

Suivre la traduction en temps réel *in vitro* et dans les cellules humaines

Malgré de nombreuses études biochimiques, génétiques et structurales, la dynamique de la traduction, processus de fabrication des protéines, essentiel pour chaque organisme, reste mal connue.

Les études à l'échelle de la molécule unique ont montré leur intérêt dans ce domaine et ont permis de mieux caractériser les étapes de la traduction, principalement procaryote, dans des systèmes reconstitués *in vitro*. Notre équipe, en collaboration avec celle d'Olivier Namy, spécialiste de la traduction à l'I2BC, a développé un système permettant de chronométrer l'initiation et l'élongation eucaryotes, basée sur de la microscopie de fluorescence en réflexion totale interne (TIRFM). Pour ce faire, nous hybridons des oligonucléotides fluorescents le long de l'ARN messager traduit par le ribosome. Ceux-ci seront détachés par le ribosome au cours de la traduction, car il ne lit que des ARN simples brins. Ainsi, la perte de la fluorescence donne l'instant de passage du ribosome à un endroit précis de l'ARN (voir figure 1a).

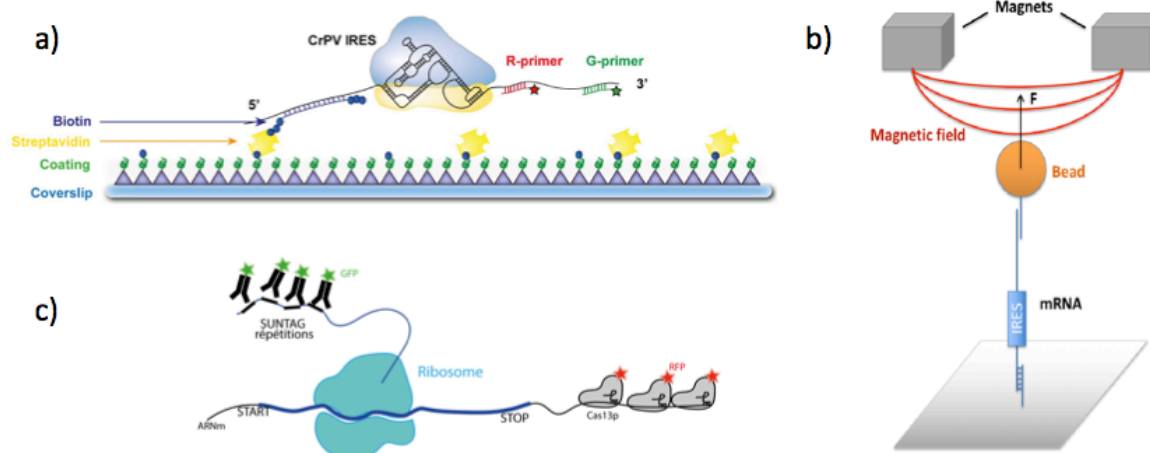


Fig 1. a) schéma de principe de la mesure de la vitesse de traduction par TIRFM. Le ribosome est recruté par un site interne d'entrée (IRES) puis détache les marqueurs fluorescents sur son passage. b) schéma de principe de la technique de pince magnétique. c) marquages fluorescents utilisés pour suivre des événements de traduction individuels *in cellulo*.

Pour compléter cette méthode, nous sommes actuellement en train de mettre au point une pince magnétique (Fig 1b). Cette technique, parallélisable au même titre que le TIRFM, nous donnera des informations complémentaires, en particulier sur le franchissement de zones structurées de l'ARNm où il est impossible de positionner les oligonucléotides fluorescents qui servent de jalons à la première technique. Il s'agit ici de fixer une extrémité de l'ARNm à la lamelle de microscope, et l'autre à une bille magnétique maintenue à une hauteur donnée par le champ créé par des aimants situés à

l'aplomb de l'échantillon. La hauteur de la bille donne en temps la longueur effective de l'ARN et renseigne donc sur les structures ouvertes par le ribosome en cours de traduction.

Nous souhaitons utiliser ces outils originaux pour caractériser des ribosomes possédant des modifications chimiques qui ont été mises en évidence soit dans des cellules cancéreuses, soit dans celles impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse. Plusieurs équipes ont montré que les ARN et les protéines ribosomiques subissaient des modifications, et cherchent à mettre en évidence leur rôle dans la régulation de l'expression des gènes. Notre rôle est de montrer si ces ribosomes modifiés ont une cinétique différente sur des ARN messagers codant des protéines particulières.

Finalement, afin de nous rapprocher encore plus des conditions physiologiques, nous adapterons notre technique de fluorescence à des expériences in cellulo. Les ARN messagers seront localisés à l'aide de protéines Cas13 fluorescentes désactivées, et les protéines naissantes grâce à des anticorps fluorescents reconnaissant des étiquettes insérées en amont du code pour la protéine d'intérêt (fig 1c).

Pour mener à bien ce projet ambitieux et novateur, tant sur les aspects physiques que biologiques, nous sommes à la recherche d'une personne motivée, idéalement formée à l'interface entre les deux disciplines, et qui, en tout état de cause, a une forte appétence pour le travail interdisciplinaire.

Contacts :

- pour la partie optique, Karen Perronet (laboratoire LuMIn, ENS Paris-Saclay)
karen.perronet@ens-paris-saclay.fr
- pour la partie traduction, Olivier Namy (I2BC, campus CNRS de Gif/Yvette)
olivier.namy@i2bc.paris-saclay.fr