis with t4 rna ligase. *Biochemistry*, 17(11) :2069–76.
- [Felden et al., 1997] Felden, B., Himeno, H., Muto, A., McCutcheon, J., Atkins, J., and Gesteland, R. (1997). Probing the structure of the escherichia coli 10sa rna (tmrna). *RNA*, 3(1) :89–103.
- [Fernández-Miragall and Martínez-Salas, 2003] Fernández-Miragall, O. and Martínez-Salas, E. (2003). Structural organization of a viral ires depends on the integrity of the gnra motif. *RNA*, 9(11) :1333–44.
- [Fitzgerald and Semler, 2009] Fitzgerald, K. and Semler, B. (2009). Bridging ires elements in mrnas to the eukaryotic translation apparatus. *Biochim Biophys Acta*, 1789(9-10) :518–28.
- [Formosa, 2010] Formosa, T. (2010). Avoiding a fatal attraction : properties of nucleosomes and a histone chaperone revealed under physiological conditions. *Mol Cell*, 37(6) :747–8.

- [Friend et al., 2007] Friend, K., Lovejoy, A., and Steitz, J. (2007). U2 snrnp binds intronless histone pre-mrnas to facilitate u7-snrnp-dependent 3' end formation. *Mol Cell*, 28(2) :240–52.
- [Füllgrabe et al., 2010] Füllgrabe, J., Hajji, N., and Joseph, B. (2010). Cracking the death code : apoptosis-related histone modifications. *Cell Death Differ*, 17(8) :1238–43.
- [Ghule et al., 2008] Ghule, P., Dominski, Z., Yang, X., Marzluff, W., Becker, K., Harper, J., Lian, J., Stein, J., van Wijnen, A., and Stein, G. (2008). Staged assembly of histone gene expression machinery at subnuclear foci in the abbreviated cell cycle of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(44) :16964–9.
- [Gingras et al., 1996] Gingras, A., Svitkin, Y., Belsham, G., Pause, A., and Sonenberg, N. (1996). Activation of the translational suppressor 4e-bp1 following infection with encephalomyocarditis virus and poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(11) :5578–83.
- [Godfrey et al., 2009] Godfrey, A., White, A., Tatomer, D., Marzluff, W., and Duronio, R. (2009). The drosophila u7 snrnp proteins lsm10 and lsm11 are required for histone pre-mrna processing and play an essential role in development. *RNA*, 15(9) :1661–72.
- [Gonzalez-Herrera et al., 2006] Gonzalez-Herrera, I., Prado-Lourenco, L., Teshima-Kondo, S., Kondo, K., Cabon, F., Arnal, J., Bayard, F., and Prats, A. (2006). Ires-dependent regulation of fgf-2 mrna translation in pathophysiological conditions in the mouse. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 1) :17–21.
- [Graber and Holcik, 2007] Graber, T. and Holcik, M. (2007). Cap-independent regulation of gene expression in apoptosis. *Mol Biosyst*, 3(12) :825–34.
- [Groppo and Richter, 2009] Groppo, R. and Richter, J. (2009). Translational control from head to tail. *Curr Opin Cell Biol*, 21(3) :444–51.
- [Gu and Lima, 2005] Gu, M. and Lima, C. (2005). Processing the message : structural insights into capping and decapping mrna. *Curr Opin Struct Biol*, 15(1) :99–106.
- [Han et al., 1987] Han, M., Chang, M., Kim, U., and Grunstein, M. (1987). Histone h2b repression causes cell-cycle-specific arrest in yeast : effects on chromosomal segregation, replication, and transcription. *Cell*, 48(4) :589–97.
- [He et al., 2003] He, H., von der Haar, T., Singh, C., Ii, M., Li, B., Hinnebusch, A., McCarthy, J., and Asano, K. (2003). The yeast eukaryotic initiation factor 4g (eif4g) heat domain interacts with eif1 and eif5 and is involved in stringent aug selection. *Mol Cell Biol*, 23(15) :5431–45.
- [Hellen, 2009] Hellen, C. (2009). Ires-induced conformational changes in the ribosome and the mechanism of translation initiation by internal ribosomal entry. *Biochim Biophys Acta*, 1789(9-10) :558–70.

BIBLIOGRAPHIE

- [Hellen et al., 1993] Hellen, C., Witherell, G., Schmid, M., Shin, S., Pestova, T., Gil, A., and Wimmer, E. (1993). A cytoplasmic 57-kda protein that is required for translation of picornavirus rna by internal ribosomal entry is identical to the nuclear pyrimidine tract-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(16) :7642–6.
- [Herbreteau et al., 2005] Herbreteau, C., Weill, L., Décimo, D., Prévôt, D., Darlix, J., Sargueil, B., and Ohlmann, T. (2005). Hiv-2 genomic rna contains a novel type of ires located downstream of its initiation codon. *Nat Struct Mol Biol*, 12(11) :1001–7.
- [Hickey et al., 1976] Hickey, E., Weber, L., and Baglioni, C. (1976). Inhibition of initiation of protein synthesis by 7-methylguanosine-5'-monophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(1) :19–23.
- [Hofacker, 2003] Hofacker, I. (2003). Vienna rna secondary structure server. *Nucleic Acids Res*, 31(13) :3429–31.
- [Hu et al., 1999] Hu, M., Tranque, P., Edelman, G., and Mauro, V. (1999). rna-complementarity in the 5' untranslated region of mrna specifying the gtx homeodomain protein : evidence that base-pairing to 18s rna affects translational efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(4) :1339–44.
- [Hunt and Jackson, 1999] Hunt, S. and Jackson, R. (1999). Polypyrimidine-tract binding protein (ptb) is necessary, but not sufficient, for efficient internal initiation of translation of human rhinovirus-2 rna. *RNA*, 5(3) :344–59.
- [Huynen et al., 1992] Huynen, M., Konings, D., and Hogeweg, P. (1992). Equal g and c contents in histone genes indicate selection pressures on mrna secondary structure. *J Mol Evol*, 34(4) :280–91.
- [Jackson et al., 2010] Jackson, R., Hellen, C., and Pestova, T. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(2) :113–27.
- [Jackson et al., 2006] Jackson, S., Koduvayur, S., and Woodson, S. (2006). Self-splicing of a group i intron reveals partitioning of native and misfolded rna populations in yeast. *RNA*, 12(12) :2149–59.
- [Jaeger, 2005] Jaeger, S. (2005). Etude de la maturation de l'extrémité 3' non traduite et de la traduction de l'arn messager codant pour l'histone h4. *Doctorat*, () : .
- [James et al., 1989] James, B., Olsen, G., and Pace, N. (1989). Phylogenetic comparative analysis of rna secondary structure. *Methods Enzymol*, 180 :227–39.
- [James and Sargueil, 2008] James, L. and Sargueil, B. (2008). Rna secondary structure of the feline immunodeficiency virus 5'utr and gag coding region. *Nucleic Acids Res*, 36(14) :4653–66.
- [Jang and Jan, 2010] Jang, C. and Jan, E. (2010). Modular domains of the dicistroviridae intergenic internal ribosome entry site. *RNA*, 16(6) :1182–95.
- [Jossinet et al., 2007] Jossinet, F., Ludwig, T., and Westhof, E. (2007). Rna structure : bioinformatic analysis. *Curr Opin Microbiol*, 10(3) :279–85.

- [Jossinet et al., 2010] Jossinet, F., Ludwig, T., and Westhof, E. (2010). Assemble : an interactive graphical tool to analyze and build rna architectures at the 2d and 3d levels. *Bioinformatics*, 26(16) :2057–9.
- [Kawagoe-Takaki et al., 2006] Kawagoe-Takaki, H., Nameki, N., Kajikawa, M., and Okada, N. (2006). Probing the secondary structure of salmon smai sine rna. *Gene*, 365 :67–73.
- [Keene and Tenenbaum, 2002] Keene, J. and Tenenbaum, S. (2002). Eukaryotic mrnps may represent posttranscriptional operons. *Mol Cell*, 9(6) :1161–7.
- [Khorasanizadeh, 2004] Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome : from genomic organization to genomic regulation. *Cell*, 116(2) :259–72.
- [Kieft, 2008] Kieft, J. (2008). Viral ires rna structures and ribosome interactions. *Trends Biochem Sci*, 33(6) :274–83.
- [Kieft, 2009] Kieft, J. (2009). Comparing the three-dimensional structures of dicistroviridae igr ires rnas with other viral rna structures. *Virus Res*, 139(2) :148–56.
- [Kim et al., 2006] Kim, J., Kim, K., Song, E., Lee, H., Kim, J., Chae, S., Kim, E., Lee, M., Yang, Y., and Lim, J. (2006). Apoptosis-inducing factor (aif) inhibits protein synthesis by interacting with the eukaryotic translation initiation factor 3 subunit p44 (eif3g). *FEBS Lett*, 580(27) :6375–83.
- [Kochetov, 2008] Kochetov, A. (2008). Alternative translation start sites and hidden coding potential of eukaryotic mrnas. *Bioessays*, 30(7) :683–91.
- [Kolupaeva et al., 1998] Kolupaeva, V., Pestova, T., Hellen, C., and Shatsky, I. (1998). Translation eukaryotic initiation factor 4g recognizes a specific structural element within the internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus rna. *J Biol Chem*, 273(29) :18599–604.
- [Kolupaeva et al., 2005] Kolupaeva, V., Unbehauen, A., Lomakin, I., Hellen, C., and Pestova, T. (2005). Binding of eukaryotic initiation factor 3 to ribosomal 40s subunits and its role in ribosomal dissociation and anti-association. *RNA*, 11(4) :470–86.
- [Komar and Hatzoglou, 2005] Komar, A. and Hatzoglou, M. (2005). Internal ribosome entry sites in cellular mrnas : mystery of their existence. *J Biol Chem*, 280(25) :23425–8.
- [Korneeva et al., 2001] Korneeva, N., Lamphear, B., Hennigan, F., Merrick, W., and Rhoads, R. (2001). Characterization of the two eif4a-binding sites on human eif4g-1. *J Biol Chem*, 276(4) :2872–9.
- [Korneeva et al., 2000] Korneeva, N., Lamphear, B., Hennigan, F., and Rhoads, R. (2000). Mutually cooperative binding of eukaryotic translation initiation factor (eif) 3 and eif4a to human eif4g-1. *J Biol Chem*, 275(52) :41369–76.
- [Kozak, 1987] Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger rnas. *Nucleic Acids Res*, 15(20) :8125–48.

BIBLIOGRAPHIE

- [Kozak, 1989] Kozak, M. (1989). The scanning model for translation : an update. *J Cell Biol*, 108(2) :229–41.
- [Kozak, 1991a] Kozak, M. (1991a). Effects of long 5' leader sequences on initiation by eukaryotic ribosomes in vitro. *Gene Expr*, 1(2) :117–25.
- [Kozak, 1991b] Kozak, M. (1991b). A short leader sequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes. *Gene Expr*, 1(2) :111–5.
- [Kozak, 1991c] Kozak, M. (1991c). Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem*, 266(30) :19867–70.
- [Kozak, 2004] Kozak, M. (2004). How strong is the case for regulation of the initiation step of translation by elements at the 3' end of eukaryotic mRNAs? *Gene*, 343(1) :41–54.
- [Laing et al., 2009] Laing, C., Jung, S., Iqbal, A., and Schlick, T. (2009). Tertiary motifs revealed in analyses of higher-order RNA junctions. *J Mol Biol*, 393(1) :67–82.
- [Landry et al., 2009] Landry, D., Hertz, M., and Thompson, S. (2009). Rps25 is essential for translation initiation by the dicistroviridae and hepatitis C viral IRES. *Genes Dev*, 23(23) :2753–64.
- [Lee et al., 2010] Lee, M., Toh, L., Yaw, L., and Luo, Y. (2010). Drosophila octamer elements and PDM-1 dictate the coordinated transcription of core histone genes. *J Biol Chem*, 285(12) :9041–53.
- [Leontis and Westhof, 2001] Leontis, N. and Westhof, E. (2001). Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs. *RNA*, 7(4) :499–512.
- [Li and Wang, 2004] Li, L. and Wang, C. (2004). Capped mRNA with a single nucleotide leader is optimally translated in a primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. *J Biol Chem*, 279(15) :14656–64.
- [Lindell et al., 2002] Lindell, M., Romby, P., and Wagner, E. (2002). Lead(ii) as a probe for investigating RNA structure in vivo. *RNA*, 8(4) :534–41.
- [Lomakin et al., 2000] Lomakin, I., Hellen, C., and Pestova, T. (2000). Physical association of eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) with eIF4A strongly enhances binding of eIF4G to the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and is required for internal initiation of translation. *Mol Cell Biol*, 20(16) :6019–29.
- [Lorsch and Dever, 2010] Lorsch, J. and Dever, T. (2010). Molecular view of 43S complex formation and start site selection in eukaryotic translation initiation. *J Biol Chem*, 285(28) :21203–7.
- [Lorsch and Herschlag, 1999] Lorsch, J. and Herschlag, D. (1999). Kinetic dissection of fundamental processes of eukaryotic translation initiation in vitro. *EMBO J*, 18(23) :6705–17.
- [Mahen et al., 2005] Mahen, E., Harger, J., Calderon, E., and Fedor, M. (2005). Kinetics and thermodynamics make different contributions to RNA folding in vitro and in yeast. *Mol Cell*, 19(1) :27–37.

- [Majumdar et al., 2003] Majumdar, R., Bandyopadhyay, A., and Maitra, U. (2003). Mammalian translation initiation factor eif1 functions with eif1a and eif3 in the formation of a stable 40 s preinitiation complex. *J Biol Chem*, 278(8) :6580–7.
- [Mandal and Breaker, 2004] Mandal, M. and Breaker, R. (2004). Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nat Struct Mol Biol*, 11(1) :29–35.
- [Marcotrigiano et al., 2001] Marcotrigiano, J., Lomakin, I., Sonenberg, N., Pestova, T., Hellen, C., and Burley, S. (2001). A conserved heat domain within eif4g directs assembly of the translation initiation machinery. *Mol Cell*, 7(1) :193–203.
- [Margueron and Reinberg, 2010] Margueron, R. and Reinberg, D. (2010). Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nat Rev Genet*, 11(4) :285–96.
- [Marintchev et al., 2009] Marintchev, A., Edmonds, K., Marintcheva, B., Hendrickson, E., Oberer, M., Suzuki, C., Herdy, B., Sonenberg, N., and Wagner, G. (2009). Topology and regulation of the human eif4a/4g/4h helicase complex in translation initiation. *Cell*, 136(3) :447–60.
- [Martínez-Salas and Fernández-Miragall, 2004] Martínez-Salas, E. and Fernández-Miragall, O. (2004). Picornavirus ires : structure function relationship. *Curr Pharm Des*, 10(30) :3757–67.
- [Marzluff, 2007] Marzluff, W. (2007). U2 snrnp : not just for poly(a) mrnas. *Mol Cell*, 28(3) :353–4.
- [Marzluff et al., 2002] Marzluff, W., Gongidi, P., Woods, K., Jin, J., and Maltais, L. (2002). The human and mouse replication-dependent histone genes. *Genomics*, 80(5) :487–98.
- [Marzluff et al., 2008] Marzluff, W., Wagner, E., and Duronio, R. (2008). Metabolism and regulation of canonical histone mrnas : life without a poly(a) tail. *Nat Rev Genet*, 9(11) :843–54.
- [McBryant et al., 2010] McBryant, S., Lu, X., and Hansen, J. (2010). Multifunctionality of the linker histones : an emerging role for protein-protein interactions. *Cell Res*, 20(5) :519–28.
- [Meerovitch et al., 1989] Meerovitch, K., Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1989). A cellular protein that binds to the 5'-noncoding region of poliovirus rna : implications for internal translation initiation. *Genes Dev*, 3(7) :1026–34.
- [Meerovitch et al., 1993] Meerovitch, K., Svitkin, Y., Lee, H., Lejbkowitz, F., Kenan, D., Chan, E., Agol, V., Keene, J., and Sonenberg, N. (1993). La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus rna in reticulocyte lysate. *J Virol*, 67(7) :3798–807.
- [Melamed et al., 2009] Melamed, D., Eliyahu, E., and Arava, Y. (2009). Exploring translation regulation by global analysis of ribosomal association. *Methods*, 48(3) :301–5.
- [Merino et al., 2005] Merino, E., Wilkinson, K., Coughlan, J., and Weeks, K. (2005). Rna structure analysis at single nucleotide resolution by selective 2'-hydroxyl acylation and primer extension (shape). *J Am Chem Soc*, 127(12) :4223–31.

BIBLIOGRAPHIE

- [Merrick, 2010] Merrick, W. (2010). Eukaryotic protein synthesis : still a mystery. *J Biol Chem*, 285(28) :21197–201.
- [Miller et al., 2007] Miller, W., Wang, Z., and Treder, K. (2007). The amazing diversity of cap-independent translation elements in the 3'-untranslated regions of plant viral mnas. *Biochem Soc Trans*, 35(Pt 6) :1629–33.
- [Millevoi and Vagner, 2010] Millevoi, S. and Vagner, S. (2010). Molecular mechanisms of eukaryotic pre-mrna 3' end processing regulation. *Nucleic Acids Res*, 38(9) :2757–74.
- [Mitchell and Lorsch, 2008] Mitchell, S. and Lorsch, J. (2008). Should i stay or should i go ? eukaryotic translation initiation factors 1 and 1a control start codon recognition. *J Biol Chem*, 283(41) :27345–9.
- [Mitchell et al., 2003] Mitchell, S., Spriggs, K., Coldwell, M., Jackson, R., and Willis, A. (2003). The apaf-1 internal ribosome entry segment attains the correct structural conformation for function via interactions with ptb and unr. *Mol Cell*, 11(3) :757–71.
- [Miyakawa et al., 2006] Miyakawa, S., Oguro, A., Ohtsu, T., Imataka, H., Sonenberg, N., and Nakamura, Y. (2006). Rna aptamers to mammalian initiation factor 4g inhibit cap-dependent translation by blocking the formation of initiation factor complexes. *RNA*, 12(10) :1825–34.
- [Mohammad-Qureshi et al., 2008] Mohammad-Qureshi, S., Jennings, M., and Pavitt, G. (2008). Clues to the mechanism of action of eif2b, the guanine-nucleotide-exchange factor for translation initiation. *Biochem Soc Trans*, 36(Pt 4) :658–64.
- [Mullis et al., 1986] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of dna in vitro : the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1 :263–73.
- [Nahvi et al., 2002] Nahvi, A., Sudarsan, N., Ebert, M., Zou, X., Brown, K., and Breaker, R. (2002). Genetic control by a metabolite binding mrna. *Chem Biol*, 9(9) :1043.
- [Narang and Seawright, 1993] Narang, S. and Seawright, J. (1993). In situ hybridization mapping of histone genes in anopheles albimanus. *J Am Mosq Control Assoc*, 9(2) :147–9.
- [Niedzwiecka et al., 2002] Niedzwiecka, A., Marcotrigiano, J., Stepinski, J., Jankowska-Anyszka, M., Wyslouch-Cieszyńska, A., Dadlez, M., Gingras, A., Mak, P., Darzynkiewicz, E., Sonenberg, N., Burley, S., and Stolarski, R. (2002). Biophysical studies of eif4e cap-binding protein : recognition of mrna 5' cap structure and synthetic fragments of eif4g and 4e-bp1 proteins. *J Mol Biol*, 319(3) :615–35.
- [Niepmann, 2009] Niepmann, M. (2009). Internal translation initiation of picornaviruses and hepatitis c virus. *Biochim Biophys Acta*, 1789(9-10) :529–41.

- [Nizami et al., 2010] Nizami, Z., Deryusheva, S., and Gall, J. (2010). The cajal body and histone locus body. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(7) :a000653.
- [Oguro et al., 2009] Oguro, A., Ohtsu, T., and Nakamura, Y. (2009). An aptamer-based biosensor for mammalian initiation factor eukaryotic initiation factor 4a. *Anal Biochem*, 388(1) :102–7.
- [Oguro et al., 2003] Oguro, A., Ohtsu, T., Svitkin, Y., Sonenberg, N., and Nakamura, Y. (2003). Rna aptamers to initiation factor 4a helicase hinder cap-dependent translation by blocking atp hydrolysis. *RNA*, 9(4) :394–407.
- [Panopoulos and Mauro, 2008] Panopoulos, P. and Mauro, V. (2008). Antisense masking reveals contributions of mrna-rna base pairing to translation of gtx and fgf2 mRNAs. *J Biol Chem*, 283(48) :33087–93.
- [Passmore et al., 2007] Passmore, L., Schmeing, T., Maag, D., Applefield, D., Acker, M., Algire, M., Lorsch, J., and Ramakrishnan, V. (2007). The eukaryotic translation initiation factors eif1 and eif1a induce an open conformation of the 40s ribosome. *Mol Cell*, 26(1) :41–50.
- [Pause et al., 1994] Pause, A., Méthot, N., Svitkin, Y., Merrick, W., and Sonenberg, N. (1994). Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eif-4a define a critical role for eif-4f in cap-dependent and cap-independent initiation of translation. *EMBO J*, 13(5) :1205–15.
- [Peattie and Gilbert, 1980] Peattie, D. and Gilbert, W. (1980). Chemical probes for higher-order structure in rna. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(8) :4679–82.
- [Perard et al., 2009] Perard, J., Rasia, R., Medenbach, J., Ayala, I., Boisbouvier, J., Drouet, E., and Baudin, F. (2009). Human initiation factor eif3 subunit b interacts with hcv ires rna through its n-terminal rna recognition motif. *FEBS Lett*, 583(1) :70–4.
- [Pestova et al., 1998] Pestova, T., Borukhov, S., and Hellen, C. (1998). Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1a to locate initiation codons. *Nature*, 394(6696) :854–9.
- [Pestova and Hellen, 2000] Pestova, T. and Hellen, C. (2000). The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis. *Cell Mol Life Sci*, 57(4) :651–74.
- [Pestova et al., 1996] Pestova, T., Hellen, C., and Shatsky, I. (1996). Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. *Mol Cell Biol*, 16(12) :6859–69.
- [Pestova and Kolupaeva, 2002] Pestova, T. and Kolupaeva, V. (2002). The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev*, 16(22) :2906–22.
- [Pestova et al., 2000] Pestova, T., Lomakin, I., Lee, J., Choi, S., Dever, T., and Hellen, C. (2000). The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eif5b. *Nature*, 403(6767) :332–5.

BIBLIOGRAPHIE

- [Pickering et al., 2004] Pickering, B., Mitchell, S., Spriggs, K., Stoneley, M., and Willis, A. (2004). Bag-1 internal ribosome entry segment activity is promoted by structural changes mediated by poly(rc) binding protein 1 and recruitment of polypyrimidine tract binding protein 1. *Mol Cell Biol*, 24(12) :5595–605.
- [Pillai et al., 2003] Pillai, R., Grimmmler, M., Meister, G., Will, C., Lührmann, R., Fischer, U., and Schümperli, D. (2003). Unique sm core structure of u7 snrnps : assembly by a specialized smn complex and the role of a new component, lsm11, in histone rna processing. *Genes Dev*, 17(18) :2321–33.
- [Pirngruber and Johnsen, 2010] Pirngruber, J. and Johnsen, S. (2010). Induced g1 cell-cycle arrest controls replication-dependent histone mrna 3' end processing through p21, npat and cdk9. *Oncogene*, 29(19) :2853–63.
- [Pirngruber et al., 2009] Pirngruber, J., Shchebet, A., Schreiber, L., Shema, E., Minsky, N., Chapman, R., Eick, D., Aylon, Y., Oren, M., and Johnsen, S. (2009). Cdk9 directs h2b monoubiquitination and controls replication-dependent histone mrna 3'-end processing. *EMBO Rep*, 10(8) :894–900.
- [Pisarev et al., 2005] Pisarev, A., Shirokikh, N., and Hellen, C. (2005). Translation initiation by factor-independent binding of eukaryotic ribosomes to internal ribosomal entry sites. *C R Biol*, 328(7) :589–605.
- [Preiss and Hentze, 1998] Preiss, T. and Hentze, M. (1998). Dual function of the messenger rna cap structure in poly(a)-tail-promoted translation in yeast. *Nature*, 392(6675) :516–20.
- [Probst et al., 2009] Probst, A., Dunleavy, E., and Almouzni, G. (2009). Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(3) :192–206.
- [Ransom et al., 2010] Ransom, M., Dennehey, B., and Tyler, J. (2010). Chaperoning histones during dna replication and repair. *Cell*, 140(2) :183–95.
- [Roberts and Holcik, 2009] Roberts, L. and Holcik, M. (2009). Rna structure : new messages in translation, replication and disease. workshop on the role of rna structures in the translation of viral and cellular rnas. *EMBO Rep*, 10(5) :449–53.
- [Rozovsky et al., 2008] Rozovsky, N., Butterworth, A., and Moore, M. (2008). Interactions between eif4ai and its accessory factors eif4b and eif4h. *RNA*, 14(10) :2136–48.
- [Sachs et al., 2002] Sachs, M., Wang, Z., Gaba, A., Fang, P., Belk, J., Ganesan, R., Amrani, N., and Jacobson, A. (2002). Toeprint analysis of the positioning of translation apparatus components at initiation and termination codons of fungal mrnas. *Methods*, 26(2) :105–14.
- [Salim and Feig, 2009] Salim, N. and Feig, A. (2009). Isothermal titration calorimetry of rna. *Methods*, 47(3) :198–205.

- [Sankoff, 1985] Sankoff, D. (1985). Simultaneous solution of the rna folding, alignment and protosequence problems. *J.Appl.Math*, 45 :810–825.
- [Schüler et al., 2006] Schüler, M., Connell, S., Lescoute, A., Giesebrecht, J., Dabrowski, M., Schroeer, B., Mielke, T., Penczek, P., Westhof, E., and Spahn, C. (2006). Structure of the ribosome-bound cricket paralysis virus ires rna. *Nat Struct Mol Biol*, 13(12) :1092–6.
- [Scipioni et al., 2010] Scipioni, A., Turchetti, G., Morosetti, S., and De Santis, P. (2010). Geometrical, conformational and topological restraints in regular nucleosome compaction in chromatin. *Biophys Chem*, 148(1-3) :56–67.
- [Sherman et al., 1986] Sherman, F., Baim, S., Hampsey, D., Goodhue, L., and Stiles, J. (1986). Properties of protein translation determined with altered forms of the yeast *cyc1* gene. *Current Communications in Molecular Biology*, () :42–46.
- [Shiman and Draper, 2000] Shiman, R. and Draper, D. (2000). Stabilization of rna tertiary structure by monovalent cations. *J Mol Biol*, 302(1) :79–91.
- [Silberklang et al., 1977] Silberklang, M., Prochiantz, A., Haenni, A., and Rajbhandary, U. (1977). Studies on the sequence of the 3'-terminal region of turnip-yellow-mosaic-virus rna. *Eur J Biochem*, 72(3) :465–78.
- [Sims and Reinberg, 2008] Sims, R. r. and Reinberg, D. (2008). Is there a code embedded in proteins that is based on post-translational modifications ? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(10) :815–20.
- [Singh et al., 2009a] Singh, R., Kabbaj, M., Paik, J., and Gunjan, A. (2009a). Histone levels are regulated by phosphorylation and ubiquitylation-dependent proteolysis. *Nat Cell Biol*, 11(8) :925–33.
- [Singh et al., 2009b] Singh, R., Paik, J., and Gunjan, A. (2009b). Generation and management of excess histones during the cell cycle. *Front Biosci*, 14 :3145–58.
- [Siridechadilok et al., 2005] Siridechadilok, B., Fraser, C., Hall, R., Doudna, J., and Nogales, E. (2005). Structural roles for human translation factor eif3 in initiation of protein synthesis. *Science*, 310(5753) :1513–5.
- [Sobczak et al., 2010] Sobczak, K., Michlewski, G., de Mezer, M., Krol, J., and Krzyzosiak, W. (2010). Trinucleotide repeat system for sequence specificity analysis of rna structure probing reagents. *Anal Biochem*, 402(1) :40–6.
- [Sonenberg, 2008] Sonenberg, N. (2008). eif4e, the mrna cap-binding protein : from basic discovery to translational research. *Biochem Cell Biol*, 86(2) :178–83.
- [Soto Rifo et al., 2007] Soto Rifo, R., Ricci, E., Décimo, D., Moncorgé, O., and Ohlmann, T. (2007). Back to basics : the untreated rabbit reticulocyte lysate as a competitive system to recapitulate

BIBLIOGRAPHIE

- cap/poly(a) synergy and the selective advantage of ires-driven translation. *Nucleic Acids Res*, 35(18) :e121.
- [Soukup and Breaker, 1999] Soukup, G. and Breaker, R. (1999). Relationship between internucleotide linkage geometry and the stability of rna. *RNA*, 5(10) :1308–25.
- [Spahn et al., 2004] Spahn, C., Jan, E., Mulder, A., Grassucci, R., Sarnow, P., and Frank, J. (2004). Cryo-em visualization of a viral internal ribosome entry site bound to human ribosomes : the ires functions as an rna-based translation factor. *Cell*, 118(4) :465–75.
- [Spahn et al., 2001] Spahn, C., Kieft, J., Grassucci, R., Penczek, P., Zhou, K., Doudna, J., and Frank, J. (2001). Hepatitis c virus ires rna-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science*, 291(5510) :1959–62.
- [Stombaugh et al., 2009] Stombaugh, J., Zirbel, C., Westhof, E., and Leontis, N. (2009). Frequency and isostericity of rna base pairs. *Nucleic Acids Res*, 37(7) :2294–312.
- [Stump and Gloss, 2010] Stump, M. and Gloss, L. (2010). Mutational studies uncover non-native structure in the dimeric kinetic intermediate of the h2a-h2b heterodimer. *J Mol Biol*, 401(3) :518–31.
- [Sullivan et al., 2009] Sullivan, K., Mullen, T., Marzluff, W., and Wagner, E. (2009). Knockdown of slbp results in nuclear retention of histone mrna. *RNA*, 15(3) :459–72.
- [Sánchez and Marzluff, 2002] Sánchez, R. and Marzluff, W. (2002). The stem-loop binding protein is required for efficient translation of histone mrna in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol*, 22(20) :7093–104.
- [Tachiwana et al., 2010] Tachiwana, H., Kagawa, W., Osakabe, A., Kawaguchi, K., Shiga, T., Hayashi-Takanaka, Y., Kimura, H., and Kurumizaka, H. (2010). Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human h3t. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(23) :10454–9.
- [Terenin et al., 2008] Terenin, I., Dmitriev, S., Andreev, D., and Shatsky, I. (2008). Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eif2. *Nat Struct Mol Biol*, 15(8) :836–41.
- [Unbehaun et al., 2004] Unbehaun, A., Borukhov, S., Hellen, C., and Pestova, T. (2004). Release of initiation factors from 48s complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eif2-bound gtp. *Genes Dev*, 18(24) :3078–93.
- [Vaissière and Herceg, 2010] Vaissière, T. and Herceg, Z. (2010). Histone code in the cross-talk during dna damage signaling. *Cell Res*, 20(2) :113–5.
- [Vallejos et al., 2010] Vallejos, M., Ramdohr, P., Valiente-Echeverría, F., Tapia, K., Rodriguez, F., Lowy, F., Huidobro-Toro, J., Dangerfield, J., and López-Lastra, M. (2010). The 5'-untranslated region of the

- mouse mammary tumor virus mrna exhibits cap-independent translation initiation. *Nucleic Acids Res*, 38(2) :618–32.
- [Walter et al., 2002] Walter, B., Parsley, T., Ehrenfeld, E., and Semler, B. (2002). Distinct poly(rc) binding protein kh domain determinants for poliovirus translation initiation and viral rna replication. *J Virol*, 76(23) :12008–22.
- [Wang and Breaker, 2008] Wang, J. and Breaker, R. (2008). Riboswitches that sense s-adenosylmethionine and s-adenosylhomocysteine. *Biochem Cell Biol*, 86(2) :157–68.
- [Wang et al., 2010] Wang, Y., Gao, W., Svitkin, Y., Chen, A., and Cheng, Y. (2010). Dcb-3503, a tylophorine analog, inhibits protein synthesis through a novel mechanism. *PLoS One*, 5(7) :e11607.
- [Wang et al., 1996] Wang, Z., Krasikov, T., Frey, M., Wang, J., Matera, A., and Marzluff, W. (1996). Characterization of the mouse histone gene cluster on chromosome 13 : 45 histone genes in three patches spread over 1mb. *Genome Res*, 6(8) :688–701.
- [Wang et al., 2009] Wang, Z., Treder, K., and Miller, W. (2009). Structure of a viral cap-independent translation element that functions via high affinity binding to the eif4e subunit of eif4f. *J Biol Chem*, 284(21) :14189–202.
- [Westhof, 2010] Westhof, E. (2010). Toward atomic accuracy in rna design. *Nat Methods*, 7(4) :272–3.
- [Wilkinson et al., 2005] Wilkinson, K., Merino, E., and Weeks, K. (2005). Rna shape chemistry reveals nonhierarchical interactions dominate equilibrium structural transitions in trna(asp) transcripts. *J Am Chem Soc*, 127(13) :4659–67.
- [Wilkinson et al., 2009] Wilkinson, K., Vasa, S., Deigan, K., Mortimer, S., Giddings, M., and Weeks, K. (2009). Influence of nucleotide identity on ribose 2'-hydroxyl reactivity in rna. *RNA*, 15(7) :1314–21.
- [Will and Lührmann, 2001] Will, C. and Lührmann, R. (2001). Spliceosomal usnrnp biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol*, 13(3) :290–301.
- [Williams and Marzluff, 1995] Williams, A. and Marzluff, W. (1995). The sequence of the stem and flanking sequences at the 3' end of histone mrna are critical determinants for the binding of the stem-loop binding protein. *Nucleic Acids Res*, 23(4) :654–62.
- [Wilson et al., 2000] Wilson, J., Pestova, T., Hellen, C., and Sarnow, P. (2000). Initiation of protein synthesis from the a site of the ribosome. *Cell*, 102(4) :511–20.
- [Wollerton et al., 2001] Wollerton, M., Gooding, C., Robinson, F., Brown, E., Jackson, R., and Smith, C. (2001). Differential alternative splicing activity of isoforms of polypyrimidine tract binding protein (ptb). *RNA*, 7(6) :819–32.
- [Woodcock and Ghosh, 2010] Woodcock, C. and Ghosh, R. (2010). Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(5) :a000596.

BIBLIOGRAPHIE

- [Woodson, 2005] Woodson, S. (2005). Metal ions and rna folding : a highly charged topic with a dynamic future. *Curr Opin Chem Biol*, 9(2) :104–9.
- [Wu et al., 2010] Wu, B., Mohideen, K., Vasudevan, D., and Davey, C. (2010). Structural insight into the sequence dependence of nucleosome positioning. *Structure*, 18(4) :528–36.
- [Yamamoto et al., 2007] Yamamoto, H., Nakashima, N., Ikeda, Y., and Uchiumi, T. (2007). Binding mode of the first aminoacyl-trna in translation initiation mediated by plautia stali intestine virus internal ribosome entry site. *J Biol Chem*, 282(11) :7770–6.
- [Yang et al., 2009] Yang, X., Torres, M., Marzluff, W., and Dominski, Z. (2009). Three proteins of the u7-specific sm ring function as the molecular ruler to determine the site of 3'-end processing in mammalian histone pre-mrna. *Mol Cell Biol*, 4045-56(29) :15.
- [Zaidi et al., 2010] Zaidi, S., Young, D., Montecino, M., Lian, J., van Wijnen, A., Stein, J., and Stein, G. (2010). Mitotic bookmarking of genes : a novel dimension to epigenetic control. *Nat Rev Genet*, 11(8) :583–9.
- [Zuker, 2003] Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, 31(13) :3406–15.