

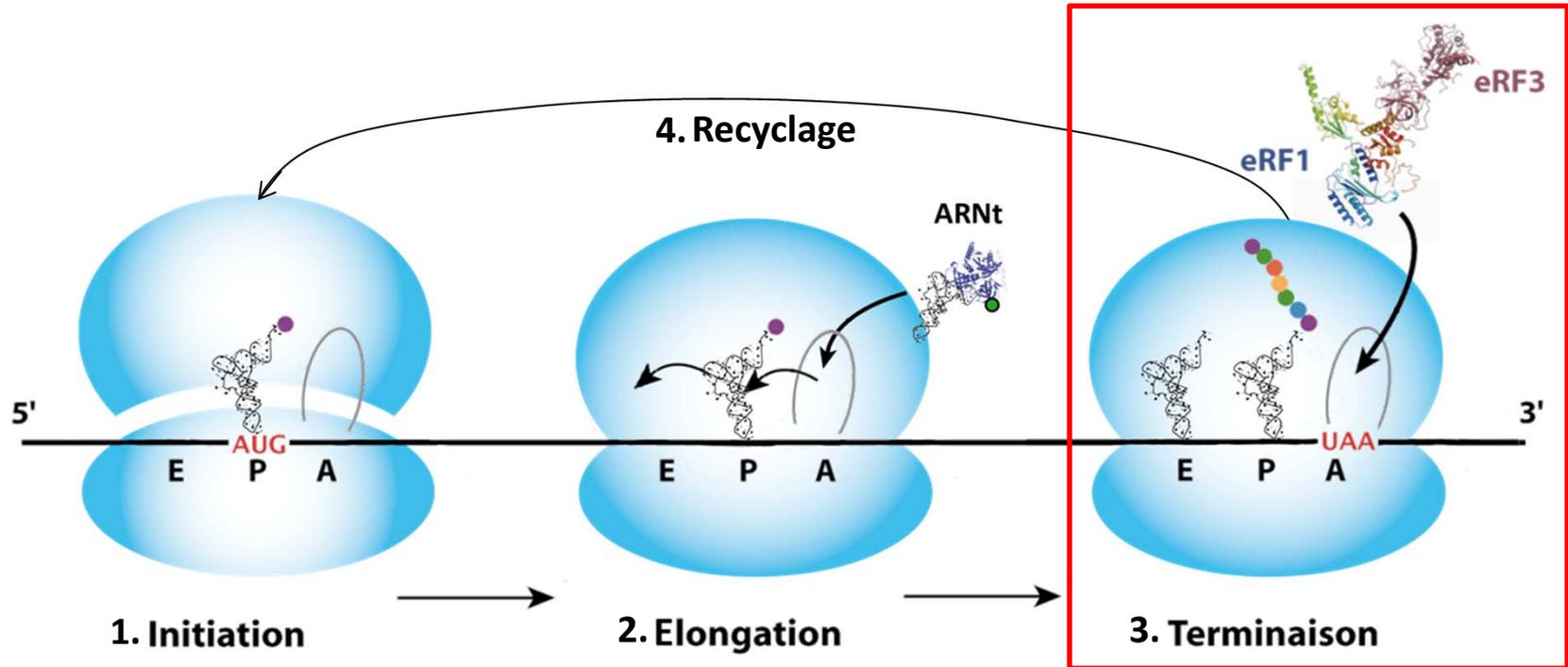


# Etude du processus de translecture chez *S. cerevisiae* par spectrométrie de masse

David Cornu



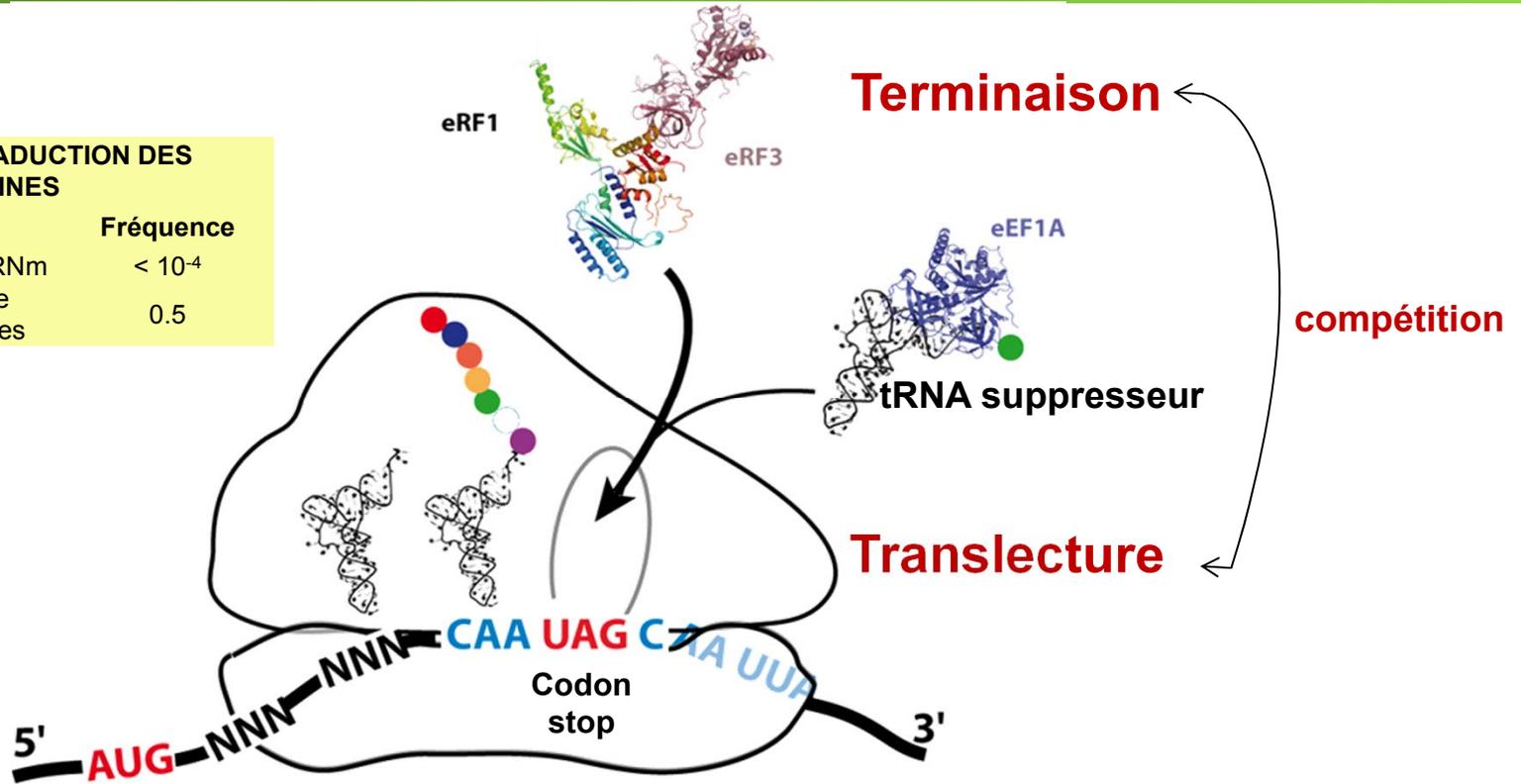
# La terminaison de la traduction



# Translecture et terminaison chez *S. cerevisiae*

## ERREURS DE TRADUCTION DES PROTEINES

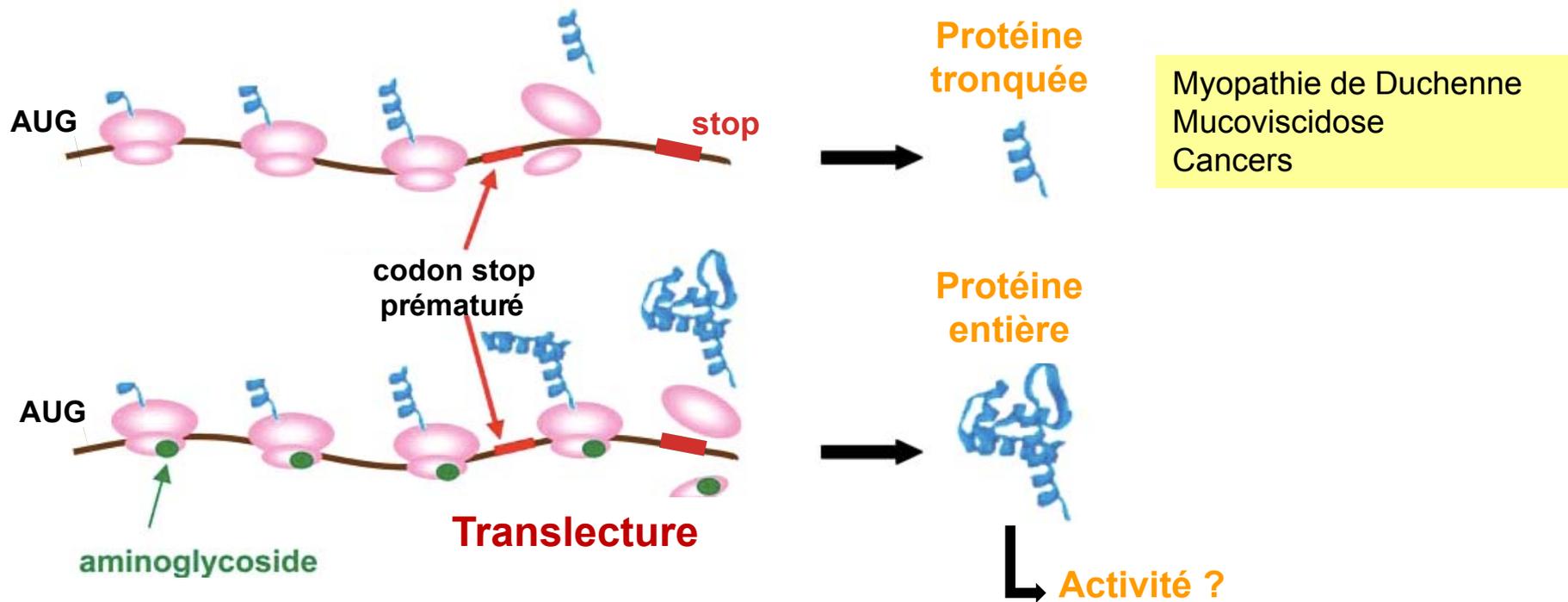
Type	Cible	Fréquence
spontanées	tous les ARNm	$< 10^{-4}$
programmés	contexte spécifiques	0.5



- **Le taux de translecture dépend du contexte nucléotidique du codon stop**  
Namy *et al.*, EMBO Rep, 2001, p 787-793
- **Mécanismes moléculaires encore peu connus**

# Intérêts thérapeutiques de la translecture

## traitement de maladies a codons stops prematureures



- L'activité de la protéine dépend de la nature de l'acide aminé inséré
- Il est essentiel d'établir des règles prédictives de la nature de l'acide aminé incorporé

# Etude de la translecture par spectrométrie de masse

---

- **Identification des acides aminés incorporés au niveau des 3 codons stops UAA, UAG et UGA lors de la translecture**
- **Fréquence d'insertion des acides aminés au niveau de chaque codon stop**
- **Influence du contexte nucléotidique du codon stop sur la nature et le taux d'incorporation des acides aminés de translecture**

# Strategie analytique

**IDENTIFICATION DES  
ACIDES AMINES  
INCORPORES POUR  
CHAQUE CODON  
STOP**

**TAUX  
D'INCORPORATION IN  
VIVO DES ACIDES  
AMINES POUR CHAQUE  
CODON STOP**

QUANTIFICATION RELATIVE  
DES PEPTIDES DE  
TRANSLECTURE

+

DETERMINATION DES  
FACTEURS CORRECTIFS

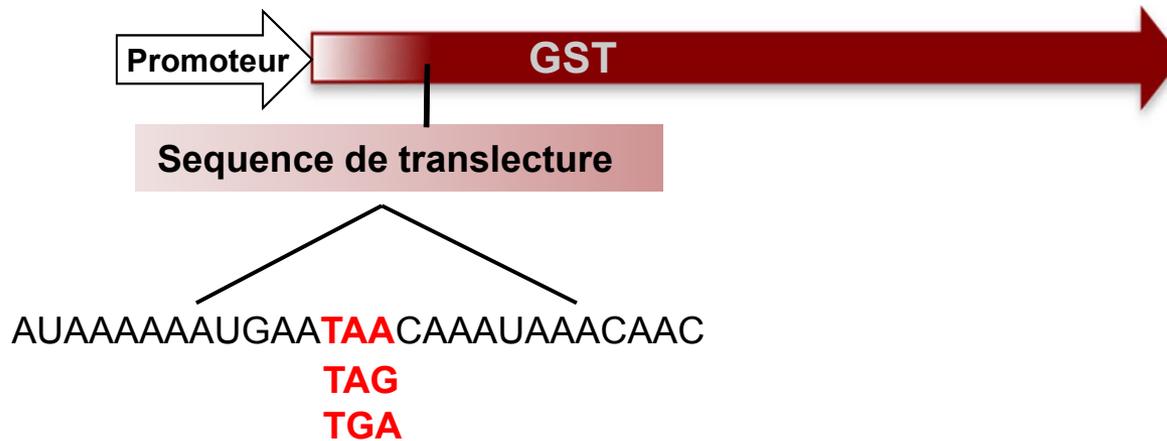
ANALYSE DES MELANGES PEPTIDIQUES ISSUS PROTEOLYSE IN-GEL

nanoLC-MS/MS  
(QTOF-Premier, LTQ-Orbitrap)

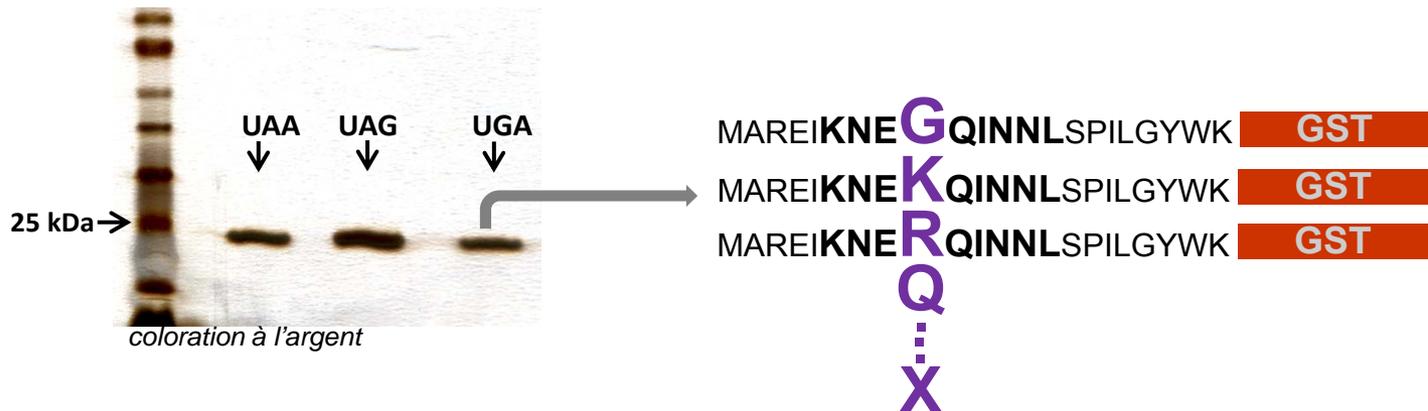
nanoLC-MS  
(QTOF-Premier)

# Expression et purification des protéines issues de la translecture

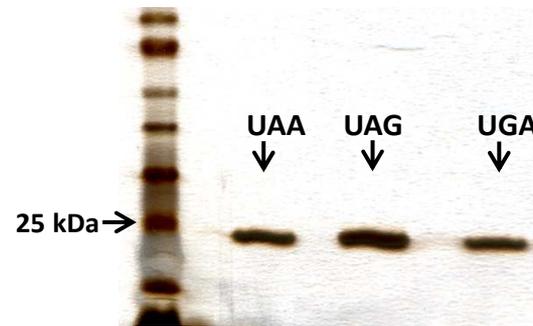
- Construction d'un système rapporteur



- Purification des protéines de translecture sur colonne d'affinité et gel d'électrophorèse



# Détermination des acides aminés de translecture en fonction du codon stop



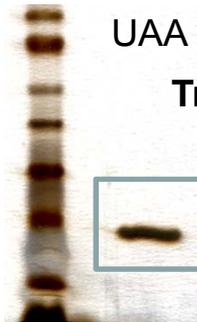
nanoLC-MS/MS apres digestion enzymatique par Trypsine ou LysN



## Identification des peptides chevauchant le site de translecture

Codon Stop	Acide aminés incorporés
UAA	Q, Y, K
UAG	Q, Y, K
UGA	C, W, R

# Spectres MS/MS des peptides de translecture



UAA

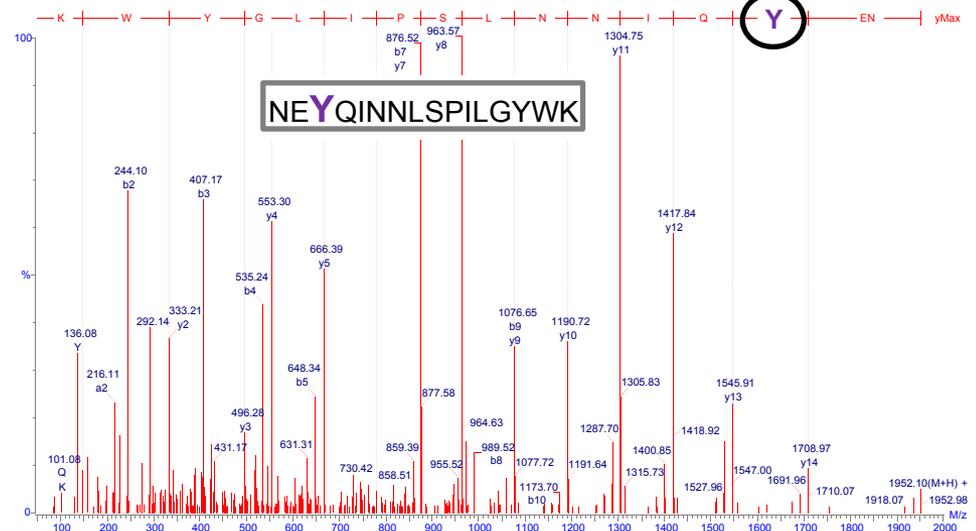
Trypsine

LysN

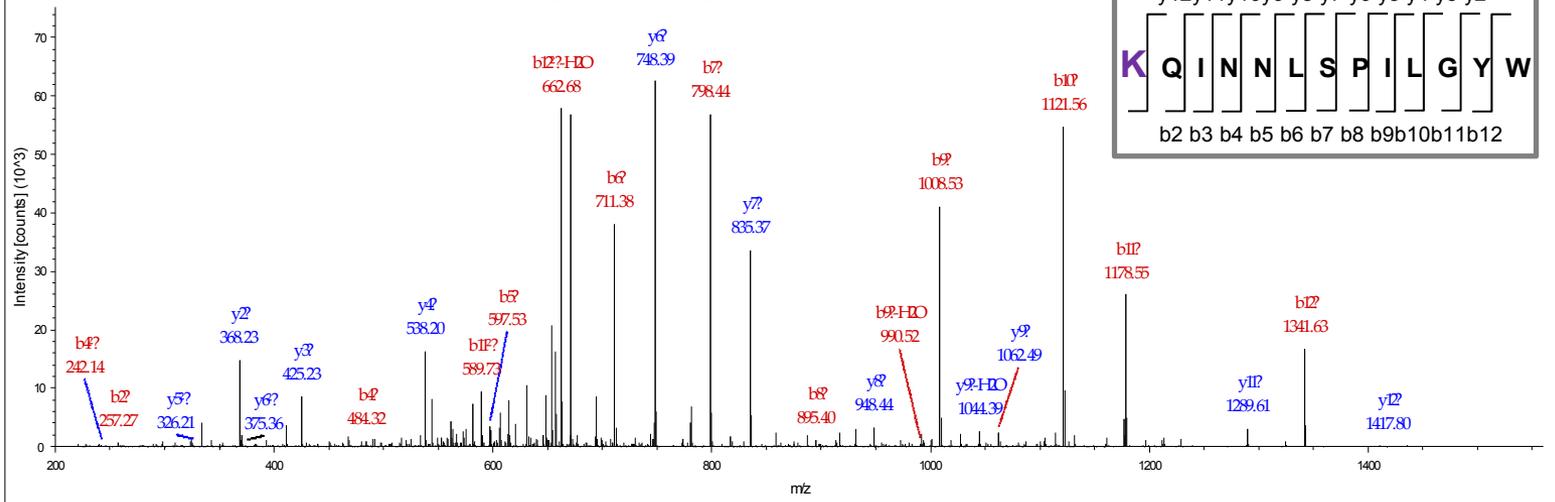
NEQINNLSPI LGYWK  
 NEYINNLSPI LGYWK  
 QINNLSPI LGYWK

KNEQINNLSPI LGYW  
 KNEYINNLSPI LGYW  
 KQINNLSPI LGYW

## • Spectre MS/MS QTOF après trypsine



## • Spectre MS/MS LTQ-Orbitrap après LysN



Recouvrement  
des acides  
aminés de  
translecture  
nécessaire  
pour éviter les  
ambigüités

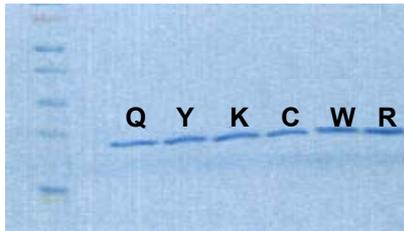


# Mesure du taux d'incorporation des acides aminés de translecture par LC-MS

NanoLC-MS : XIC des peptides chevauchant le site de translecture

- Réponse MS du peptide de translecture dépend de l'acide aminé incorporé  
→ Détermination d'un facteur correctif de l'efficacité d'ionisation et de digestion

Expression des 6 protéines recombinantes...KNE **Q** QINN...



LC-MS sur 5 réplicats → XIC des peptides avec **Q, Y, K, C, W** et **R**  
+n octyl glucopyranoside

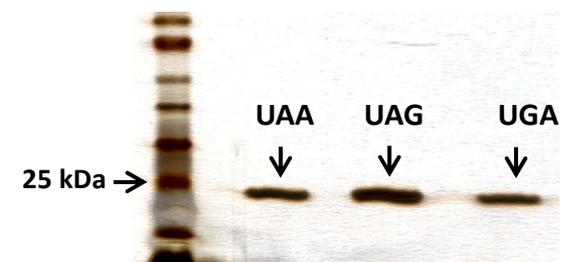
Normalisation par la moyenne des intensités des 3 peptides  
les plus intenses (N)

Facteur Correctif pour chaque peptide standard = XIC/N

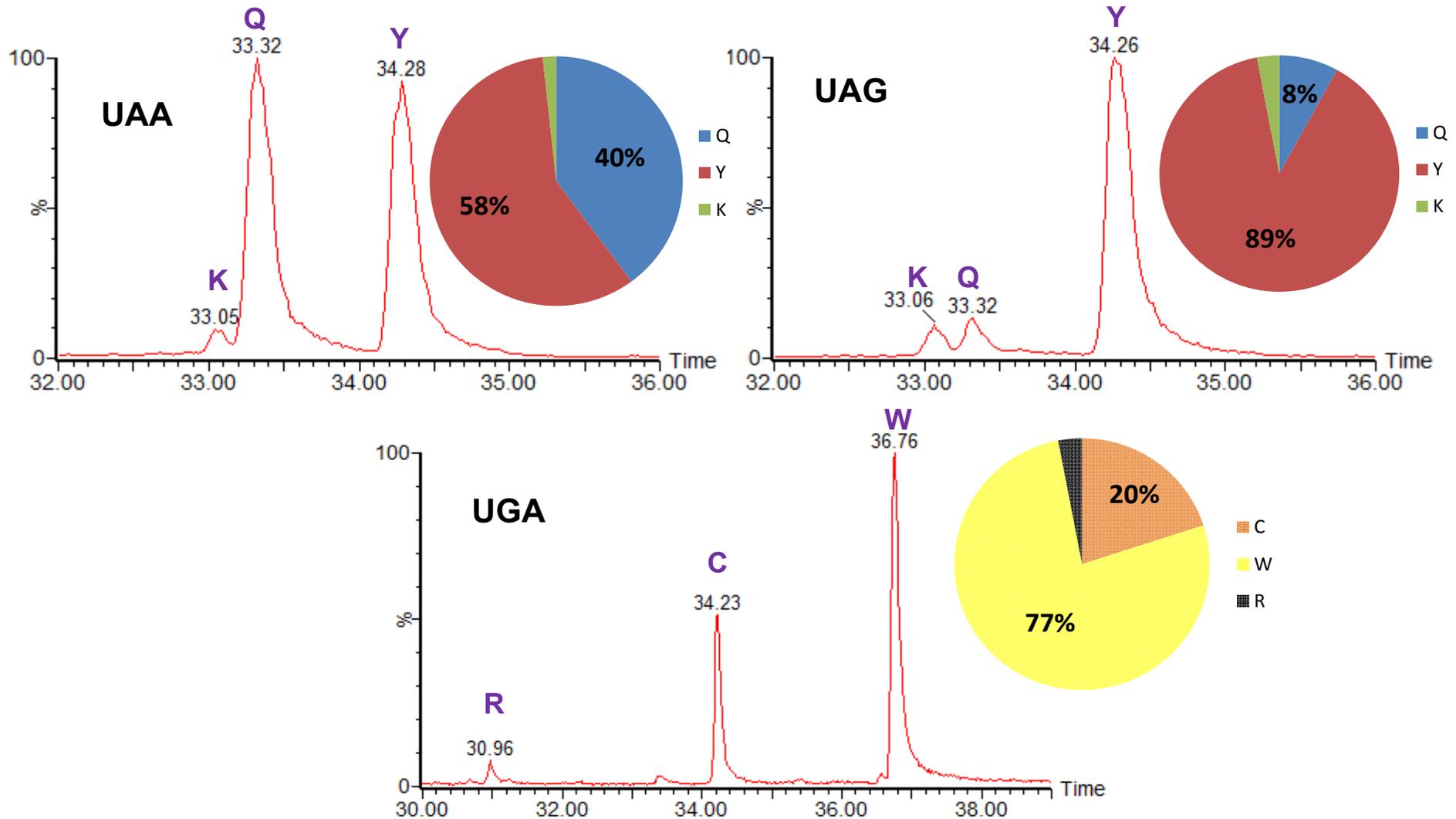
Peptides standards de translecture	facteur correctif
KNE <b>Q</b> QINNLSPIIGYW	1.65 ± 0.1
KNE <b>Y</b> QINNLSPIIGYW	1.09 ± 0.06
<b>K</b> QINNLSPIIGYW	3.7 ± 0.05
KNE <b>C</b> QINNLSPIIGYW	1.04 ± 0.04
KNE <b>W</b> QINNLSPIIGYW	0.57 ± 0.02
KNE <b>R</b> QINNLSPIIGYW	0.7 ± 0.03



Correction des données quantitatives  
de translecture acquises dans une  
meme série d'analyse



# Mesure du taux d'incorporation des acides aminés de translecture par LC-MS



→ Résultats en accord avec les règles d'appariement codon/anticodon?

# tRNAs suppresseurs naturels potentiels impliqués dans la translecture

Il existe plusieurs tRNAs naturels proches cognats par codon stop. Plusieurs acides amines peuvent être potentiellement incorporés au sein d'un même codon

## Affinités des tRNAs suppresseurs potentiels.

<b>UAA</b>	Gln (2 tRNAs) Tyr (1 tRNA)	>	Ser (2 tRNAs) Leu (1 tRNA)	>	Lys (1 tRNA) Glu (1 tRNA)
<b>UAG</b>	Gln (2 tRNAs) Tyr (1 tRNA)	>	Ser (1 tRNA) Leu (1 tRNA) Trp (1 tRNA)	>	Lys (1 tRNA) Glu (1 tRNA)
<b>UGA</b>	Cys (1 tRNA) Trp (1 tRNA)	>	Arg (2 tRNAs) Ser (2 tRNAs) Gly (1 tRNA) Leu (1 tRNA)		

# tRNAs suppresseurs naturels potentiels impliqués dans la translecture

Il existe plusieurs tRNAs naturels proches cognats par codon stop. Plusieurs acides aminés peuvent être potentiellement incorporés au sein d'un même codon

## Affinités des tRNAs suppresseurs potentiels

<b>UAA</b>	Gln (2 tRNAs) Tyr (1 tRNA)	>	Ser (2 tRNAs) Leu (1 tRNA)	>	Lys (1 tRNA) Glu (1 tRNA)
<b>UAG</b>	Gln (2 tRNAs) Tyr (1 tRNA)	>	Ser (1 tRNA) Leu (1 tRNA) Trp (1 tRNA)	>	Lys (1 tRNA) Glu (1 tRNA)
<b>UGA</b>	Cys (1 tRNA) Trp (1 tRNA)	>	Arg (2 tRNAs) Ser (2 tRNAs) Gly (1 tRNA) Leu (1 tRNA)		

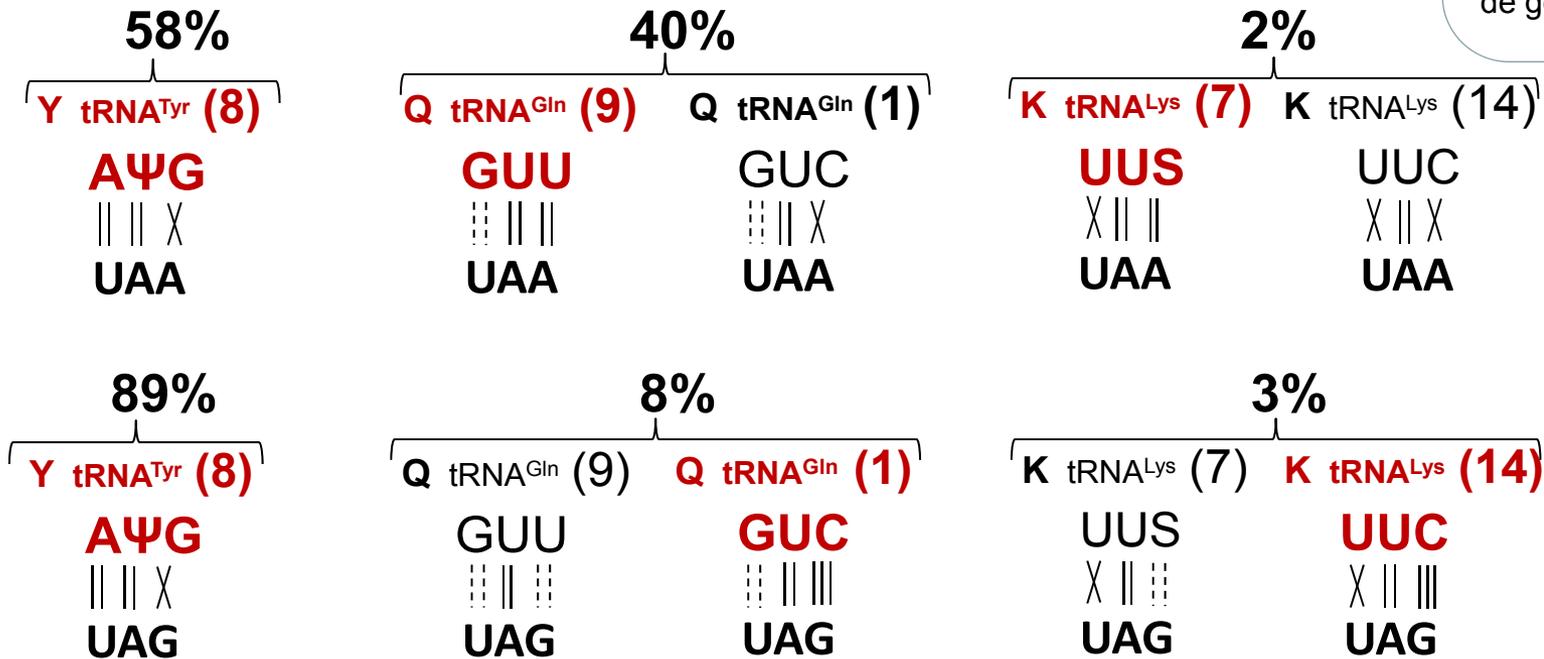
- Les acides aminés identifiés correspondent à ceux prédits par les règles d'appariement codon/anticodon

# Corrélation entre les taux d'incorporation calculés et les données génétiques

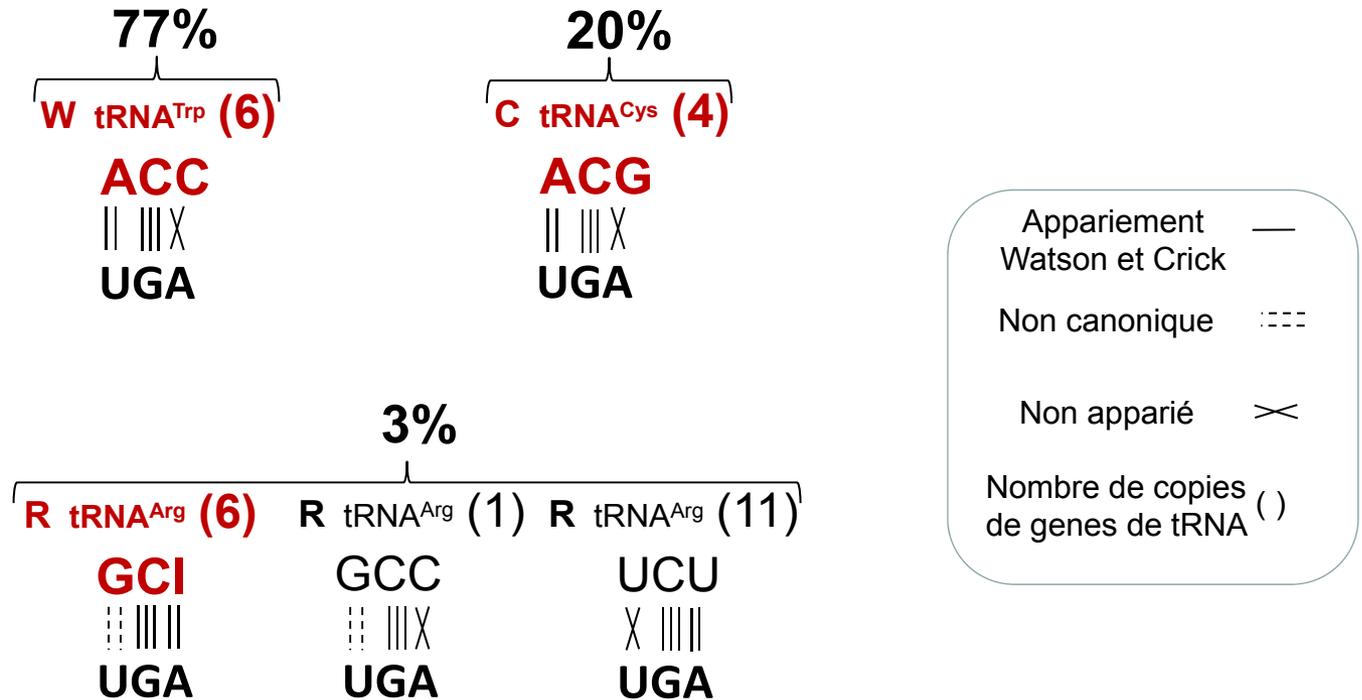
Taux d'incorporation des tRNA suppresseurs naturels dépend de:

- complémentarité codon/anticodon
- nombre de copies de gènes de tRNA

Appariement Watson et Crick —  
 Non canonique : : : :  
 Non apparié ×  
 Nombre de copies de gènes de tRNA ( )



# Correlation entre les taux d'incorporation calculés et les données génétiques



- Validation de la levure *S. cerevisiae* comme modèle de choix pour l'étude qualitative et quantitative des acides aminés incorporés

# Influence du contexte nucléotidique sur la nature des acides aminés de translecture

Codon stop	Contexte	Taux de translecture	Acide aminés
●UAA	...KNE●QINN...	11%	Q, Y, K
	...KNE●QSN...	39%	
	...QF●QSN...	11%	
●UGA	...KNE●QINN...	22%	C, W, R
	...NR●QSV...	11%	

- Pour les contextes testés, la nature du codon stop détermine le choix des acides aminés majoritairement insérés

Prochaine étape sera la mesure du taux d'incorporation des acides aminés insérés en fonction du contexte

# Perspectives

---

- **Effet d'antibiotiques (paromomycine, gentamicine, G418...) sur la nature et le taux d'incorporation des acides aminés de translecture en fonction du codon stop et du contexte nucléotidique.**
- **Adaptation de ce système d'étude de la translecture aux cellules humaines en vue des applications thérapeutiques potentielles.**

# Remerciements



**Sandra Blanchet**  
**Olivier Namy**  
**Jean-Pierre Rousset**



**Alain Brunelle**  
**Jean-Pierre LeCaer**



**Manuela Argentini**  
**Laila Sago**  
**Willy Bienvenut**  
**Virginie Redeker**

