



Etude des erreurs programmées du ribosome par microscopie de fluorescence en molécule unique

Nathalie Barbier

► To cite this version:

Nathalie Barbier. Etude des erreurs programmées du ribosome par microscopie de fluorescence en molécule unique. Optique [physics.optics]. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLO005 . tel-01654479

HAL Id: tel-01654479

<https://pastel.hal.science/tel-01654479>

Submitted on 4 Dec 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° NT 2017SACLO005

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
préparée à
L'INSTITUT D'OPTIQUE GRADUATE SCHOOL

ÉCOLE DOCTORALE N°575
Onde et Matière (EDOM)

Spécialité de doctorat : Physique

par

Nathalie Barbier

Étude des erreurs programmées du ribosome mammifère
par microscopie de fluorescence en molécule unique

Thèse présentée et soutenue à Palaiseau, le 17 octobre 2017

Composition du jury :

Rapporteurs :	Mme. Alexandra Fragola M.Sébastien Huet	Maître de Conférences Maître de Conférences	Laboratoire Physique et Étude de Matériaux Institut de Génétique et Développement de Rennes Laboratoire d'Optique et Biosciences
Présidente du jury :	Mme. Marie Claire Schanne-Klein	Directrice de recherche	Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon
Examineurs :	M. Jean Jacques Diaz M. Olivier Namy	Directeur de recherche Directeur de recherche	Institut de Biologie Intégrative de la Cellule
Directrice de thèse :	Mme. Karen Perronet	Chargée de recherche	Laboratoire Charles Fabry

Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse résultent d'un travail d'équipe, enrichi par l'apport de toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de travailler, collaborer, discuter ou même simplement bavarder. A ce titre, je souhaite remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué à ce que je considère comme étant une belle aventure, scientifique et humaine.

Tout d'abord je souhaite remercier les membres de mon jury : Marie Claire Schein Klein, Jean Jacques Diaz, Sébastien Huet et Alexandra Fragola pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes travaux et pour avoir accepté de les évaluer. J'ai été honorée de pouvoir discuter et défendre mon travail en votre présence. Un grand merci notamment à Sébastien Huet et Alexandra Fragola pour avoir accepté de rapporter mon manuscrit de thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement Karen Perronet pour son investissement tout au long de ce projet comme directrice de thèse mais aussi comme encadrante présente et engagée. Du tout départ jusqu'à la toute fin, elle n'a cessé, avec toute la patience qui peut être nécessaire à mes côtés, de me guider et de m'amener à progresser dans ma démarche scientifique.

Je lui suis tellement redevable de tout ce que j'ai appris pendant ces trois années et tout particulièrement, je lui suis très reconnaissante pour l'aide précieuse lors de la rédaction du manuscrit de thèse. C'est en grande partie grâce aux nombreuses interactions que nous avons eues pendant ces quelques mois de rédaction que j'ai pu rendre un travail scientifique construit et rigoureux, dont je suis (je m'autorise à le dire), fière. J'espère que comme moi tu garderas un bon souvenir de ces quelques années de travail en commun, des journées de manip hors du monde avec des tas de belles surprises, des pauses cafés bien méritées et quelques moments plus difficiles. Merci d'avoir toujours su trouver le temps pour répondre à mes questions mais aussi pour réaliser les expériences à la paillasse avec moi. Je quitte ce projet avec le souvenir heureux des moments de victoire et de joie qui ont couronné parfois de longs mois de travail de fourmi. Enfin, je salue une chercheuse qui aime profondément ce qu'elle fait, qui s'est beaucoup engagée et à qui je souhaite, de fait, de belles réussites scientifiques pour l'avenir et beaucoup de découvertes enthousiasmantes.

Je souhaite également remercier Nathalie Westbrook, qui a également été ma directrice de thèse pendant un an. Merci d'abord de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Comme tu me l'as dit un jour, la vie nous réserve parfois des opportunités inattendues, qu'il faut savoir saisir. C'est ce que j'ai fait et j'en suis très heureuse aujourd'hui. Je te remercie pour les nombreuses discussions scientifiques que nous avons eues, qui m'ont souvent permis de prendre le recul nécessaire pour affronter certaines difficultés techniques. J'ai beaucoup appris lors de nos interactions scientifiques, mais aussi lors de nos discussions informelles sur la pédagogie ou la littérature. Je te remercie pour ces trois années, et je te souhaite comme à Karen le meilleur pour l'avenir.

Le projet de thèse présenté dans ce manuscrit est un projet interdisciplinaire dans son ADN, et ce notamment parceque j'ai eu la chance de collaborer avec Olivier Namy et Olivier Bugaud, biologistes au sein de l'I2BC. De très nombreuses expériences décrites ici ont été réalisées en binôme avec Olivier Bugaud, doctorant biologiste lorsque je suis arrivée sur le projet.

J'ai eu de la chance de travailler avec Olivier Bugaud. J'ai été impressionnée par son professionnalisme, sa rigueur et plus généralement par ses grandes qualités scientifiques. Mais surtout grâce à sa bonne humeur inébranlable et sa gentillesse nous avons survécu sans difficulté aux nombreuses heures passées devant une manip pas toujours très commode. Olivier, je te remercie pour ta sympathie, ton soutien et pour toutes ces discussions passionnantes (et controversées :)) sur la justesse mathématique de nos modèles de traitement des données. Je te remercie aussi beaucoup de m'avoir initié et coaché dans la découverte de l'univers mystérieux de la biologie moléculaire, tu as été un excellent professeur. Je te tire enfin mon chapeau pour t'être autant investi dans la compréhension de la partie optique de l'expérience, tu n'as jamais baissé les bras devant aucune difficulté. Ce fut un plaisir de travailler avec toi et je te souhaite beaucoup de bonheur pour tes futurs projets.

J'ai eu également de la chance d'être encadrée par Olivier Namy, mon codirecteur de thèse sur le projet en tant que référent biologiste. Je le remercie d'avoir pris le temps de répondre à toutes mes questions philosophiques sur la traduction, de la plus naïve à la plus poussée, toujours avec la plus grande bienveillance. Merci de m'avoir accueillie à l'I2BC et guidé pour réaliser les expériences de biologie moléculaire qui représentaient un véritable défi pour moi. D'ailleurs mes remerciements vont en ce sens à toute l'équipe génome et traduction : Laure, Isabelle, Sandra, Agnès, Stéphane... Vous m'avez tous accueilli avec beaucoup de gentillesse et n'avez jamais hésité à m'aider toutes les fois où cela a été nécessaire. J'ai beaucoup apprécié les moments passés avec vous tous, que j'aurais aimé plus nombreux et je me suis sentie intégrée comme une véritable biologiste grâce à vous tous.

Bien sûr j'ai été accueillie avec joie dans le groupe biophotonique au sein du laboratoire Charles Fabry. J'ai rencontré dans ce groupe des personnes géniales qui ont fait que cette thèse a été bien plus qu'une simple expérience scientifique. Merci à tous pour tous les moments partagés et les repas au Magnan remplis de discussions diverses (mais quand même très souvent tournées vers la nourriture).

Merci aux parmanants du groupe : Arnaud, Michael et Julien pour leur accueil et pour les moments partagés. Merci spécialement à Julien, pour ta disponibilité et pour ta bonne humeur. Tu es toujours prêt à aider et tes nombreuses connaissances m'ont maintes fois grandement aidé. Tu es quelqu'un de cultivé, curieux et ça a été un plaisir d'échanger avec toi pendant ces quelques années.

Dédicace aux thésards de biophotoniques, à vous tous que j'ai eu la joie de connaître, avec qui on a partagé des rires, des galères et des conseils. Alexandra, tellement gentille et joyeuse. Nous ne nous sommes pas croisées très longtemps au sein du laboratoire mais j'ai été très heureuse de faire ta connaissance. Mitradeep, absolument unique en ton genre. Je ne compte plus le nombre de débats philosophiques animés au déjeuner qui n'ont pas toujours abouti d'ailleurs, mais qui resteront et me font déjà sourire quand j'écris ces lignes. Tu es quelqu'un d'entier, généreux, un peu bavard certes mais aussi cultivé et passionné, et je sais que grâce à tout cela tu réussiras à réaliser tout ce que tu souhaites (et qui sait peut-être même obtenir un prix nobel un jour, l'avenir nous le dira!). Je veux remercier aussi Jonas qui va bientôt soutenir lui-même sa thèse puisque nous avons commencé en même temps. Jonas, tu es quelqu'un d'adorable, souriant et à l'écoute. J'ai apprécié de parler avec toi de la musique et plus généralement ça a été super d'échanger avec toi et de partager nos difficultés et nos réussites de thésards. Je sais que tout

va super bien se passer pour toi pour la soutenance, tu as réalisé un beau travail dont tu peux être fier.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des thésards du laboratoire Charles Fabry avec qui j'ai eu la chance d'interagir. Les thésards du groupe optique quantique d'abord qui ont eu la gentillesse de m'accueillir régulièrement à leur pause thé de l'après midi et aux parties de coinche bien que je ne sois qu'une "biologiste". Merci à cette équipe soudée et joyeuse pour les bons moments partagés. Plus largement, j'ai beaucoup apprécié interagir avec des thésards venus de tous horizons, tous passionnés par leur projet de recherche. C'est toujours incroyable d'apprendre et d'avoir la chance de vivre la science là où elle se fait, et je vous remercie tous pour ce cadeau.

Enfin je n'oublie pas bien sûr mes deux complices inséparables : Flavie et Aurore. On a partagé tellement de bons moments où je ne vais malheureusement pas tout pouvoir citer, mais je les garde en tête pour les jours de pluie :) . Toutes les deux vous m'avez accueilli, vous m'avez soutenu et encouragé dans toutes les épreuves qui peuvent jalonner une thèse. Grâce à vous, j'en ressors grandie de deux amies et d'une tonne de fous rires.

Aurore ma compère de musique, merci pour toutes ces séances en duo où chacune de nous a pu redécouvrir son instrument. Ça a été un grand plaisir de partager ce moment avec toi et quelque chose que j'attendais toujours avec impatience. Merci d'être toujours aussi joyeuse, lumineuse et bienveillante, tu es vraiment quelqu'un d'extraordinaire et je suis bien triste que tu nous quittes bientôt pour de nouveaux horizons (et de nouvelles aventures :D). Je t'adore, reste toujours comme tu es.

Flavie, ma co-bureau de toujours. En quittant ce bureau j'ai eu une pensée émue pour tous les bons moments qu'on y a passés, les discussions, le partage, les tasses de thé servant de base à des expériences microbiologiques (ça c'est seulement de mon fait, tu as fait tout ce que tu as pu...). Entendre ton accent chantant remplir le bureau a égayé un peu chaque journée que j'ai passée au laboratoire. Merci, merci pour ton soutien indéfectible, pour ta gentillesse et ta bienveillance au quotidien. Je sais de source sûre que le meilleur t'attend et c'est tout ce que je te souhaite parceque tu le mérites vraiment.

J'ai eu l'opportunité d'exercer en parallèle de mon activité de recherche une activité d'enseignement à l'institut d'optique graduate school et à l'institut Villebon Charpack. J'ai adoré cette expérience qui m'a permis de compléter mon apprentissage scientifique mais aussi de me confronter à l'enseignement, la pédagogie. J'ai eu la chance d'enseigner en présence d'étudiants motivés et attachants, et j'ai aussi eu la chance de travailler avec des collègues passionnés et investis. Je remercie l'équipe pédagogique de l'institut Villebon charpack et l'équipe pédagogique de l'enseignement d'EITI pour tout ce qu'ils m'ont appris, pour le temps qu'ils m'ont consacré et leur encouragement dans mon apprentissage de l'enseignement. Merci en particulier à Fabienne Bernard, Julien Villemejeane Cyril Dauphin, Franck Brouillard et Samuel Tardieu qui m'ont beaucoup aidé dans la mise en place et l'amélioration de mes enseignements au fil de ces deux années. Ils m'ont encadré avec beaucoup de gentillesse et de bienveillance.

Tellement de personnes au sein du Laboratoire Charles Fabry et de l'institut d'optique ont contribué à la réussite de cette thèse. Je n'oublie pas l'apport essentiel des équipes de soutien techniques. Les membres de l'atelier d'optique, de l'atelier mécanique et de l'atelier d'électro-

nique qui nous ont fourni tant de fois une aide précieuse pour débloquer des difficultés techniques. Leur savoir-faire et les prouesses techniques qu'ils réalisent m'ont beaucoup impressionné, mais je retiens aussi leur sympathie et leur disponibilité au quotidien. Je tiens aussi à remercier l'ensemble de l'administration et du service documentation. Je sais que je n'ai pas été exemplaire sur le suivi des procédures administratives et pourtant l'ensemble de l'équipe m'a toujours accompagnée avec patience et gentillesse, je les en remercie chaleureusement.

Mes pensées vont à la fin de ces remerciements à mes proches. Je remercie bien sûr mes amis, qui m'ont apporté beaucoup de joie pour toujours garder du courage pendant ces trois années exigeantes. J'ai une petite pensée notamment pour la bande du magistère : Martin, Céline, Clément, Félix, Estelle, Timothée, Raphaël, Ludovic Lucie et Alban. On a partagé pas mal d'années d'études très chouettes et très très animées tous ensemble et c'est sympa voire émouvant d'arriver maintenant au point où nombre d'entre nous soutient leur thèse. Je suis tellement contente d'avoir fait ces années études avec vous tous, et bien sûr je vous souhaite tout simplement le meilleur.

Enfin je souhaite remercier ma famille. Mes parents tout d'abord pour m'avoir soutenu depuis de nombreuses années dans mes études malgré des revers et des inquiétudes. Ils ont toujours été là, ils m'ont toujours encouragé et cette thèse leur est dédiée tout particulièrement. Elle est aussi dédiée à mon frère, Thomas avec qui j'ai partagé tant de discussions scientifiques passionnées. Tu as choisi une voie mystérieuse (pour moi) et prometteuse, l'informatique et j'espère qu'à ton tour tu t'épanouiras pleinement dans ce que tu réalises. Benjamin, ces derniers mots sont pour toi. Tu as presque suivi toute cette aventure, jour après jour. Tu l'as partagé, on peut le dire dans le quotidien. Merci de m'avoir supporté malgré mon stress et toutes les difficultés. Merci aussi pour tous les bons et beaux moments dans cette jolie ville du Havre, qui m'ont permis de m'évader de la grisaille parisienne. Aujourd'hui c'est une nouvelle vie qui commence pour moi, pour nous et je suis curieuse de voir toutes les belles choses qu'elle nous réserve

" La science consiste à passer d'un étonnement à un autre. " Aristote

Table des matières

1	La traduction eucaryote : entre biologie et physique : apports de la molécule unique pour l'étude d'un processus complexe	1
1.1	La traduction eucaryote	1
1.1.1	Introduction au processus de traduction	2
1.1.2	Les principaux acteurs de la traduction	2
1.1.2.1	L'ARN messager	3
1.1.2.2	Le ribosome	4
1.1.2.3	Les ARN de transfert	5
1.1.3	Etapes du processus	6
1.1.3.1	Initiation canonique de la traduction eucaryote	6
1.1.3.2	Phase d'élongation	7
1.1.3.3	Terminaison	9
1.2	Évènements non canoniques et erreurs programmées	9
1.2.1	Initiation non-canonique : les structures IRES	10
1.2.1.1	Qu'est ce qu'une structure IRES ?	10
1.2.1.2	Classification des structures IRES	11
1.2.1.3	Problématiques d'étude des IRES	13
1.2.2	Erreurs programmées de l'élongation : cas du décalage de la phase de lecture -1	13
1.2.2.1	Éléments de la séquence ARNm favorisant le décalage de la phase de lecture	14
1.2.2.2	Quelques exemples fondateurs de décalage de la phase de lecture en -1	15
1.2.2.3	Problématiques d'étude du décalage de la phase de lecture en -1	18
1.2.3	Erreurs programmées de la terminaison : franchissement du codon stop	18
1.2.4	Évènements non canoniques : un champ de recherche ouvert	19
1.3	Molécule unique et techniques complémentaires pour l'étude de la traduction	20
1.3.1	Principe et atouts de la molécule unique	20
1.3.2	Techniques de molécule unique	21
1.3.2.1	Exemples de microscopies de fluorescence en molécule unique	22
1.3.3	Stratégies de marquage pour la molécule unique	24
1.3.3.1	Différentes possibilités de marquage	24
1.3.3.2	Marquage du ribosome procaryote	24
1.3.3.3	Marquage du ribosome eucaryote	25
1.3.4	Exemples d'études du décalage de phase en -1	26
1.3.4.1	Etude cinétique du mécanisme de décalage de phase de lecture en -1	26
1.3.4.2	Complémentarité avec les observations faite par une étude structurale par Cryo-EM	35

1.3.5	Exemple d'étude de l'initiation IRES dépendante	36
1.3.5.1	Apports des études structurales	36
1.3.5.2	Etude cinétique du recrutement du ribosome par une IRES CrPV	38
1.3.6	De l'in-vitro vers l'in-vivo : de nouvelles techniques d'étude en molécule unique	43
1.3.6.1	Une technique récente qui ouvre un nouveau champ de possibi- lités	43
1.3.6.2	Mesurer une cinétique de traduction in-vivo	44
1.3.6.3	Quelques limitations	47
1.4	Principe de notre mesure en molécule unique	48
1.4.1	Enjeux de la mesure	48
1.4.2	Définition du système biologique rapporteur	48
1.4.2.1	Intégrité biologique du système : un enjeu essentiel	49
1.4.2.2	Description de l'ARN messenger	49
1.4.3	Principe de la mesure cinétique	50
1.5	Conclusion	52
2	Microscopie de fluorescence en réflexion totale à l'échelle de la molécule unique	53
2.1	Bases de microscopie de fluorescence	54
2.1.1	Phénomène de fluorescence	54
2.1.1.1	Description du phénomène de fluorescence	54
2.1.1.2	Phénomène de photoblanchiment	54
2.1.1.3	Choix du type de fluorophores	55
2.1.2	Techniques de microscopie de fluorescence	56
2.1.2.1	Epifluorescence	57
2.1.2.2	Microscopie confocale	57
2.1.2.3	Microscopie TIRFM	58
2.1.3	Principe détaillé de la microscopie TIRFM	59
2.2	Description du dispositif de TIRFM	60
2.2.1	Voie d'excitation	60
2.2.2	Détection du signal de fluorescence	61
2.3	Cellule microfluidique et positionnement de l'échantillon sur le microscope	63
2.3.1	Choix et description de la cellule microfluidique	63
2.3.1.1	Description de la cellule microfluidique	63
2.3.1.2	Contraintes techniques pour la conception de la cellule	64
2.3.1.3	Calcul du nombre de Reynolds : écoulement laminaire dans le canal	64
2.3.2	Chimie de surface : accroche des systèmes biologiques	65
2.3.3	Positionnement de l'échantillon sur le microscope et contrôle en température	67
2.4	Acquisition du signal et rétroaction sur la mise au point	68
2.4.1	Acquisition du signal à l'aide d'un séquenceur	68
2.4.1.1	Rôle du séquenceur	68
2.4.1.2	Séquence temporelle d'acquisition	69

Table des matières

2.4.2	Développement d'un système de maintien de la mise au point	70
2.5	Traitement des données TIRFM et extraction de la cinétique de départ des jalons fluorescents	72
2.5.1	Objectifs du traitement des données : soustraire le fond de fluorescence pour détecter des molécules uniques	72
2.5.2	Traitement du fond de fluorescence	73
2.5.2.1	Nature et composantes du fond de fluorescence	73
2.5.2.2	Soustraction du fond par Rolling Ball	74
2.5.2.3	Soustraction du bruit de fluorescence des images	76
2.5.3	Extraction de la cinétique de départ des marqueurs	76
2.5.3.1	Détection des particules et opération de seuillage	76
2.5.3.2	Obtention des traces temporelles des particules détectées	77
2.5.3.3	Courbes de départ cumulées : première évaluation de la cinétique de départ des sondes fluorescentes dans chaque couleur	78
2.5.3.4	Traitement particulier des particules colocalisées	79
2.6	Conclusion	82
3	Mise en œuvre d'une expérience d'étude de la cinétique en molécule unique	83
3.1	Histoire de l'expérience de nos rêves	84
3.1.1	De l'échantillon idéal...	84
3.1.2	...A des conditions expérimentales optimisées	84
3.2	Améliorations optiques	85
3.2.1	Réduction du fond de fluorescence parasite	86
3.2.1.1	Paramètres impliqués dans le réglage de l'onde évanescente	86
3.2.1.2	Amélioration de la voie d'illumination	86
3.2.1.3	Objectif possédant une ouverture numérique de 1,49	88
3.2.2	Optimisation du système de maintien de la mise au point : utilisation d'une barette CCD	91
3.2.3	Tentative d'optimisation des propriétés photophysiques des marqueurs fluorescents	91
3.2.3.1	Différentes possibilités pour augmenter le temps de vie de nos marqueurs fluorescents	91
3.2.3.2	Tests avec l'hybridation de marqueurs Lumidine (LD) chimiquement protégés	94
3.3	Stabilité thermodynamique des ARNm et des oligo-fluorophores	97
3.3.1	Description du complexe thermodynamique étudié	97
3.3.2	Protocole d'hybridation et formation du complexe ARN/oligos	98
3.3.3	Rappels des lois thermodynamiques régissant la formation du complexe ARNm-oligonucléotides	99
3.3.3.1	Paramètres thermodynamiques	99
3.3.3.2	Importance de la séquence choisie et dépendance en température	100
3.3.3.3	Dépendance de la concentration initiale en ARNm et marqueurs	100
3.3.3.4	Autres facteurs et limitations du modèle proposé	101
3.3.4	Pistes d'amélioration de la stabilité thermodynamique	102

3.3.4.1	Amélioration de la stabilité : allongement de la séquence de l'oligo	102
3.3.4.2	Optimisation des cycles de température	105
3.3.4.3	Optimisation d'un tampon de rinçage pour limiter le choc salin .	107
3.4	Expérience réelle : bilan	107
3.4.1	Amélioration de la stabilité et du rapport signal/bruit	107
3.4.2	Caractéristiques de l'échantillon réel	108
3.4.2.1	Couverture et colocalisations	108
3.4.2.2	Experiences de mutagenèse : spécificité de l'accroche	108
3.4.2.3	Stabilité des marqueurs à l'issue des améliorations réalisées . . .	109
3.5	Conclusion	111
4	Caractérisation de la traduction eucaryote initiée par une IRES : mise en lumière d'une cinétique à deux temps caractéristiques	113
4.1	Etude de la cinétique d'initiation et d'élongation	114
4.1.1	Cinétiques de départs cumulés : acquisition et évaluation de la variabilité	114
4.1.1.1	Principe de l'acquisition des courbes cinétiques : Expériences de contrôle	114
4.1.1.2	Variabilité de l'acquisition cinétique	115
4.1.2	Cinétiques de départs : histogramme et départs instantanés	116
4.1.2.1	Analyse des instants de départ dans une couleur	116
4.1.2.2	Histogramme des co-départs	118
4.2	Etude de l'initiation par une IRES CrPV en présence de ribosomes pré-incubés .	119
4.2.1	Système biologique	119
4.2.2	Une dynamique à deux temps : modélisation des courbes cinétiques	119
4.2.2.1	Modélisation de l'histogramme des co-départs	120
4.2.2.2	Modélisation des cinétiques de départs instantanés	121
4.2.2.3	Évaluation des barres d'erreur : bootstrap	122
4.2.3	Interprétation biologique des temps caractéristiques longs et courts	124
4.2.3.1	Bilan des mesures cinétiques	124
4.2.3.2	Temps caractéristiques long et court : confrontation à la littérature	125
4.2.3.3	Proposition d'un modèle cinétique	125
4.3	Un second contrôle biologique : expériences avec les ribosomes du RRL	127
4.3.1	Description de l'ARNm	127
4.3.2	Courbes cinétiques avec les ribosomes du RRL	127
4.3.3	Comparaison des cinétiques des ribosomes endogènes et des ribosomes pré-incubés	129
4.3.4	Efficacité de reconnaissance et de traduction	129
4.4	Bilan : quelles conditions d'études choisir pour la suite du projet ?	131
4.5	Conclusion	132
5	Efficacité de traduction et structures IRES	133
5.1	Stratégies de maximisation de l'efficacité de traduction	133
5.1.1	Par quels biais agir sur l'efficacité de traduction ?	133
5.1.2	Test de différentes stratégies d'optimisation	135

Table des matières

5.1.2.1	Nouveau design de l'ARN messager	135
5.1.2.2	Test de l'accroche en 3'	136
5.1.2.3	Essais avec l'initiation par une IRES HCV	137
5.1.3	Conclusions et validation d'une approche pour une traduction efficace . .	140
5.2	Etude comparative de différentes IRES virales	140
5.2.1	Critère de sélection d'une troisième IRES virale : Etudes biochimiques de l'efficacité d'initiation dans le RRL	141
5.2.1.1	Principe de la mesure	141
5.2.1.2	Efficacité d'initiation dans le RRL pur	142
5.2.1.3	Impact des concentrations salines sur l'efficacité d'initiation . . .	144
5.2.1.4	Bilan global de l'étude	144
5.2.2	Mesures cinétiques comparatives en molécules uniques des IRES CrPV, HCV et EMCV	144
5.2.2.1	Systèmes rapporteurs pour l'étude comparative des IRES	144
5.2.2.2	Obtention des paramètres cinétiques	145
5.2.2.3	Comparaison des efficacités d'initiation	146
5.2.2.4	Comparaison des paramètres temporels	147
5.2.2.5	Perspective pour l'étude comparative des structures IRES	150
5.3	Conclusion	151
Conclusion Générale		153
A Protocoles de préparation des échantillons pour une expérience en molécule unique		157
A.1	Protocoles de nettoyage des échantillons en amont	157
A.1.1	Nettoyage de la partie réutilisable de la cellule microfluidique	157
A.1.2	Nettoyage des lamelles de microscope	157
A.2	Protocoles de préparation des échantillons	158
A.2.1	Protocole de chimie de surface	158
A.2.2	Préparation et injection des systèmes biologiques	159
A.2.3	Préparation et injection du RRL dans l'échantillon	160
B Protocole de fabrication des ARN messagers rapporteurs		161
B.1	Principe du protocole	161
B.2	Déroulement du protocole	162
B.2.1	Description des différentes étapes	162
B.2.1.1	Étapes de vérification	162
B.2.1.2	Transfection et transformation : Etape 1 de la figure B.4	163
B.2.1.3	Mise en culture : Etape 2 de la figure B.4	165
B.2.1.4	Extraction et purification de l'ADN : Etape 3 de la figure B.4 . .	165
B.2.1.5	Digestion de l'ADN : Etape 4 de la figure B.4	168
B.2.1.6	Étape de transcription : Ultime étape de la figure B.4	168

C Article :Kinetics of CrPV and HCV IRES-mediated eukaryotic translation using single-molecule fluorescence microscopy	171
Bibliographie	183

Introduction Générale

La synthèse des protéines est un mécanisme central du fonctionnement cellulaire, commun à l'ensemble des règnes du vivant. Notre organisme contient une grande diversité de protéines nécessaires à toutes les étapes qui régissent son fonctionnement. Leur production est orchestrée par une machine moléculaire appelée le ribosome qui peut être appréhendé comme l'usine de production des protéines dans nos cellules.

Du fait de son rôle central dans le fonctionnement de tous les organismes vivants, l'étude du processus de synthèse des protéines aussi appelé traduction est un enjeu important dans des perspectives de recherche fondamentale mais aussi dans la perspective de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Une illustration de ce point concerne la recherche de nouveaux antibiotiques. La synthèse protéique et plus particulièrement le ribosome est une des quatre cibles des traitements antibiotiques. En effet ces molécules viennent perturber et même inhiber la synthèse de protéines chez des bactéries pathogènes. Privées de certaines protéines essentielles à leur développement et à leur fonctionnement, les bactéries meurent. Un exemple de cette famille d'antibiotiques qui cible le ribosome est la streptomycine, un des premiers médicaments à avoir eu une action réelle sur la tuberculose mais également utilisé contre la peste dans les années 50.

Aujourd'hui, la problématique de la résistance bactérienne est une question de santé majeure. La consommation globale d'antibiotiques de nos sociétés étant importante, les bactéries responsables de certaines maladies deviennent résistantes et donc insensibles aux antibiotiques à notre disposition. Malgré les précautions et les campagnes de sensibilisation qui permettent de limiter le développement de cette résistance, il est toutefois essentiel de mettre à jour de nouveaux antibiotiques pour lutter contre ces bactéries résistantes, et l'étude des mécanismes de fonctionnement du ribosome est une piste de recherche importante en ce sens.

Nous verrons au travers de ce manuscrit de thèse que le ribosome est aussi impliqué dans la production des protéines nécessaires à la réplication et la prolifération de nombreux pathogènes (virus et bactérie) via des phénomènes d'évènement non canoniques de la traduction. On peut citer en ce sens l'utilisation d'une structure IRES par certains virus (par exemple le virus de l'hépatite C) pour contourner la voie d'initiation classique de la traduction et faire produire par la machinerie traductionnelle de leur hôte les protéines nécessaires à leur réplication. Les virus et les bactéries utilisent aussi des phénomènes rassemblés sous la dénomination d'erreurs programmées de la traduction pour produire les protéines nécessaires à leur bon fonctionnement. Nous détaillerons plus loin le fonctionnement de ces processus et en particulier de l'un d'entre eux : le décalage de la phase de lecture, qui est notamment impliqué dans la réplication du virus du VIH ou encore dans le fonctionnement cellulaire de la bactérie *E. coli*. Pour certains pathogènes comme le VIH, il relève d'un enjeu de santé publique de développer de nouvelles potentialités de luttres contre sa réplication et de fait contre le développement de la maladie. Cibler des mécanismes traductionnels spécifiques au virus constitue une stratégie thérapeutique prometteuse pour l'avenir.

Pour résumer, comprendre les mécanismes universels de la synthèse protéique, c'est tout à la

fois appréhender et décrire un mécanisme complexe, hautement régulé au cœur du fonctionnement global de nos cellules mais aussi comprendre des mécanismes critiques dans le fonctionnement de nombreux organismes pathogènes et de fait développer des approches innovantes pour contrer ces organismes. Notre approche s'inscrit en priorité dans une démarche de recherche fondamentale. Notre équipe au sein du Laboratoire Charles Fabry a mis au point une expérience de microscopie de fluorescence en molécule unique pour étudier la dynamique de ribosomes mammifères.

Mon projet de thèse s'inscrit de ce fait dans un projet interdisciplinaire par nature qui est né de la collaboration de l'équipe molécule unique (groupe biophotonique) du Laboratoire Charles Fabry avec une équipe de biologistes de l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule à Orsay. Lorsque je suis arrivée sur ce projet, j'ai pu prendre très vite part à cette collaboration qui s'inscrit dans le quotidien de notre travail. En effet, une proportion importante des expériences décrites dans ce manuscrit ont été réalisées en binôme avec un doctorant de l'I2BC, Olivier Bugaud aujourd'hui docteur [Bugaud 2016]. Nous avons à chaque tournant du projet échangé, débattu et réfléchi ensemble tant aux aspects physiques que biologiques des problématiques abordées. Le contexte humain interdisciplinaire au quotidien a été une base essentielle de ce projet de recherche, pour développer la technique expérimentale, mais aussi pour définir les problématiques biologiques et les enjeux associés.

Au moment de mon arrivée dans l'équipe, le projet était à un stade où le développement instrumental du dispositif de TIRFM était en grande partie réalisé grâce aux thèses consécutives de David Dulin, Antoine Le Gall et Nicolas Fiszman aboutissant à une preuve de principe de la validité de notre technique pour l'étude de la dynamique du ribosome à l'échelle de la molécule unique. L'objectif principal de mon projet de thèse était donc de partir de cette base existante pour l'étendre à des problématiques biologiques associées à la dynamique du ribosome comme l'étude des événements rares et non-canoniques de la traduction eucaryote. Je me suis en ce sens particulièrement impliquée dans la dimension biologique du projet pour optimiser le dispositif et le protocole expérimental en accord avec les perspectives biologiques définies.

Ce manuscrit est subdivisé en 5 chapitres qui décrivent dans un premier temps les enjeux biologiques qui ont guidé mes travaux de thèse, les modifications apportées au dispositif de TIRFM et au protocole expérimental pour répondre à ces attentes et enfin l'aboutissement de nos expériences d'étude de la dynamique du ribosome en molécule unique.

Le chapitre 1 constitue un chapitre d'introduction aux enjeux biologiques du projet. Nous décrirons d'abord le processus de synthèse des protéines chez les eucaryotes. Nous nous intéresserons ensuite aux événements non canoniques de ce processus qui constituent un champ de recherche dynamique et ouvert, dans lequel les études dynamiques ont toute leur place. Enfin nous présenterons à ce propos les techniques de molécule unique, leurs atouts et illustrerons au travers de l'état de l'art en quoi ces techniques sont particulièrement adaptées pour aborder un processus hautement dynamique comme la traduction eucaryote.

Le chapitre 2 aura pour sujet la description de notre dispositif de microscopie de fluorescence en réflexion totale au moment où je l'ai moi même pris en main. Nous nous attacherons à détailler les divers aspects techniques de ce dispositif maison et mettrons en lumière les limitations

Table des matières

qui m'ont amenée à définir un ensemble d'optimisations possibles pour répondre aux enjeux expérimentaux du projet.

Ces enjeux expérimentaux constituent le cœur du chapitre 3. La problématique d'étude des événements rares abordés dans le chapitre 1 nécessite de modifier notre protocole expérimental, en particulier pour limiter les deux sources de bruit de notre mesure : le photoblanchiment et l'instabilité thermodynamique de nos sondes utilisées pour marquer le système biologique. Nous aborderons les améliorations du dispositif optiques qui sont à la fois vouées à répondre aux limitations décrites dans le chapitre 2 mais qui ont surtout pour objectif de limiter le photoblanchiment de nos marqueurs. Nous aborderons dans un second temps les améliorations du protocole de préparation des échantillon visant à limiter les causes de l'instabilité thermodynamique.

Enfin les chapitres 4 et 5 décrivent les principaux résultats de notre étude. Dans le chapitre 4, nous présenterons la dynamique d'initiation du ribosome sur une structure virale, et comparerons deux conditions de préparation du système biologique rapporteur qui ont une implication sur la dynamique du ribosome et son efficacité d'initiation. Cette efficacité étant un paramètre important, nous chercherons à l'optimiser via différentes stratégies qui feront l'objet de la première section du chapitre 5. Dans la seconde partie de ce chapitre, nous comparerons les cinétiques d'initiation de différentes structures virales, dans l'idée de proposer des pistes d'élucidation des mécanismes qui régissent ce type d'initiation non-canonique.

Nous concluons ce manuscrit en présentant les perspectives possibles de ce travail de thèse. Nous avons démontré que notre technique était modulable et transposable à plusieurs questions biologiques concernant la dynamique du ribosome. Cette modularité nous autorise à imaginer des pistes variées pour poursuivre les accomplissements de ce travail de thèse.

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

Sommaire

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

1.1 La traduction eucaryote

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

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

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

1.1.1 Introduction au processus de traduction

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

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

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

1.1.2 Les principaux acteurs de la traduction

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

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

1.1. La traduction eucaryote

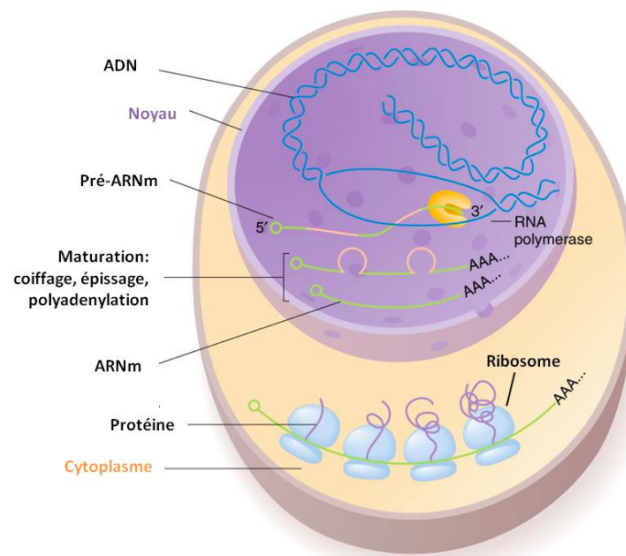


FIGURE 1.1 – Schéma illustratif d’une cellule eucaryote adapté de [Chommy 2012]. Les ARN messagers sont transcrits dans le noyau (en violet) puis maturés et enfin exportés dans le cytoplasme (en jaune) où ils seront traduits.

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

1.1.2.1 L’ARN messager

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

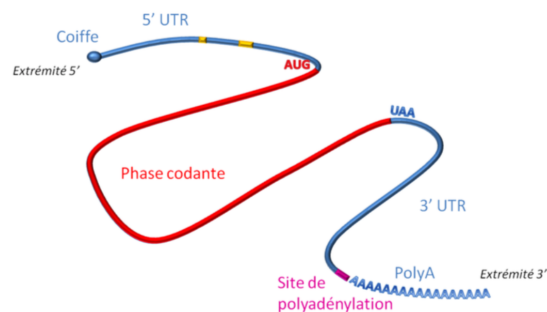


FIGURE 1.2 – Schéma illustratif des éléments constitutifs d’un ARN messager. Figure adaptée de [Chommy 2012]

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

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

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

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

1.1.2.2 Le ribosome

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

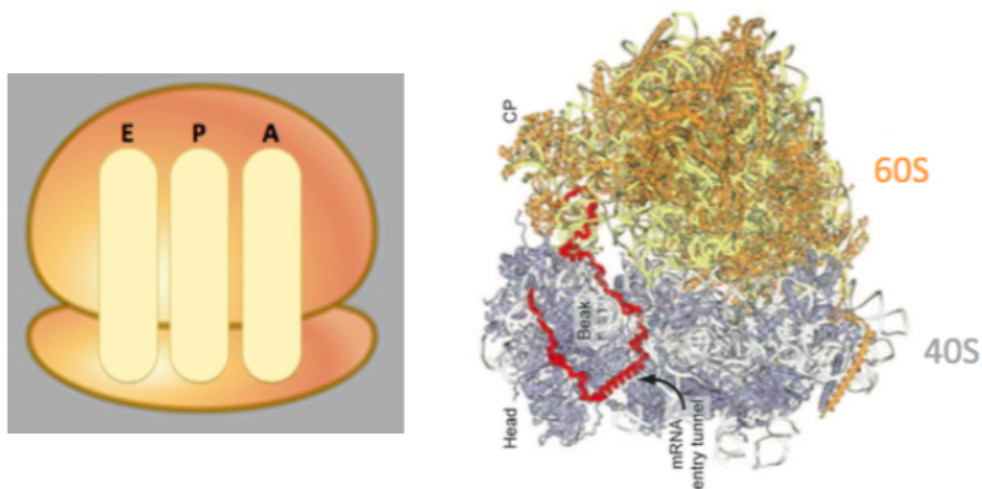


FIGURE 1.3 – Gauche : représentation schématique du ribosome avec les deux sous-unités et les trois sites A, P et E pour les ARN de transfert. Droite : structure cristallographique du ribosome 80S issue de [Ben-Shem 2011].

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

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

1.1. La traduction eucaryote

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

1.1.2.3 Les ARN de transfert

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

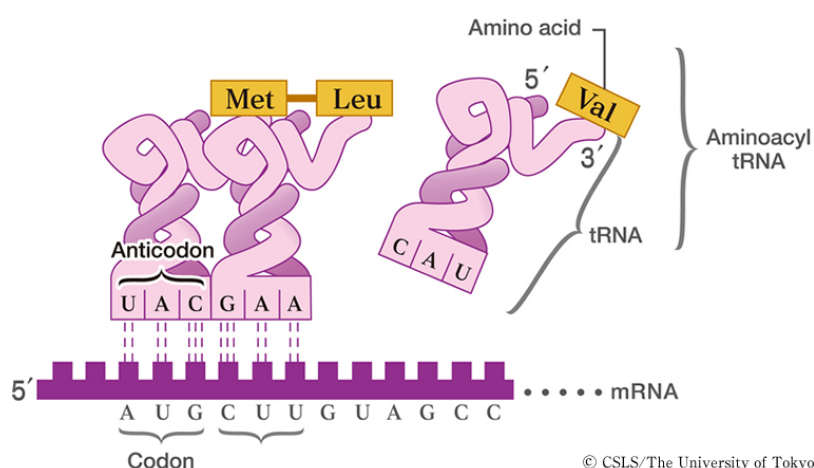


FIGURE 1.4 – Schéma illustratif de l'association des ARNt portant des acides aminés avec l'ARN messager via la liaison codon-anticodon adapté de [Asashima 2011]. On retrouve la structure en L des ARNt avec la boucle anticodon qui fait face à l'ARNm et la tige acceptrice qui porte un acide aminé (Met,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

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

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

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

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

1.1.3 Etapes du processus

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

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

1.1.3.1 Initiation canonique de la traduction eucaryote

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

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

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

1.1. La traduction eucaryote

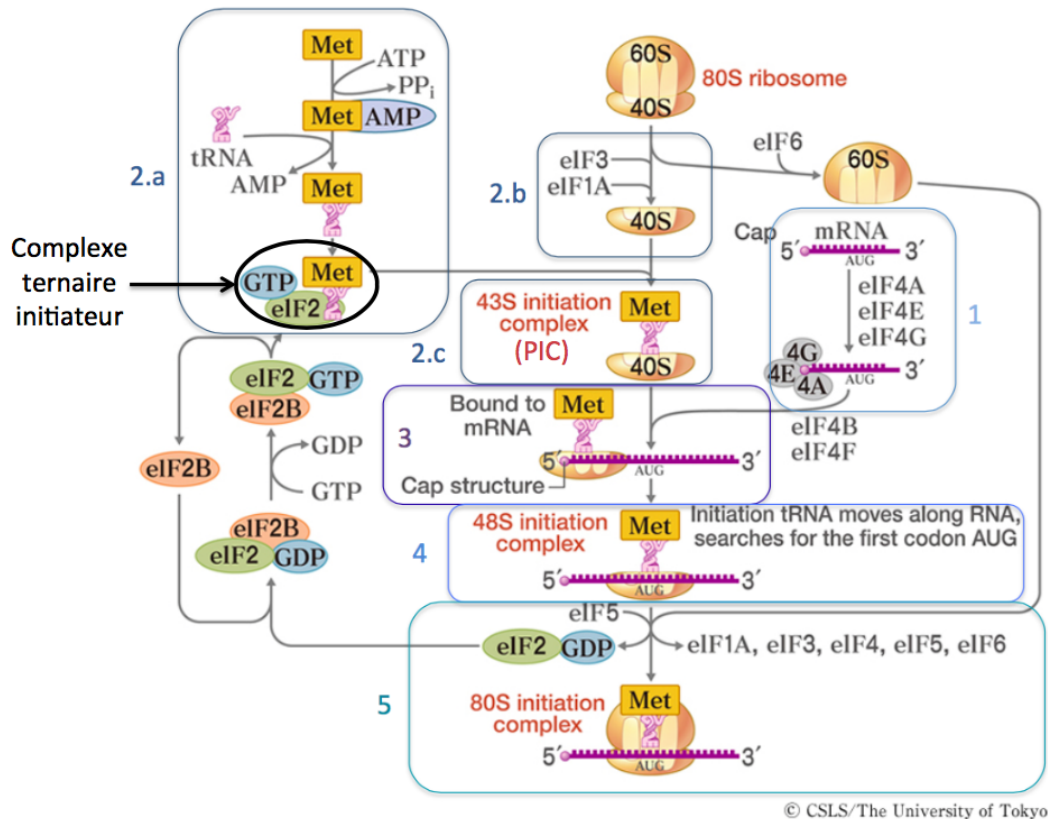


FIGURE 1.5 – Schéma illustratif des étapes de l'initiation de la traduction eucaryote adapté de [Asashima 2011].

1.1.3.2 Phase d'élongation

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

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

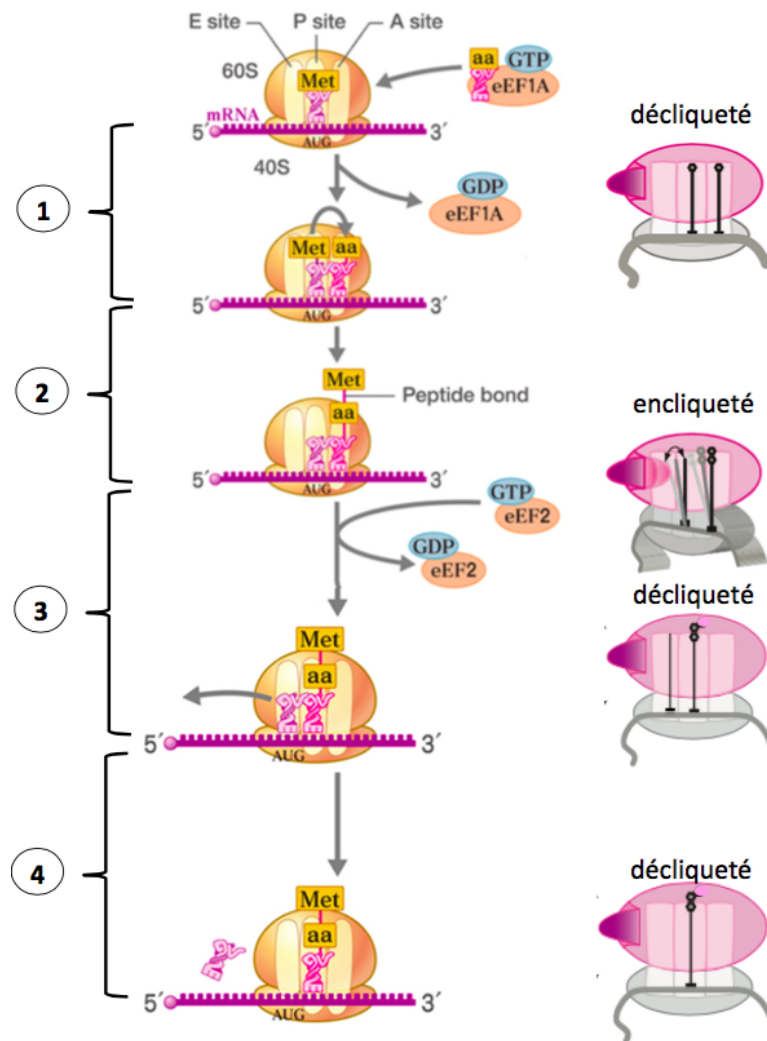


FIGURE 1.6 – Schéma illustratif des étapes de l'élongation de la traduction eucaryote adapté de [Asashima 2011].

peptidique.

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

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

1.2. Évènements non canoniques et erreurs programmées

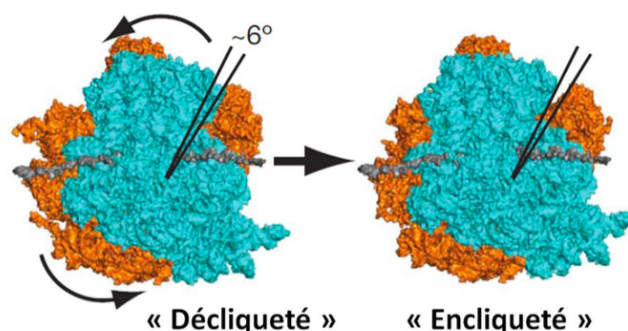


FIGURE 1.7 – Schéma illustratif du mouvement de cliquet effectué par les deux sous-unités du ribosome lors de l'étape de translocation. Les sous-unités effectuent une rotation l'une par rapport à l'autre avec un angle de 6° environ. Elles sont alors dans un état encliqueté. Lorsque la translocation est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

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

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

1.1.3.3 Terminaison

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

1.2 Évènements non canoniques et erreurs programmées

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

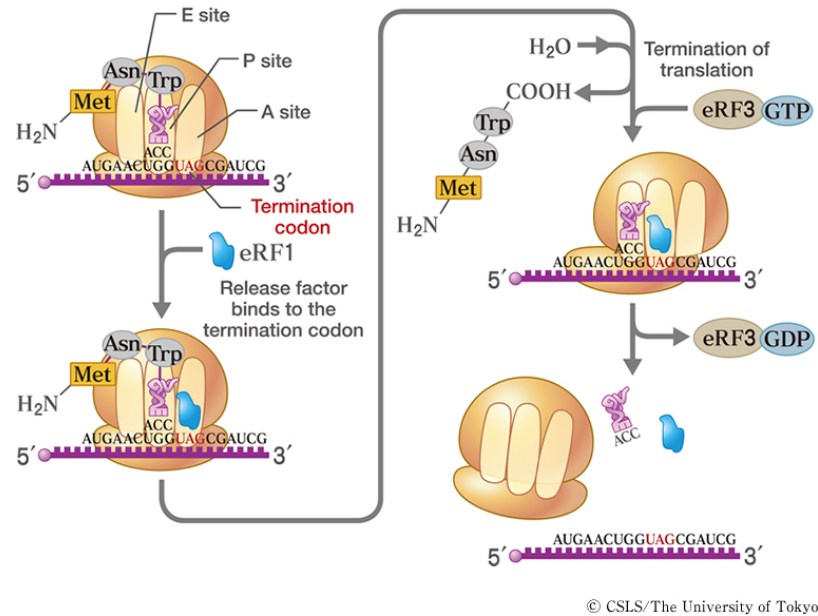


FIGURE 1.8 – Schéma illustratif des étapes de la terminaison de la traduction eucaryote adapté de [Asashima 2011].

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

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

1.2.1 Initiation non-canonique : les structures IRES

1.2.1.1 Qu'est ce qu'une structure IRES ?

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

1.2. Évènements non canoniques et erreurs programmées

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

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

1.2.1.2 Classification des structures IRES

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

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

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

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

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

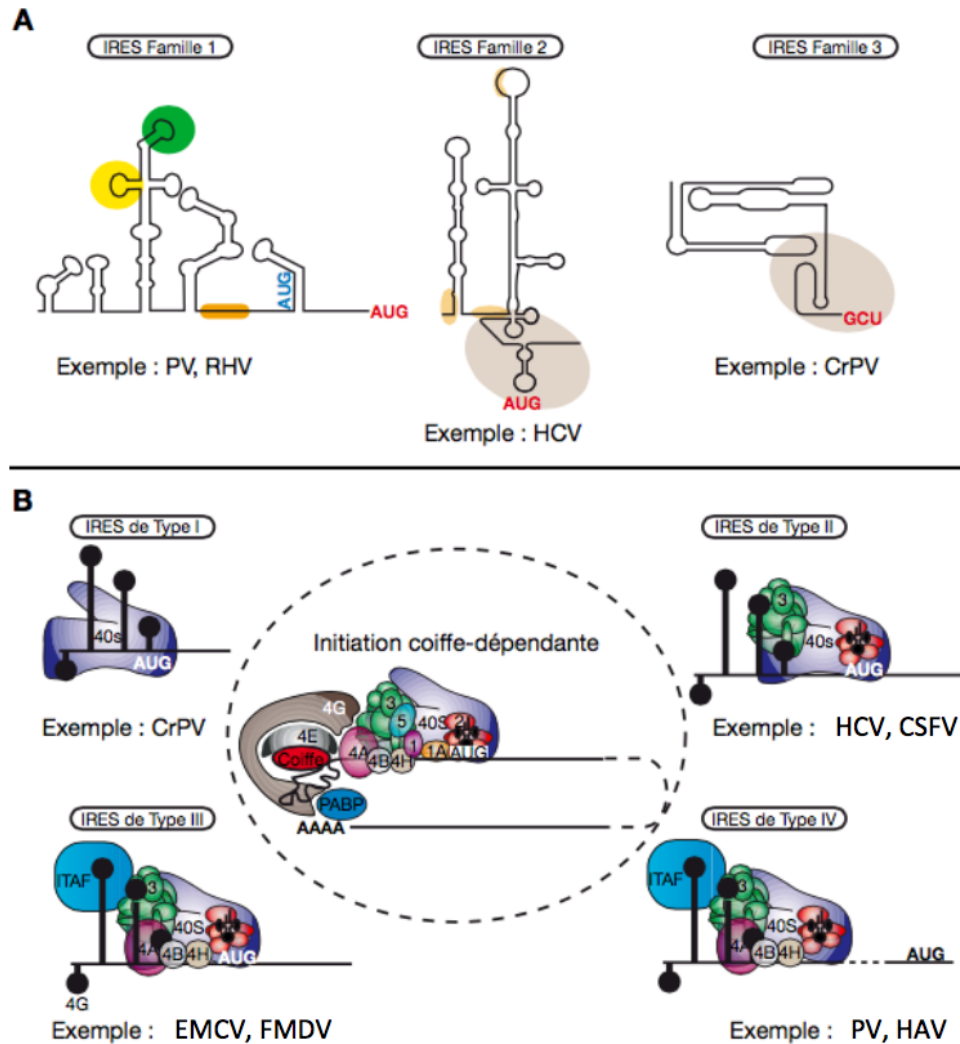


FIGURE 1.9 – Figure adaptée de [Pérard 2010]. (A) Schéma représentant les trois familles d'IRES définies par des critères de structure primaire et secondaire. (B) Schéma représentant les quatre types d'IRES définis sur le critère du nombre et de la nature des facteurs d'initiation nécessaires pour une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

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

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

1.2. Évènements non canoniques et erreurs programmées

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

1.2.1.3 Problématiques d'étude des IRES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2. Évènements non canoniques et erreurs programmées

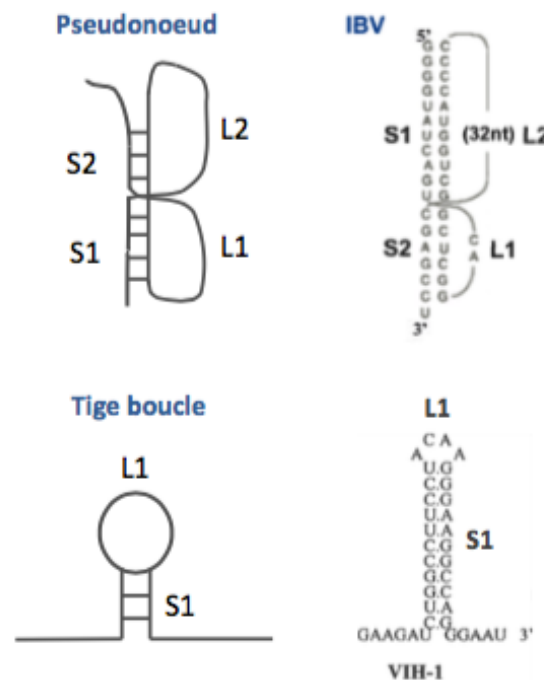


FIGURE 1.10 – Schéma représentant des structures secondaires identifiées comme inductrices de FS-1. En haut à droite, un pseudonœud que l'on retrouve dans la séquence du gène IBV et en bas à droite la tige boucle inductrice du gène dnaX de E.coli.

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

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

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

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

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

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

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

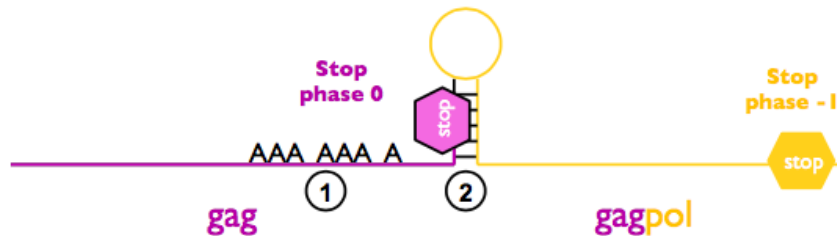


FIGURE 1.11 – Représentation schématique de la séquence inductrice de frameshift chez HIV qui permet au virus de produire les protéines gag et gagpol dans des proportions nécessaires à sa réplication.

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

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

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

1.2. Évènements non canoniques et erreurs programmées

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

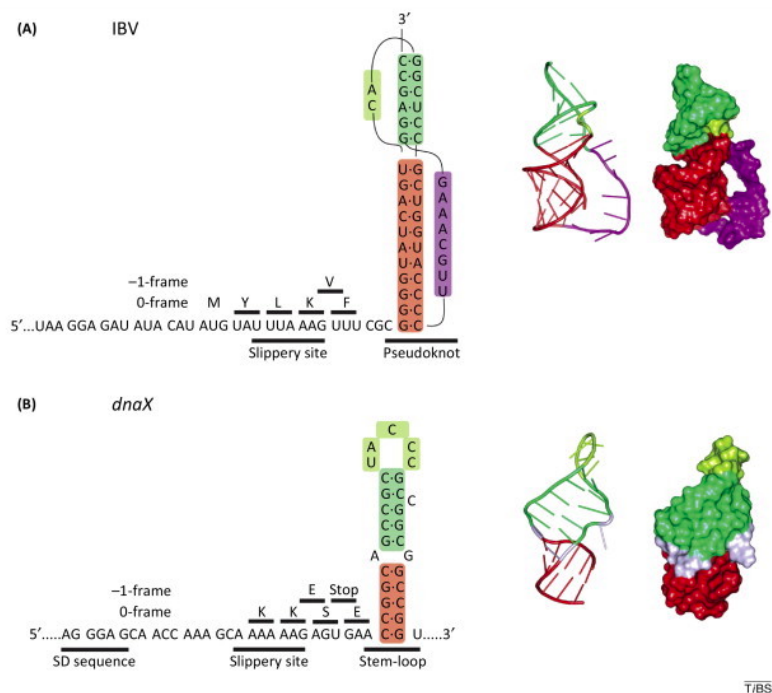


FIGURE 1.12 – Figure adaptée de [Caliskan 2014]. Schémas de séquences modèles inductrices de FS-1. (A) Séquence du gène IBV issue d'un virus affectant les organismes eucaryotes. A droite, la structure spatiale du pseudonœud en H caractéristique de cette séquence. (B) Séquence du gène *dnaX* de l'organisme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

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

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

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

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

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

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

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

1.2.3 Erreurs programmées de la terminaison : franchissement du codon stop

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

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

1.2. Évènements non canoniques et erreurs programmées

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

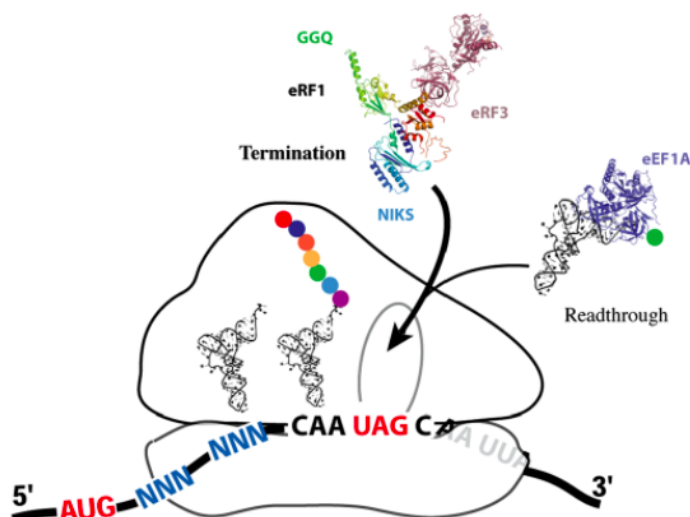


FIGURE 1.13 – Schéma du mécanisme de franchissement du codon stop illustrant la compétition entre l'incorporation des facteurs de terminaison eRF1-eRF3 et celle d'un ARNt proche-cognat au site A.

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

1.2.4 Événements non canoniques : un champ de recherche ouvert

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

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

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

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

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

1.3.1 Principe et atouts de la molécule unique

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

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

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

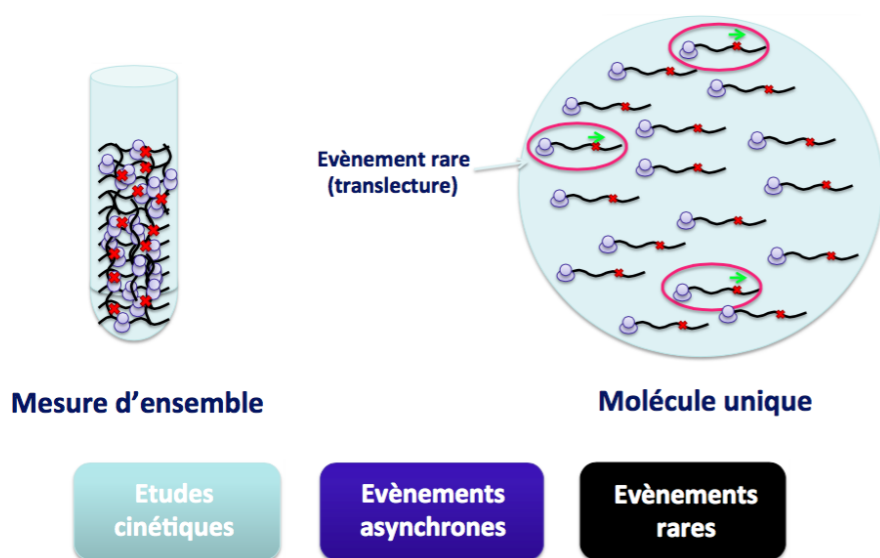


FIGURE 1.14 – Schéma représentant les enjeux de la molécule unique et ses atouts pour l'étude de la dynamique du ribosome

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

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

1.3.2 Techniques de molécule unique

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

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

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

1.3.2.1 Exemples de microscopies de fluorescence en molécule unique

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

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

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

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

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

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

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

1.3.3 Stratégies de marquage pour la molécule unique

1.3.3.1 Différentes possibilités de marquage

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

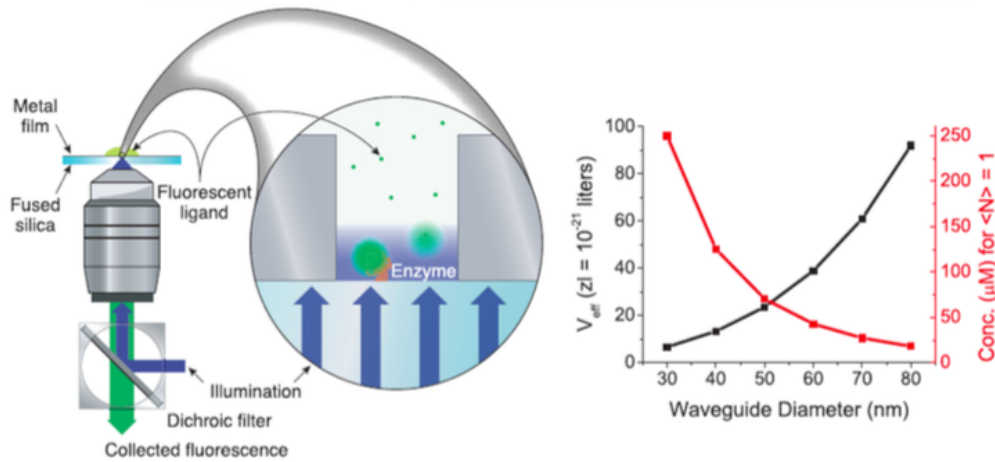


FIGURE 1.15 – Figure adaptée de [Levene 2003]. A Gauche : principe d’une expérience de microscopie de fluorescence avec un échantillon nanostructuré sous forme de ZMW. Une couche de 100 nm d’aluminium est déposée sur une lamelle de microscope et percée de trous de diamètre allant de 30 à 100 nm par lithographie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

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

1.3.3.2 Marquage du ribosome procaryote

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

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

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

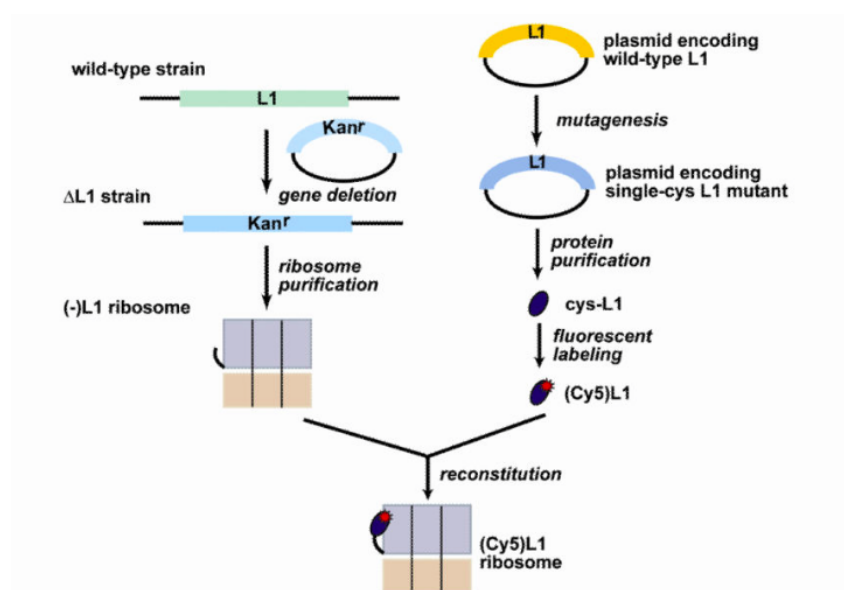


FIGURE 1.16 – Figure adaptée de [Fei 2010] illustrant la méthode de marquage du ribosome par modification de la protéine L1. Des ribosomes modifiés pour lesquels L1 a été déléetée sont produits et purifiés d'un côté et par une autre voie un complexe (Cy5)L1 est produit. L'ensemble du système est reconstitué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

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

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

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

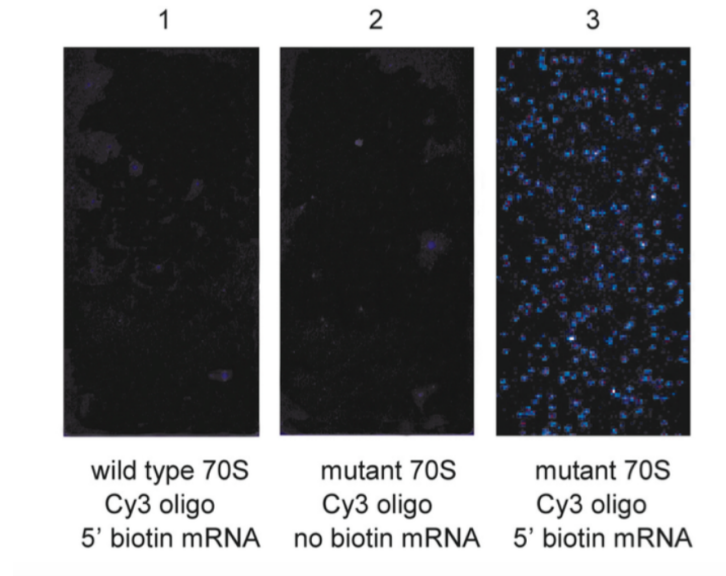


FIGURE 1.17 – Figure adaptée de [Dorywalska 2005]. Images de microscopie de fluorescence en réflexion totale de ribosomes 70S accrochés spécifiquement en surface de l'échantillon. (1) image TIRFM lorsque les ARNm ribosomiaux ne sont pas mutés. Aucun signal de fluorescence n'est visible. (2) Image TIRFM,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

gation.

1.3.3.3 Marquage du ribosome eucaryote

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

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

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

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

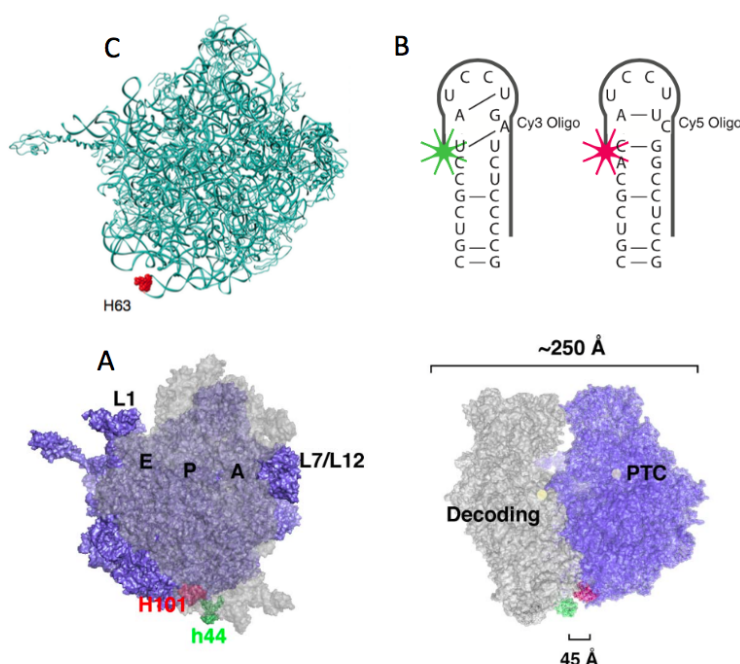


FIGURE 1.18 – Figures adaptées de [Dorywalska 2005] et [Petrov 2010]. Cartographies réalisées par cristallographie X illustrant les positions des ARNm ribosomaux modifiés dans le but de marquer le ribosome spécifiquement. (A) Marquage d'un ribosome eucaryote au niveau des boucles H101 et H44. Ces boucles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

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

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

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

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

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

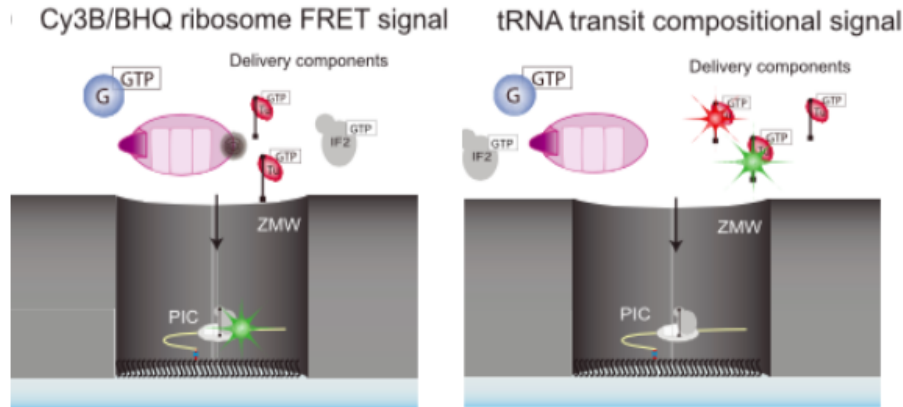


FIGURE 1.19 – Figure adaptée de [Chen 2014] illustrant les techniques utilisées, la stratégie de marquage et la nature des signaux étudiés. Gauche : la SU 30S est marquée spécifiquement avec Cy3 et la 50S avec un Black Hole Quencher (BHQ). Les positions des marqueurs sont contrôlées et telles que lorsque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

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

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

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

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

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

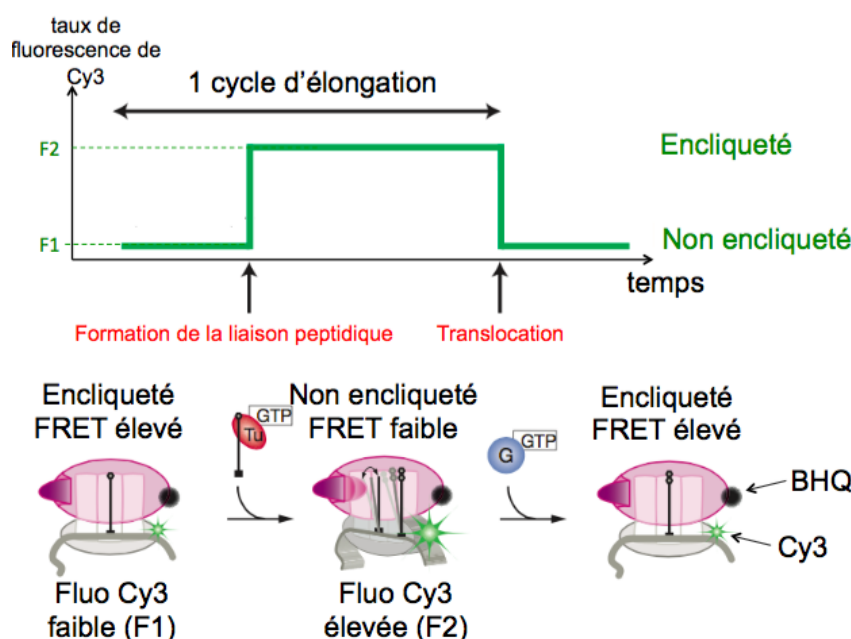


FIGURE 1.20 – Figure adaptée de [Chen 2014] décrivant le niveau de fluorescence du marqueur Cy3 de la petite SU en fonction de la conformation du ribosome 70S.

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

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

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

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

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

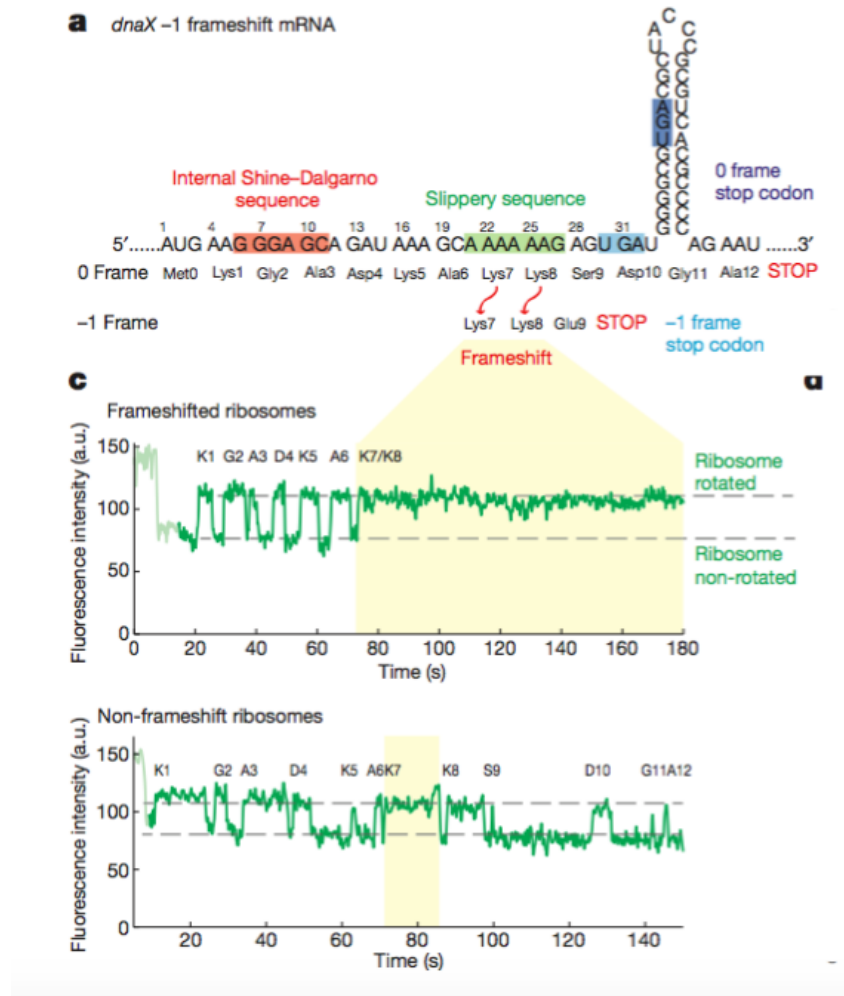


FIGURE 1.21 – Figure adaptée de [Chen 2014] illustrant la pause du ribosome dans un état encliqueté au niveau de la séquence glissante. (a) Séquence *dnaX* inductrice de FS -1 chez *E.coli*. On retrouve surlignée en rouge la séquence Shine-Dalgarno, en vert la séquence glissante et en bleu les codons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

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

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

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

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

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

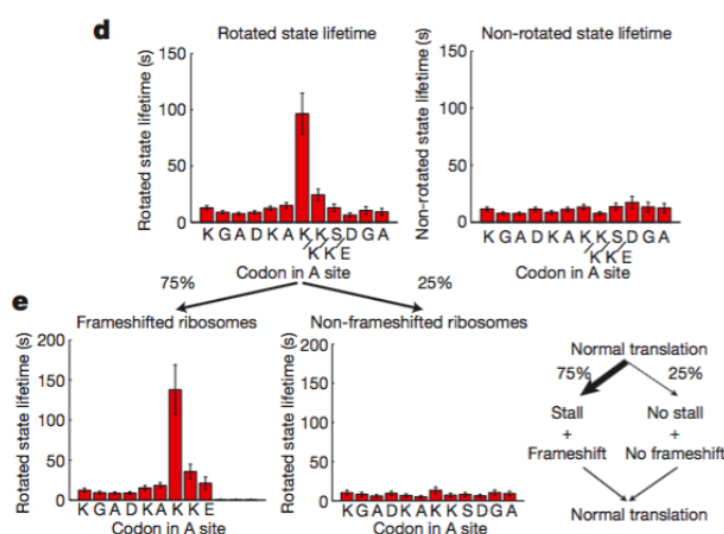


FIGURE 1.22 – Figure adaptée de [Chen 2014] illustrant les deux populations cinétiques mises en jeu dans l'étude du FS-1. (d) A gauche, histogramme de répartition du temps moyen passé par les ribosomes dans l'état encliqueté en fonction du codon traduit. A droite, idem pour l'état non-encliqueté. A ce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

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

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

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

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

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

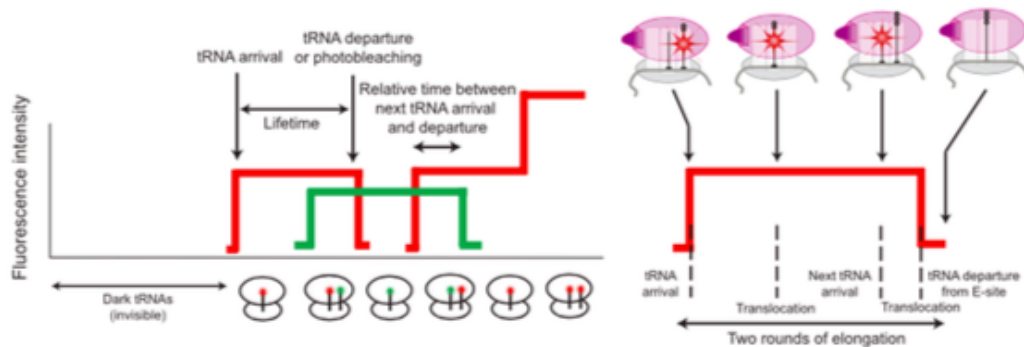


FIGURE 1.23 – Figure adaptée de [Chen 2014] montrant les signaux de fluorescence attendus lors des incorporations successives par le ribosome d'un ARNt marqué Cy5 (rouge), puis d'un ARNt Cy3 (vert) et enfin de 2 ARNt successifs marqués Cy5. Les étapes correspondantes du cycle d'élongation sont indiquées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

On observe sur la figure 1.23 l'évolution du signal de fluorescence d'un ARNt couplé à une cyanine (en rouge) lorsqu'il transite dans les trois sites du ribosome. Lorsque l'ARNt est recruté on observe l'apparition du signal de fluorescence. Ce signal est stable pendant le transit de l'ARNt. Une fois qu'il est éjecté du site E, l'ARNt va sortir de la zone d'observation et le signal de fluorescence va disparaître. La perte du signal de fluorescence du fait du départ de l'ARNt du site E est en concurrence avec sa disparition par photoblanchiment ¹¹.

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

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

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

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

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

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

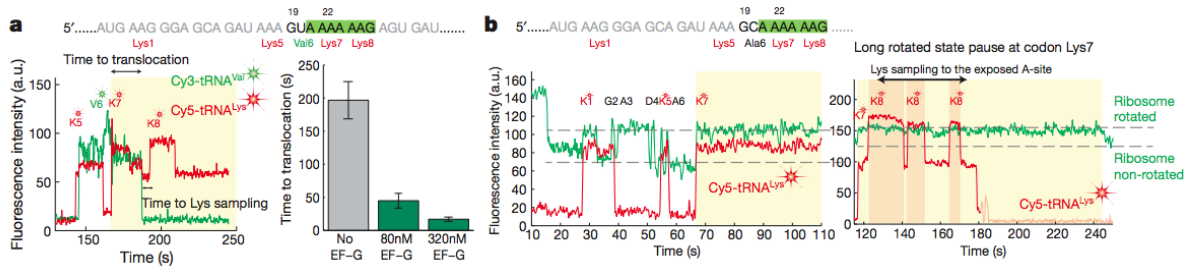


FIGURE 1.24 – Signaux de fluorescences des ARN de transfert qui transitent dans le ribosome. (a) Évolution du signal de fluorescence des ARNt marqués Cy3-tRNA-Val et Cy5-tRNA-Lys au cours du temps. Le premier signal apparaît lors de l'incorporation d'une valine au codon K5. Il est suivi de l'arrivée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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

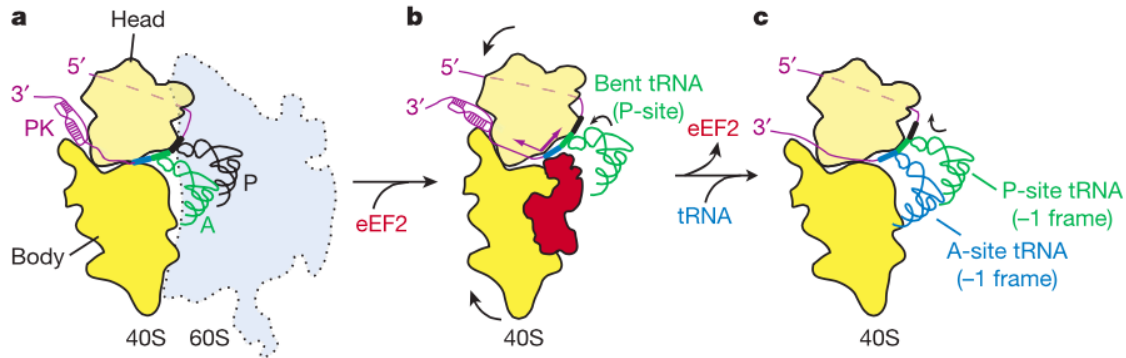


FIGURE 1.25 – Figure adaptée de [Namy 2006]. Schéma illustratif des interactions entre le ribosome et le pseudonœud (PK) de l'ARNm IBV potentiellement responsable du FS-1. (a) Illustration de l'interaction des sous-unités 40S et 60S avec le pseudonœud d'IBV. (b) Illustration des mécanismes de tensions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

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

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

1.3.5 Exemple d'étude de l'initiation IRES dépendante

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

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

1.3.5.1 Apports des études structurales

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

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

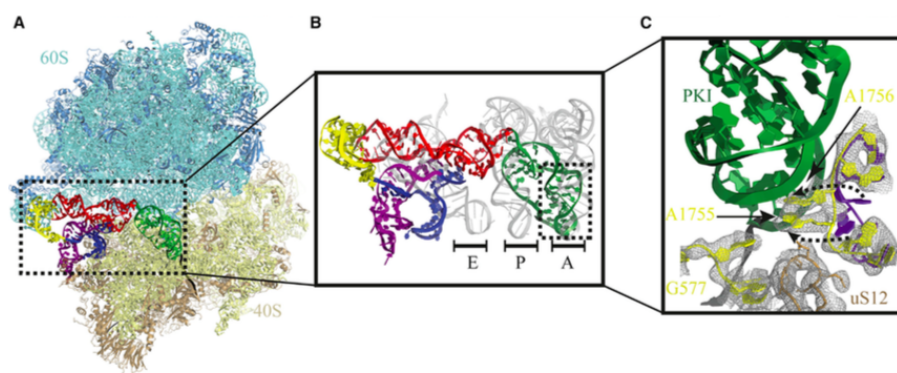


FIGURE 1.26 – Figure adaptée de [Fernández 2014]. Cartographie réalisée en Cryo-EM d'un ribosome en interaction avec l'IRES CrPV. (A) Cartographie générale du ribosome 80S initié sur l'IRES CrPV (B) Zoom sur la structure spatiale du domaine PKI (en vert) qui mime un ARNt initiateur au site A du ribosome.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

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

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

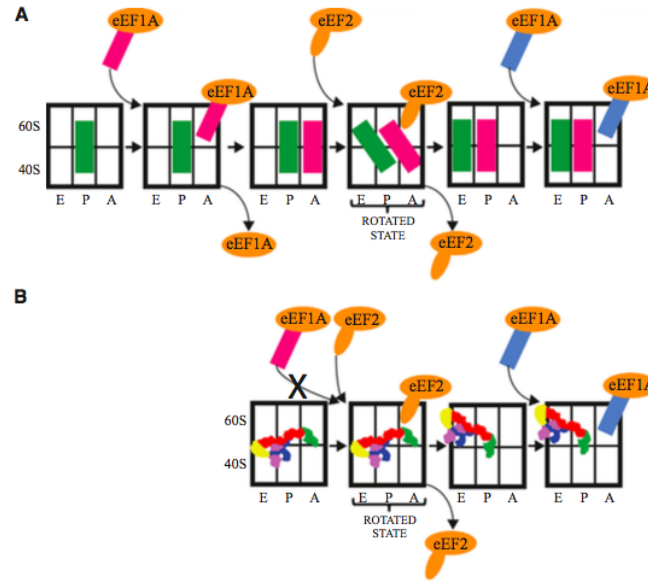


FIGURE 1.27 – Schéma illustratif du mécanisme du premier évènement de translocation lors de l'initiation par une IRES CrPV proposé par [Fernández 2014]. Seuls les 3 sites A,P et E du ribosome sont représentés. Les rectangles de couleur correspondent aux ARNt. (A) Cycle d'élongation normal. (B) Cycle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

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

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

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

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

1.3.5.2 Etude cinétique du recrutement du ribosome par une IRES CrPV

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

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

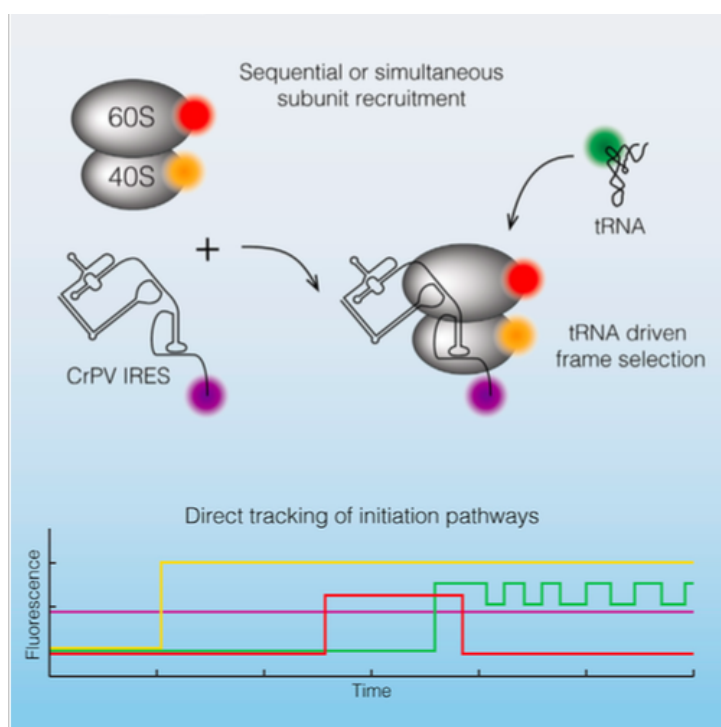


FIGURE 1.28 – Figure adaptée de [Petrov 2016]. Illustration du principe de la mesure de la cinétique de l'initiation IRES dépendante par microscopie de fluorescence en molécule unique.

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

marqués importantes.

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

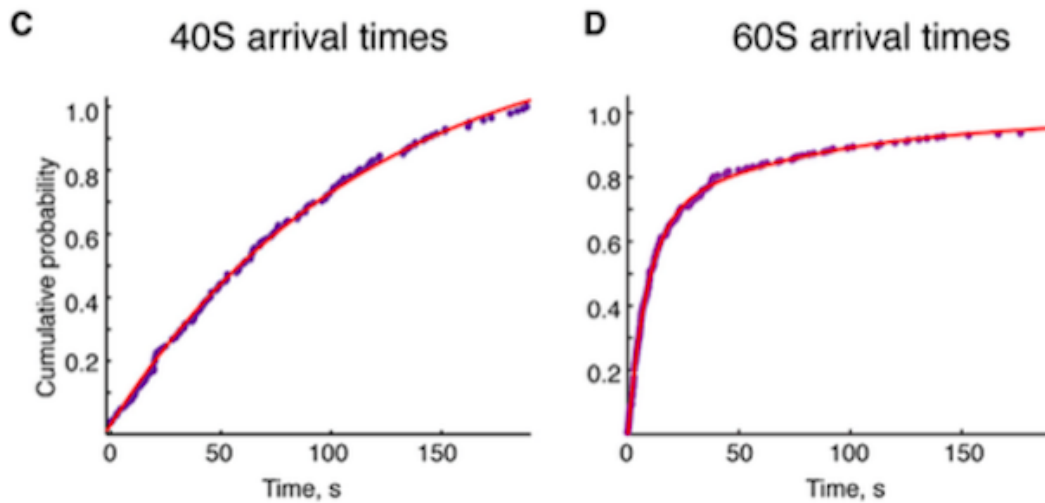


FIGURE 1.29 – Figure adaptée de [Petrov 2016]. Mesures de la cinétique d'association des complexes 40S :CrPV puis 40S :60S :CrPV. (C) Mesure de la cinétique d'association de la sous-unité 40S sur l'IRES CrPV. (D) Mesure de la cinétique d'association de la sous-unité 60S sur le complexe 40S :CrPV.

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

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

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

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

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

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

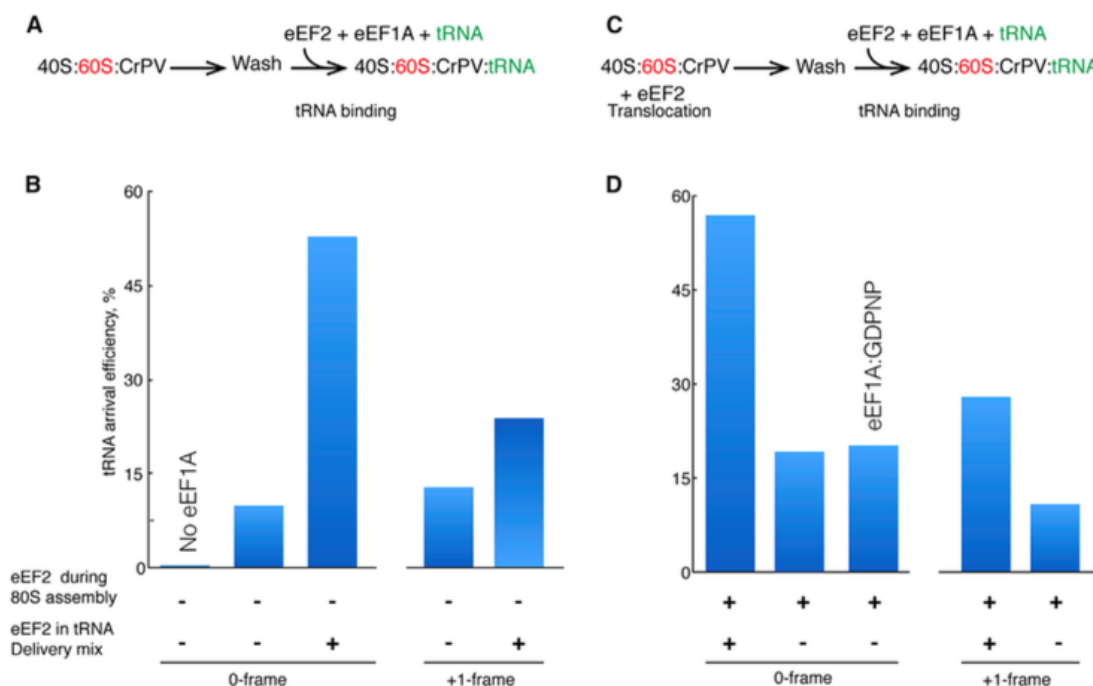


FIGURE 1.30 – Figure adaptée de [Petrov 2016]. Expérience de mesure du rôle du facteur d'élongation eEF2 durant le recrutement des sous-unités ribosomiques et les premiers cycles de translocation. eEF2 peut n'être introduit que lors du premier cycle d'élongation, avec l'ARNt et eEF1A (A) ou dès l'étape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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

suivants.

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

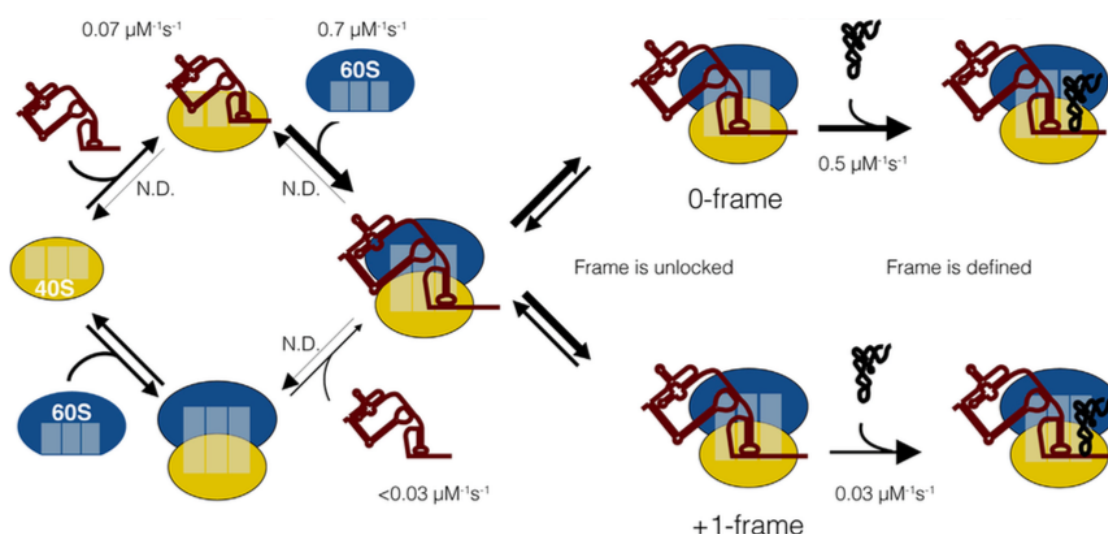


FIGURE 1.31 – Modèle cinétique proposé par [Petrov 2010] décrivant les principales étapes de l'initiation CrPV dépendante : 1. recrutement simultané ou séquentiel des deux sous-unités 2. premier cycle de translocation du domaine PKI, étape instable cinétiquement et réversible qui conduit à une indétermination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

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

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

1.3.6.1 Une technique récente qui ouvre un nouveau champ de possibilités

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

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

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

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

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

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

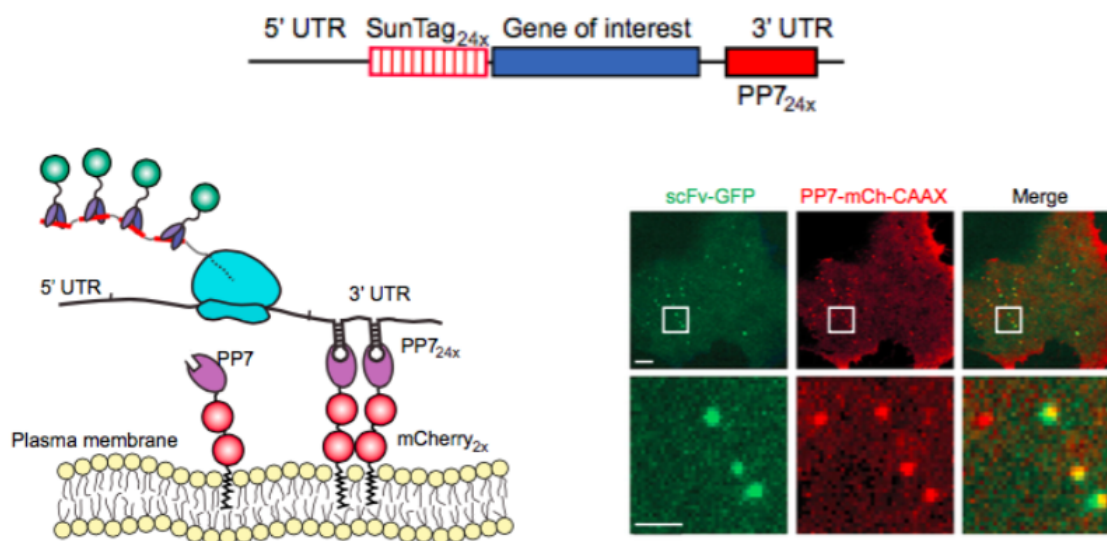


FIGURE 1.32 – Figure adaptée de [Yan 2016]. Illustration du principe de la technique de marquage SunTag et du principe de la mesure cinétique réalisée dans l'étude [Yan 2016]. Les ARN messagers d'intérêt sont spécifiquement accrochés à la membrane et marqués grâce à l'interaction entre les structures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

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

1.3.6.2 Mesurer une cinétique de traduction in-vivo

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

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

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

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

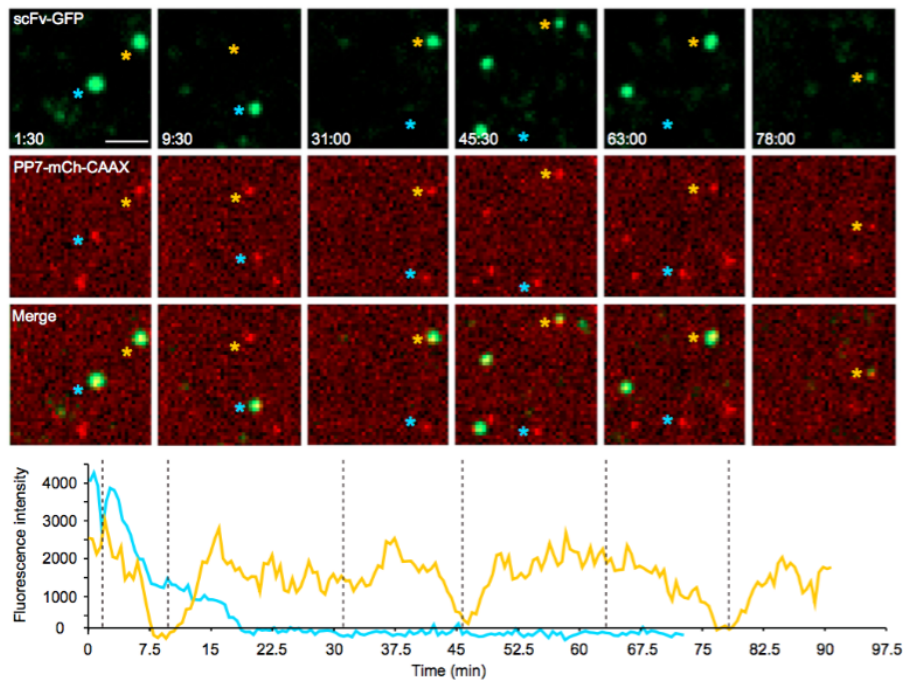


FIGURE 1.33 – Figure adaptée de [Yan 2016]. En haut, images de microscopie de fluorescence au cours du temps dans les différents canaux d'émission. On détecte deux sites de traduction marqués par une étoile bleue et jaune et l'on peut suivre leur évolution au cours du temps. En bas, cette évolution est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

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

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

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

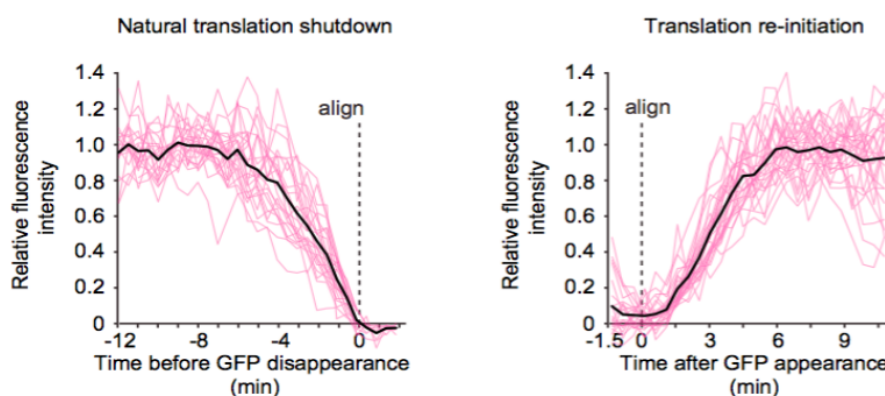


FIGURE 1.34 – Figure adaptée de [Yan 2016]. Traces temporelles moyennes (sur plusieurs dizaines de sites dont les cinétiques sont représentées en rose) illustrant les phénomènes d'extinction et de réapparition de la traduction. L'extinction est visualisée par une décroissance sur une échelle de plusieurs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

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

1.3.6.3 Quelques limitations

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

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

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

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

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

1.4 Principe de notre mesure en molécule unique

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

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

1.4.1 Enjeux de la mesure

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

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

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

1.4. Principe de notre mesure en molécule unique

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

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

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

1.4.2 Définition du système biologique rapporteur

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

1.4.2.1 Intégrité biologique du système : un enjeu essentiel

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

1.4.2.2 Description de l'ARN messager

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

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

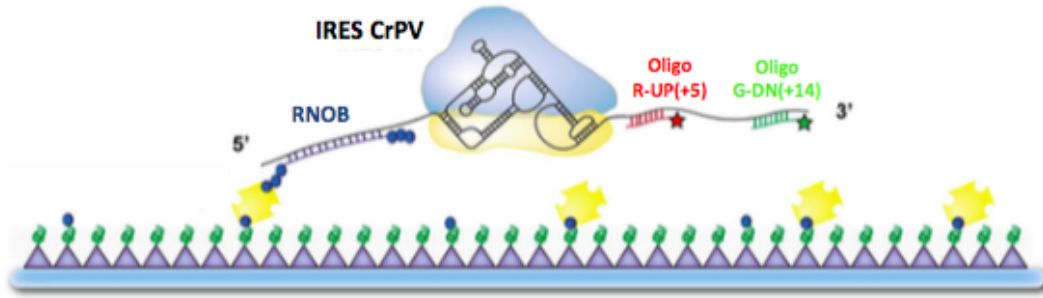


FIGURE 1.35 – Système rapporteur de référence pour l'étude de la traduction eucaryote en molécule unique.

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

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

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

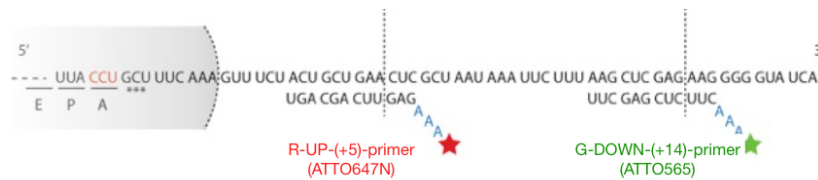


FIGURE 1.36 – Hybridation des oligo-fluorophores sur l'ARN messenger.

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

1.4. Principe de notre mesure en molécule unique

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

1.4.3 Principe de la mesure cinétique

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5 Conclusion

J'ai présenté dans ce chapitre les enjeux biologiques et techniques du projet de recherche qui fait l'objet de ce manuscrit de thèse. Le ribosome eucaryote est un moteur moléculaire chargé de la synthèse des protéines (appelée traduction) dont l'activité est hautement dynamique. Progressivement l'ensemble des acteurs du processus de traduction ont été identifiés, et le ribosome lui-même a pu être cartographié et décrit très précisément à l'échelle atomique.

Pour autant de nombreuses interrogations demeurent sur les mécanismes de la traduction et leur déroulement cinétique. Particulièrement, un champ de recherche dynamique s'est développé autour des mécanismes non canoniques associés à la traduction comme l'initiation par une structure IRES virale ou les phénomènes d'erreurs programmées. Ces événements non canoniques engagent des mécanismes différents et souvent en concurrence avec les mécanismes canoniques de la traduction eucaryote. Leur description est encore incomplète et pose plusieurs défis pour les techniques biochimiques classiques d'étude de la traduction.

Dans ce contexte, les techniques de molécule unique possèdent de véritables atouts pour explorer la cinétique des mécanismes de traduction. Elles sont particulièrement adaptées pour isoler au sein d'une population de ribosomes des événements isolés non-canoniques comme les erreurs programmées afin de préciser leurs mécanismes particuliers. J'ai montré au travers d'un corpus d'articles les apports de la microscopie de fluorescence en molécule unique sur des problématiques comme l'initiation par une IRES virale ou l'étude du décalage de la phase de lecture. Les auteurs de ces articles ont pu étudier chaque étape de ces processus et mettre à jour les principales étapes des mécanismes impliqués, ainsi que leur cinétique. Leurs observations se sont révélées complémentaires de celles réalisées avec d'autres techniques de mesures biochimiques ou structurales. De fait, il n'y a pas de suprématie de la molécule unique, il s'agit surtout d'un ensemble de techniques qui ouvrent de nouvelles possibilités pour l'étude du ribosome. J'ai choisi de finaliser cet état de l'art avec une récente application de la microscopie de fluorescence en molécule unique appliquée in-vivo, qui ouvre la voie à une étude du processus de traduction d'un point de vue plus global à l'échelle cellulaire. Enfin, nous avons abordé le principe de notre étude cinétique par microscopie de fluorescence en molécule unique, ainsi que le système rapporteur qui a été imaginé à partir des enjeux de la mesure.

Dans le prochain chapitre, nous présenterons le dispositif expérimental de microscopie de fluorescence en réflexion totale (TIRFM) mis en place par l'équipe avant mon arrivée en thèse et entièrement pensé et optimisé dans le but de mesurer la cinétique de traduction du ribosome eucaryote à l'échelle de la molécule unique.

Microscopie de fluorescence en réflexion totale à l'échelle de la molécule unique

Sommaire

2.1 Bases de microscopie de fluorescence	54
2.1.1 Phénomène de fluorescence	54
2.1.2 Techniques de microscopie de fluorescence	56
2.1.3 Principe détaillé de la microscopie TIRFM	59
2.2 Description du dispositif de TIRFM	60
2.2.1 Voie d'excitation	60
2.2.2 Détection du signal de fluorescence	61
2.3 Cellule microfluidique et positionnement de l'échantillon sur le micro- scope	63
2.3.1 Choix et description de la cellule microfluidique	63
2.3.2 Chimie de surface : accroche des systèmes biologiques	65
2.3.3 Positionnement de l'échantillon sur le microscope et contrôle en température	67
2.4 Acquisition du signal et rétroaction sur la mise au point	68
2.4.1 Acquisition du signal à l'aide d'un séquenceur	68
2.4.2 Développement d'un système de maintien de la mise au point	70
2.5 Traitement des données TIRFM et extraction de la cinétique de départ des jalons fluorescents	72
2.5.1 Objectifs du traitement des données : soustraire le fond de fluorescence pour détecter des molécules uniques	72
2.5.2 Traitement du fond de fluorescence	73
2.5.3 Extraction de la cinétique de départ des marqueurs	76
2.6 Conclusion	82

Nous avons choisi d'étudier la cinétique de traduction du ribosome mammifère sur plusieurs cycles d'élongation en molécule unique et plus précisément grâce à une technique de microscopie de fluorescence en réflexion totale (TIRFM). Ce chapitre décrit le dispositif expérimental développé pour aborder notre problématique. Je m'attacherai ici à décrire les éléments du dispositif qui ont constitué une base déjà existante et optimisée à mon arrivée en thèse :

- le montage optique de TIRFM en lui-même, combinant un système d'illumination et un système de détection du signal de fluorescence adapté pour l'étude de deux fluorophores de couleurs différentes,

- la cellule microfluidique qui contiendra les échantillons biologiques et le dispositif permettant le positionnement de l'échantillon et son contrôle en température,
- le principe d'accroche de nos systèmes biologiques en surface de la cellule microfluidique, nécessaire pour mener une expérience en TIRFM.

2.1 Bases de microscopie de fluorescence

Nous présenterons dans cette section les principes de base de la microscopie de fluorescence et ce qui a amené l'équipe à choisir la microscopie TIRFM parmi les techniques existantes.

2.1.1 Phénomène de fluorescence

2.1.1.1 Description du phénomène de fluorescence

Une molécule fluorescente est une molécule qui, suite à l'absorption d'un rayonnement, va émettre à son tour de façon spontanée de la lumière. Cette propriété est intrinsèque aux molécules en question.

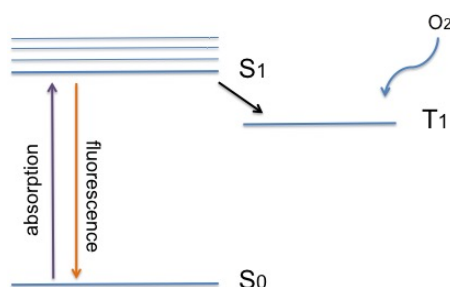


FIGURE 2.1 – Diagramme de Jablonski avec les niveaux d'énergie singulets et triplets d'une molécule fluorescente organique

La fluorescence est un processus d'interaction lumière-matière qui peut être décrit du point de vue de la physique moléculaire en considérant le diagramme de Jablonski (figure 2.1). La molécule est initialement dans l'état singulet fondamental S_0 . Par absorption d'un photon elle est amenée dans un état vibrationnel de l'état excité singulet S_1 . Suit alors un retour à l'état fondamental par l'émission d'un photon de fluorescence. Il est important de noter qu'un processus vient concurrencer la fluorescence quand la molécule est dans l'état S_1 . Elle peut être amenée par le phénomène de croisement inter-système dans un autre état excité métastable appelé état triplet. Ce processus bien que peu favorable (il s'agit normalement d'une transition interdite) a une probabilité non nulle de se produire.

2.1.1.2 Phénomène de photoblanchiment

L'état triplet présenté dans le paragraphe précédent a un temps de vie relativement long (10^{-3} à 10^{-4} s) en comparaison du temps de vie de l'état singulet (entre 10^{-7} à 10^{-9} s pour des

2.1. Bases de microscopie de fluorescence

fluorophores organiques), ce qui autorise des interactions entre la molécule excitée et son environnement. L'une de ces interactions est appelée processus de photoblanchiment. Par réaction chimique photo-induite avec l'environnement et en particulier avec l'oxygène qu'il contient, les molécules piégées dans l'état triplet vont perdre leur propriété de fluorescence. Le photoblanchiment entraîne une perte irréversible de la fluorescence de la molécule au bout d'un temps variable. Néanmoins, pour chaque type de fluorophore, on peut caractériser le phénomène de photoblanchiment en regardant l'évolution temporelle du signal de fluorescence d'un grand nombre de molécules émettrices. Ce signal décroît mono-exponentiellement au cours du temps et le temps caractéristique de décroissance du signal donne la durée de vie avant photoblanchiment τ du fluorophore dans les conditions d'excitation de l'expérience.

Le phénomène de photoblanchiment dépend du fluorophore, des conditions d'excitation et de l'environnement du dit fluorophore. Il est donc difficile de donner une valeur absolue de la durée de vie avant photoblanchiment, il faut l'évaluer dans les conditions réelles de l'expérience pour un marqueur fluorescent donné. En pratique, c'est une grandeur empirique.

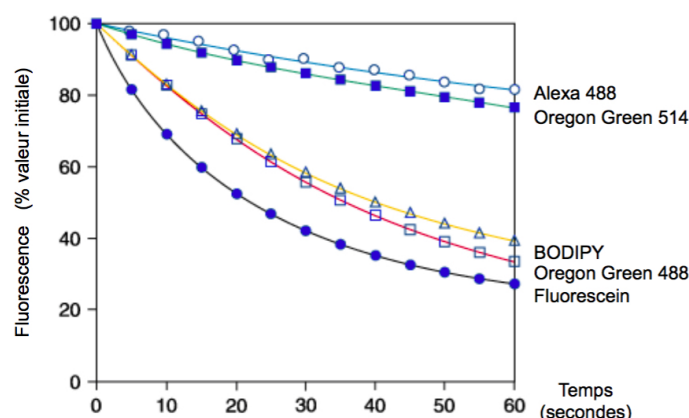


FIGURE 2.2 – Exemple de courbes d'évolution de la fluorescence au cours du temps pour différents fluorophores organiques. Source : ENS Cachan, TP cours M1.

Comme nous souhaitons observer la disparition du signal de fluorescence des marqueurs lorsqu'ils sont détachés par le ribosome, le phénomène de photoblanchiment est en concurrence directe avec le signal de traduction. Augmenter la durée de vie de nos fluorophores en minimisant le phénomène de photoblanchiment est donc un enjeu important pour notre étude. Cet enjeu se pose dès la conception de l'expérience dans le choix des fluorophores utilisés pour marquer l'ARN messenger.

2.1.1.3 Choix du type de fluorophores

Les fluorophores utilisés pour marquer l'ARN messenger ont été choisis selon deux critères principaux : leurs propriétés photophysiques (brillance, spectres d'émission et d'absorption...) et leur adaptation au système rapporteur décrit dans le chapitre 1.

Chapitre 2. Microscopie de fluorescence en réflexion totale à l'échelle de la molécule unique

Il nous faut prendre en considération la nécessité de venir hybrider les fluorophores sur l'ARN messager via des oligo-nucléotides. Le fluorophore doit donc être compatible avec une accroche de ce type. Mais il faut également que le ribosome puisse détacher la sonde fluorescente au moment de son passage. Cette nécessité exclut des fluorophores qui auraient une dimension trop importante.

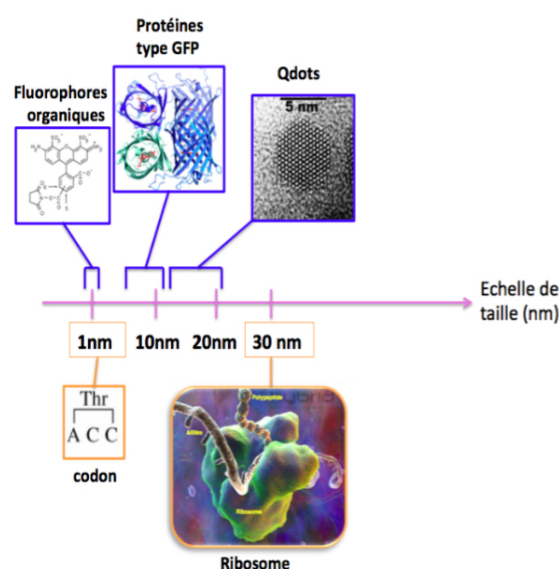


FIGURE 2.3 – Echelle de taille de quelques fluorophores comparés aux éléments constitutifs de notre système rapporteur.

Les nanocristaux semi-conducteurs (ou quantum dots) ou les nanodiamants par exemple, bien que présentant des propriétés photophysiques très intéressantes (photoblanchiment faible ou inexistant, grande brillance) ont presque la même dimension que le ribosome (cf.figure 2.3). Ils risquent de perturber fortement l'activité de celui-ci au moment où il les rencontre.

On favorise donc des petits fluorophores organiques dont la dimension, de l'ordre du nm, est beaucoup plus adaptée. Ces molécules sont aussi facilement couplées à un oligo-nucléotide.

Notre choix s'est porté sur les ATTO 565 et 647N (disponibles commercialement chez ATTO-TEC ou directement couplés à des brins d'ARN chez Eurogentec par exemple) pour leurs excellentes propriétés photophysiques en molécule unique. Nous les exciterons respectivement dans le vert (532nm) et dans le rouge (640nm). Leur spectres sont présentés sur la figure 2.4.

Maintenant qu'ont été présentés les aspects de marquage essentiels pour réaliser une expérience de microscopie de fluorescence, nous décrirons les techniques de microscopie de fluorescence utilisées pour sa mise en œuvre.

2.1.2 Techniques de microscopie de fluorescence

L'observation de signaux fluorescents repose sur quatre éléments clés : 1) une source de lumière pour l'excitation, 2) un fluorophore, 3) des filtres pour séparer les photons d'émission

2.1. Bases de microscopie de fluorescence

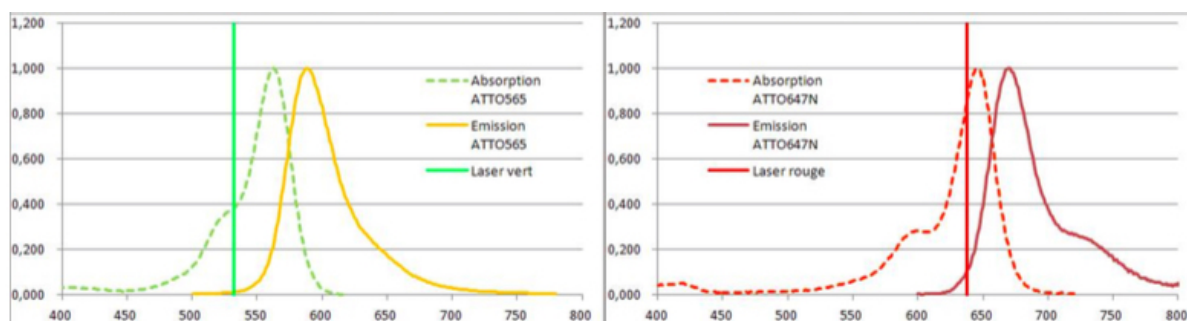


FIGURE 2.4 – Spectres d’émission (traits pleins) et d’absorption (pointillés) des fluorophores ATTO565 et ATTO647N en fonction de la longueur d’onde (en nm) utilisés dans notre étude. Les spectres sont normalisés à 1.

des photons d’excitation, 4) un détecteur qui enregistre l’émission de photon et transforme ce signal lumineux en signal électrique ou en image.

Au delà de ces principes généraux, différentes techniques de microscopie de fluorescence existent, avec chacune ses spécificités. Nous présenterons ces spécificités pour éclairer le choix d’une technique pour notre étude.

2.1.2.1 Epifluorescence

La technique la plus simple de microscopie de fluorescence est l’épifluorescence. Elle consiste à exciter l’échantillon (cellule, milieu liquide...) en volume. Cette technique en champ large permet d’observer des échantillons dans leur épaisseur puisqu’il n’y a pas de sectionnement axial de la zone d’excitation. Mais du fait de l’absence de sélection axiale, on ne collecte pas seulement les photons de fluorescence émis par les fluorophores du plan d’observation, mais également ceux émis par l’ensemble du milieu qui résultent d’une fluorescence parasite. Il faut donc composer avec un fond de fluorescence important, ce qui dégrade le rapport signal/bruit (S/B).

Dans notre cas comme nous souhaitons observer le signal très faible de molécules uniques, cette technique n’est pas adaptée. Le signal d’intérêt serait noyé dans le bruit de fluorescence parasite. Cette technique est plus indiquée si l’on souhaite imager un objet biologique comme une cellule dans son épaisseur pour en étudier les structures.

2.1.2.2 Microscopie confocale

La microscopie confocale est une première technique pour réaliser une sélection spatiale qui permettra d’augmenter le rapport signal/bruit de la mesure.

Elle consiste à introduire sur le chemin du signal de fluorescence émis par l’échantillon un *trou de confocalité* (cf. figure 2.5) qui va sélectionner uniquement les rayons provenant du plan focal. Cette sélection spatiale permet d’améliorer nettement la qualité de l’image, en s’abstrayant du bruit de fluorescence émis hors du plan focal.

En revanche, la microscopie confocale n’est pas une technique plein champ. Pour imager une large zone, il faut scanner l’échantillon en le déplaçant dans le plan focal par rapport à l’objectif,

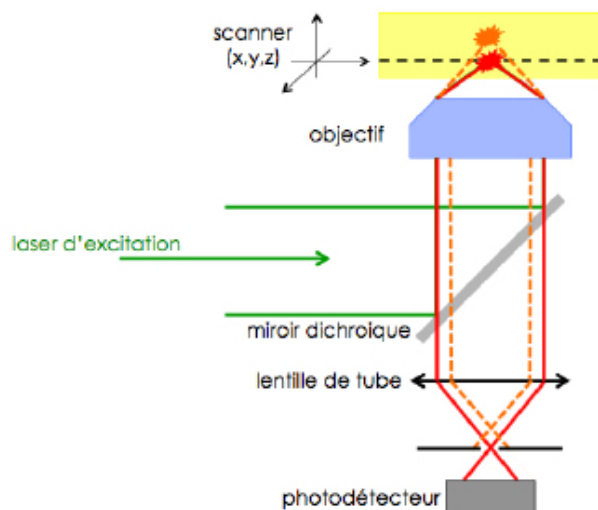


FIGURE 2.5 – Schéma explicatif d'un dispositif de microscopie confocale. On observe que le signal de fluorescence d'un émetteur au foyer de l'objectif sera détecté alors que celui d'un émetteur hors plan sera filtré par le trou de confocalité situé au foyer de la lentille de tube.

ce qui allonge le temps d'acquisition de l'image.

De plus, on perd l'observation avec une grande profondeur de champ propre à la microscopie d'épifluorescence. Il faut déplacer l'échantillon en z par rapport à l'objectif pour l'imager dans son épaisseur. Cette propriété est un avantage ou un inconvénient selon la nature des applications envisagées. Le fait de scanner l'échantillon dans son épaisseur permet notamment d'avoir une meilleure résolution en z .

Pour étudier en parallèle un grand nombre de systèmes biologiques et réaliser une étude statistique, nous souhaitons travailler en microscopie plein champ. Nous ne retenons donc pas la microscopie confocale pour nos expériences.

2.1.2.3 Microscopie TIRFM

Enfin une dernière possibilité est la microscopie de fluorescence par réflexion totale, illustrée sur la figure 2.6. Comme la microscopie confocale, elle consiste à réaliser une sélection spatiale sur un fin volume d'excitation à l'interface entre la lamelle de microscope et le milieu d'observation (d'une hauteur de quelques 100 nm). Ce volume d'excitation est assez important pour observer des systèmes nanométriques, comme dans notre cas, mais il est aussi suffisamment sélectif pour que le bruit de fluorescence soit limité, et que l'on puisse travailler avec un bon rapport signal/bruit.

Pour limiter l'excitation à ce volume on arrive en réflexion totale à l'interface verre/eau, ce qui crée une onde évanescence excitatrice confinée en surface. **Cette technique est un compromis idéal entre visualisation d'un champ large et maximisation du rapport S/B pour notre étude en molécule unique. C'est donc celle que nous avons choisi de développer et qui sera décrite dans le chapitre présent**

2.1. Bases de microscopie de fluorescence

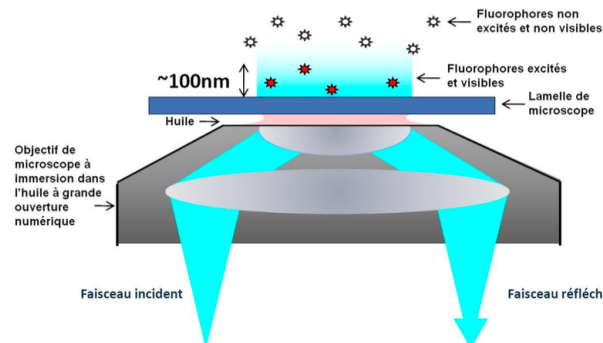


FIGURE 2.6 – Schéma illustrant le principe de la microscopie TIRFM.

2.1.3 Principe détaillé de la microscopie TIRFM

Pour créer une onde évanescente en surface, on doit remplir les conditions pour que le faisceau d'excitation incident soit réfléchi totalement à son arrivée sur l'échantillon. Cela est rendu possible dans notre cas par l'utilisation d'un objectif à grande ouverture numérique car à immersion dans l'huile¹. L'excitation des fluorophores et la collection des photons de fluorescence se fait par le même objectif. La condition de réflexion totale à l'interface entre le verre ($n_1 = 1,52$) et l'eau salée qui constitue le milieu d'observation ($n_2 = 1,34$) est donnée par la loi de *Snell-Descartes* pour la réfraction :

$$n_1 \times \sin(i_1) = n_2 \times \sin(i_2)$$

avec i_1 l'angle des rayons par rapport à la normale au dioptre dans le milieu d'indice n_1 et i_2 l'angle des rayons par rapport à la normale dans le milieu d'indice n_2 . Pour qu'il y ait réflexion totale, on peut donc définir un angle critique i_{1l} dans le milieu d'incidence qui répond à la condition :

$$\frac{n_1}{n_2} \sin(i_{1l}) = 1$$

Cette condition (illustrée sur la figure 2.7) nous donne pour l'interface considérée $i_1 > i_{1l} = 65,5^\circ$ pour avoir réflexion totale. Il faut un objectif dont l'angle limite d'ouverture est supérieur à la valeur de l'angle critique, d'où l'utilisation d'objectifs à grande ouverture numérique et donc à immersion dans l'huile.

Par exemple pour un objectif à $ON = 1.45$, l'angle limite vaut 73.2° ce qui est supérieur de 10° environ à l'angle critique. On a donc une gamme d'angles possibles importante pour être dans une situation de réflexion totale.

Lorsque l'on arrive en réflexion totale à l'interface, on crée en surface un champ évanescent incident confiné sur une distance nommée profondeur de pénétration d dont on peut donner l'expression suivante :

1. Il est également possible de créer une onde évanescente par l'utilisation d'un prisme de verre.

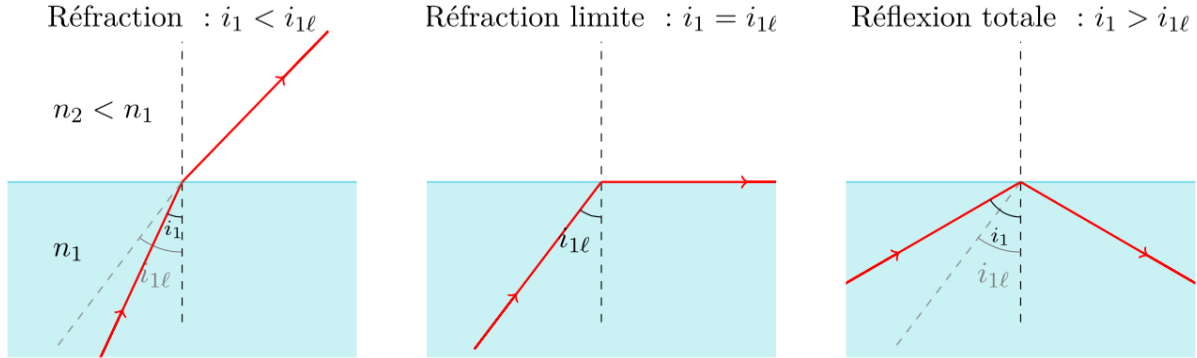


FIGURE 2.7 – Schéma illustrant la loi de Snell-Descartes pour la réflexion et la réfraction.

$$d = \frac{\lambda_{excitation}}{2\pi n_1} \frac{1}{\sqrt{\left(\frac{n_1}{n_2} \sin(i_1)\right)^2 - 1}}$$

L'huile d'immersion est choisie pour avoir un indice proche de celui du verre. On peut considérer que les rayons ne sont pas déviés à l'interface huile/verre et que $ON = n_1 \sin(i_1)$. Le confinement de l'onde évanescente dépend de l'angle d'incidence, donc de l'ouverture numérique de l'objectif. Nous détaillerons ultérieurement ce que la modification de l'ouverture numérique de l'objectif a pu apporter à notre étude.

Il est aussi intéressant de noter que d dépend de l'angle d'incidence i_1 . Sur la gamme d'angles supérieurs à l'angle critique on aura donc une variation de la profondeur de pénétration. Plus cette profondeur de pénétration est importante et plus des éléments fluorescents libres en solution contribueront au bruit collecté par l'objectif. On choisira l'angle d'incidence en prenant cette grandeur en considération pour maximiser le rapport signal/bruit.

Bien que variable, la profondeur de pénétration a pour ordre de grandeur la centaine de nm, cette onde est donc toujours largement confinée en surface de l'échantillon.

2.2 Description du dispositif de TIRFM

L'objectif de cette partie est de décrire le montage optique de TIRFM tel que je l'ai découvert à mon arrivée en thèse. Ce montage était alors déjà opérationnel et adapté à l'étude de la traduction eucaryote en molécule unique. Les sections suivantes présenteront les aspects thermiques et mécaniques du dispositif, ainsi que la description des échantillons.

2.2.1 Voie d'excitation

Le choix des sources d'illumination est directement lié aux contraintes imposées par le système rapporteur. Nous souhaitons exciter la fluorescence de fluorophores uniques à deux lon-

2.2. Description du dispositif de TIRFM

gueurs d'onde différentes : 640 nm et 532 nm. Nous avons à notre disposition des sources laser continues et polarisées linéairement² aux deux longueurs d'onde souhaitées. Le laser à 532 nm choisi, appelé laser vert par la suite est un LBX-532-50 d'Oxxius, celui à 640 nm est une diode laser continue LBX-638-100.

Le montage est décrit sur la figure 2.8. Les faisceaux ont initialement un diamètre de 1 à 2 mm. En sortie de chaque laser un filtre passe bande de largeur spectrale 10 nm typiquement vient filtrer des composantes à des longueurs d'onde parasites comme celle du faisceau pompe de la source laser. Pour pouvoir exciter l'ensemble de la zone observable (100 microns de côté), nous devons élargir les faisceaux d'excitation. Les lasers suivent initialement des chemins optiques différents et sont ensuite recombinaés par un miroir dichroïque $D1$ (cf.figure 2.8). Leur chemin optique est ensuite commun. Ils sont alors dirigés jusqu'à l'entrée d'un télescope (LINOS, x10) qui agrandit le diamètre des faisceaux d'excitation jusqu'à quelques cm. Les deux faisceaux agrandis et collimatés sont ensuite renvoyés par deux miroirs qui permettront de régler l'angle d'incidence sur la lentille $L1$. Celle-ci focalise les faisceaux dans le plan focal arrière de l'objectif. Entre cette lentille et l'objectif, un miroir dichroïque sépare les photons d'excitation de ceux qui seront émis par les fluorophores (photons d'émission). L'objectif utilisé est un objectif à grande ouverture numérique et à immersion dans l'huile ($ON = 1.45$, grandissement x60, Olympus). In fine l'onde évanescente créée en surface doit être optimisée pour obtenir un rapport S/B optimal et elle doit être autant que possible homogène sur toute la zone d'observation. Arriver à ce résultat nécessite que les faisceaux incidents sur la lentille $L1$ soient collimatés le mieux possible par l'élargisseur de faisceau. Le réglage fin de l'onde évanescente se fait ensuite en faisant varier légèrement l'angle d'incidence des faisceaux, jusqu'à l'obtention d'une image satisfaisante sur la caméra.

La voie d'excitation présente une potentielle piste d'amélioration pour rendre plus aisée l'optimisation de l'onde évanescente. Les voies du laser rouge et du laser vert étant combinées en amont sur le montage, on ne peut pas régler complètement indépendamment l'onde évanescente dans les deux couleurs. C'est une difficulté notamment parce que le télescope est légèrement chromatique. Le réglage optimal pour avoir en sortie un faisceau collimaté est différent dans les deux couleurs et cela nous oblige à rechercher un compromis acceptable entre ces deux réglages, et donc à sacrifier le réglage de l'onde évanescente dans une couleur.

2.2.2 Détection du signal de fluorescence

On crée en surface de l'échantillon une onde évanescente qui va venir exciter les marqueurs fluorescents présents dans le volume d'excitation. Ces marqueurs fluorescents vont émettre à leur tour, par un processus de fluorescence, des photons d'émission. La voie de détection est schématisée sur la figure 2.8.

Il y a là un autre avantage à utiliser un objectif à grande ouverture numérique. Plus l' ON sera grande, plus l'angle solide dans lequel les photons d'émission seront collectés sera grand et donc plus nous collectons de signal de fluorescence. En sortie de l'objectif, les photons d'émission sont

2. La polarisation est tournée pour que le faisceau incident sur l'échantillon soit en configuration transverse électrique afin de maximiser l'efficacité d'excitation [Dulin 2009].

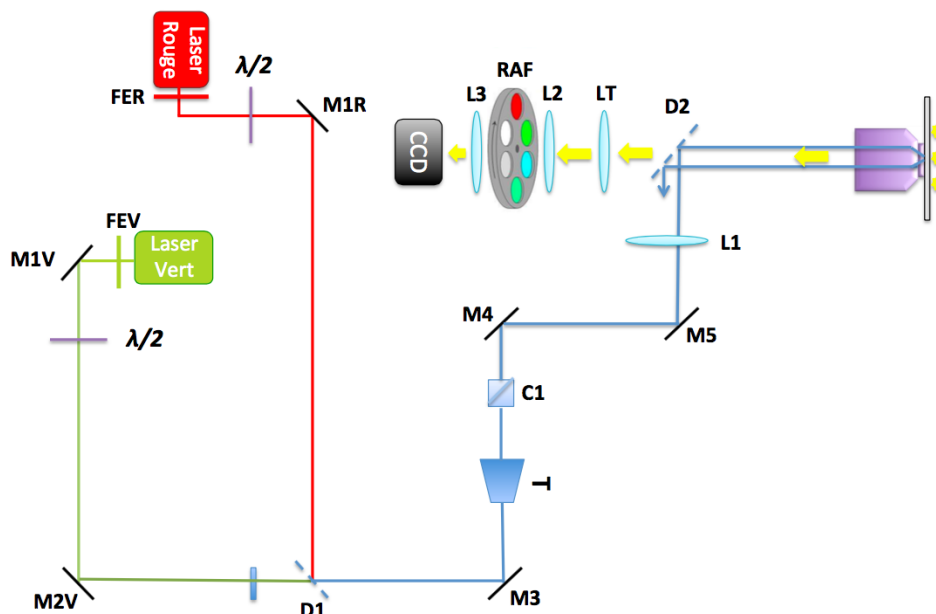


FIGURE 2.8 – Montage optique de notre dispositif de TIRFM tel qu'existant à mon arrivée en thèse. FE = filtre d'excitation (R = rouge, V=vert), M = miroir, D = miroir dichroïque, T = télescope, C = cube séparateur en polarisation, L = doublet, LT = lentille de tube, RAF = roue à filtres pour les filtres d'émission. Les focales des doublets L1, L2, L3 sont respectivement en mm 300, 100 et 100.

séparés des photons excitation également collectés par l'objectif grâce à un miroir dichroïque ($D2$, cf. figure 2.8) qui réfléchit le faisceau d'excitation et transmet le signal de fluorescence. Après le dichroïque, la lentille tube vient focaliser le faisceau d'émission dans le plan focal objet de la lentille $L2$. Les lentilles $L2$ et $L3$ constituent un télescope $\times 1$. Entre ces deux lentilles, le faisceau est collimaté et passe dans une roue à filtres. Celle-ci contient les filtres d'émission appropriés à chaque fluorophore destinés à filtrer le résidu des faisceaux d'excitation transmis par le dichroïque. En effet, même cette faible proportion du signal d'excitation est conséquente en comparaison du signal émis par des fluorophores uniques. Comme nous collectons successivement deux longueurs d'onde d'émission, la roue à filtres est commandée par ordinateur pour choisir l'un ou l'autre des filtres adaptés.

Enfin la lentille $L3$ focalise le faisceau sur une caméra EMCCD (Electron Multiplying Charge Couple Device, Ixon 897, Andor). Cette caméra très sensible est conçue pour collecter puis amplifier des signaux issus de molécules uniques. Elle doit donc être protégée de toute source de lumière parasite. L'ensemble de la partie détection est cloisonnée.

Tache de diffraction et dimension d'une molécule unique La caméra enregistre des images de 512×512 pixels qui correspondent à une zone d'observation totale de $100 \mu\text{m}$ de coté compte tenu du grandissement de l'objectif ($\times 60$).

La tache de diffraction correspondant à une molécule unique a pour diamètre :

$$D = \frac{1,22 \times \lambda}{ON}$$

2.3. Cellule microfluidique et positionnement de l'échantillon sur le microscope

avec λ la longueur d'onde centrale d'émission et ON l'ouverture numérique de l'objectif.

Pour un objectif à $ON = 1,45$ selon la longueur d'onde centrale d'émission, une molécule unique couvre environ 500 nm. Or comme un pixel correspond à une zone carrée de 267 nm de côté dans le plan d'observation, une molécule unique ne couvrira pas plus de 3 pixels $\times$ 3 pixels.

On s'arrange pour limiter le nombre de pixels correspondant à une molécule unique. Plus le signal de fluorescence est concentré spatialement sur un nombre de pixels limités, plus le signal délivré par ces pixels sera important et donc plus il sera aisé de distinguer le signal du bruit sur nos images.

2.3 Cellule microfluidique et positionnement de l'échantillon sur le microscope

2.3.1 Choix et description de la cellule microfluidique

2.3.1.1 Description de la cellule microfluidique

Notre objectif est d'étudier de suivre des processus dynamiques. Pour cela nous devons être en mesure d'injecter dans nos échantillons le milieu qui contiendra les systèmes biologiques mais nous devons aussi être en mesure de changer ce milieu à tout instant pour choisir les conditions d'étude de la dynamique du ribosome. De plus, au moment d'injecter l'extrait cellulaire qui initie le processus de traduction, il faut que ce changement de milieu soit quasi-instantané, pour ne pas introduire une incertitude sur la définition du temps t_0 initial.

Il nous faut donc un échantillon conçu pour un changement rapide du milieu qu'il contient. Nous avons fait le choix d'une cellule micro-fluidique faite maison imaginée pendant la thèse de David Dulin [Dulin 2009]. Cette cellule schématisée sur la figure B.3 est composée d'une partie réutilisable et d'une partie qui sera démontée et détruite après chaque expérience. En effet la chimie de surface sur la lamelle de verre où seront accrochés les ARNm nécessite d'utiliser à chaque fois une lamelle propre qui vient d'être passée au plasma d'oxygène. Il doit donc être possible de démonter et remonter la cellule microfluidique à chaque expérience.

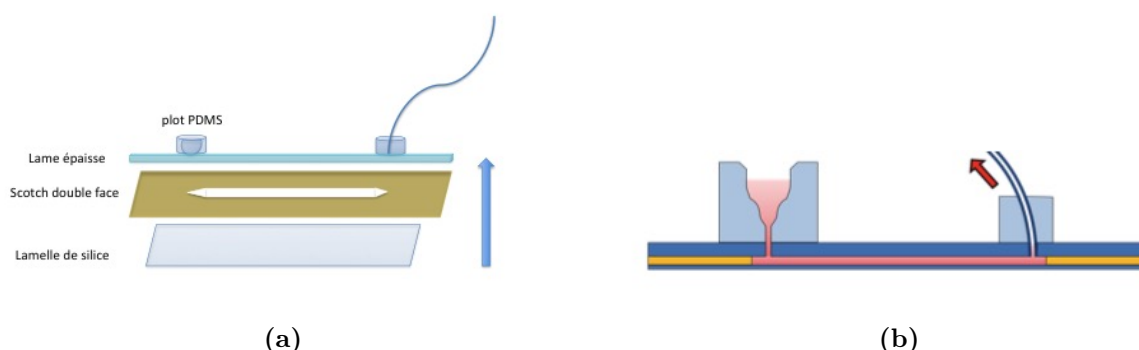


FIGURE 2.9 – Description d'une cellule microfluidique et de sa fabrication. (a) Montage d'une cellule microfluidique. (b) Injection dans la cellule microfluidique en aspirant le contenu du réservoir.

Chapitre 2. Microscopie de fluorescence en réflexion totale à l'échelle de la molécule unique

La partie réutilisable est constituée d'une lame de microscope en verre trouée en deux points³. Les trous ont un diamètre de 1 mm et sont espacés de 50 mm. Au niveau d'un des trous, on crée un réservoir en PDMS de volume interne 100 μ L typiquement. Dans le second trou un capillaire en PTFE de diamètre interne 0,3 mm et de diamètre externe 0,7 mm est inséré et on crée autour un second plot de PDMS pour le maintenir et assurer l'étanchéité. Au bout de ce capillaire long de 20 cm environ, on fixe un embout en plastique qui pourra être relié à une seringue.

Sur cette base on colle une couche de scotch double face qui vient jouer le rôle de joint étanche entre la lame et la lamelle de microscope qui a tout juste été soumise au plasma d'oxygène.

Avant d'apposer la lamelle, on découpe dans le scotch un canal entre le réservoir et le point d'entrée du tuyau en plastique dont les dimensions caractéristiques sont : largeur $\times$ Longueur $\times$ hauteur = 4 mm $\times$ 45 mm $\times$ 0,1 mm. Enfin on vient fermer notre cellule microfluidique en apposant la lamelle sur le scotch. On peut alors déposer du liquide dans le réservoir et l'aspirer dans le canal à l'aide d'une seringue adaptée, installée dans un tire-seringue (PHD 2000, Harvard Apparatus) automatique. La zone d'observation étant de 100 μ m $\times$ 100 μ m environ, on peut dans un même canal réaliser des acquisitions dans différentes zones. Après l'expérience, nous enlevons le scotch et la lamelle et nettoyons le reste du système avant une prochaine utilisation.

2.3.1.2 Contraintes techniques pour la conception de la cellule

Il est important de noter que la cellule microfluidique a été pensée à partir de deux exigences techniques imposées par notre dispositif expérimental :

- La partie réutilisable de la cellule est nettoyée après chaque expérience avec des solvants tels que l'acétone et l'acide chlorhydrique concentré. Les matériaux qui la composent doivent donc être résistants, en particulier à ces étapes de nettoyage nécessaires pour éliminer toute trace de RNase (enzymes qui détruisent les ARN messagers constitutifs du système rapporteur).
- Le dessous de la cellule qui sera en contact avec l'objectif de microscope doit être une lamelle de verre d'épaisseur 170 μ m compatible avec l'objectif à ON=1,45 pour transmettre le faisceau incident et le signal de fluorescence.

2.3.1.3 Calcul du nombre de Reynolds : écoulement laminaire dans le canal

Nous définissons la valeur du flux imposé par le tire-seringue d'abord en prenant en considération que l'on veut un changement de milieu quasi-instantané. Empiriquement, nous avons observé qu'un flux de 2 ml/min répondait à ce critère. Nous cherchons à estimer si pour ce flux, l'écoulement du liquide dans le canal est bien un écoulement laminaire. En effet si ce n'est pas le cas, la turbulence du flux peut déstabiliser les systèmes rapporteurs accrochés en surface et provoquer temporairement un mélange du milieu injecté.

Pour estimer si un écoulement est bien laminaire il nous faut calculer le nombre de Reynolds donné par l'expression ci-dessous :

$$Re = \frac{V_f \times L_c}{\nu}$$

- V_f la vitesse du fluide considéré (m/s)

3. Perçage réalisé à l'atelier d'optique du LCF par Christian Beurthe et Sophie Coumar.

2.3. Cellule microfluidique et positionnement de l'échantillon sur le microscope

- L_c la longueur caractéristique du système. Dans notre cas la longueur caractéristique est la hauteur du canal $L_c = 0,1\text{mm}$
- ν la viscosité cinématique du fluide (m^2/s)

Pour être certain que l'on se situe dans un régime laminaire, le nombre de Reynolds calculé doit être inférieur à 1. Le flux imposé par le tire seringue est fixé à 2ml/min, mais cet appareil est conçu pour une gamme de débit allant de 1 microlitre/min à 5ml/min. Le calcul du nombre de Reynolds cette gamme de débit donne :

$$10^{-3} < Re < 7$$

On constate que l'on se situe pour le flux choisi dans un régime limite voir légèrement turbulent puisque pour un flux de 2ml/min, $Re \simeq 1$. Seulement, nous préférons favoriser un remplacement rapide du milieu que de diminuer la valeur du flux pour se situer dans un régime laminaire. Nous acceptons en conséquence l'existence au moment de l'injection d'une légère déstabilisation de nos systèmes due à la turbulence.

L'impact de la turbulence a été évalué pendant nos prises d'acquisition en injectant dans le canal un milieu identique chimiquement à celui présent initialement. Nous n'avons constaté aucun phénomène de déstabilisation notable de nos systèmes rapporteurs (en particulier les sondes fluorescentes), l'injection était indétectable du point de vue de nos mesures. Si des effets existent, ils sont donc mineurs et négligeables à l'échelle de notre expérience.

2.3.2 Chimie de surface : accroche des systèmes biologiques

Pour observer nos échantillon en TIRFM, il faut nous assurer que ceux-ci sont présents dans le volume d'excitation confiné sur les 100 premiers nanomètres à la surface de la lamelle. On doit accrocher ces systèmes en surface de la lamelle pour éviter qu'ils ne diffusent librement hors de l'onde évanescence. Pour cela un protocole de chimie de surface a été développé et optimisé par l'équipe molécule unique. Une chimie de surface fonctionnelle est essentielle dans la réalisation de nos expériences. Elle doit répondre à deux caractéristiques :

- passiver la surface pour empêcher l'accroche d'impuretés fluorescentes qui dégraderaient le rapport signal/bruit,
- assurer une accroche fiable et spécifique de nos systèmes biologiques.

Nous discuterons d'abord les étapes de passivation puis nous décrirons les étapes d'accroche spécifique des systèmes rapporteurs⁴.

Avant tout traitement et avant même d'assembler la cellule microfluidique, les lamelles sur lesquelles on souhaite réaliser la chimie de surface ont été nettoyées suivant un protocole décrit dans l'annexe 1. Après avoir séché, elles sont soumises à un plasma d'oxygène (de 0,6 mbar) pendant 10 min. Le plasma d'oxygène détruit les impuretés fluorescentes résiduelles du premier lavage et active les fonctions hydroxyles de la silice (SiO_2) en surface. La cellule microfluidique est immédiatement montée et on peut commencer la première étape de passivation.

4. Les détails précis de la mise en œuvre du protocole de chimie de surface décrit ci-dessous (concentrations des produits, temps d'incubation et constitution des tampons) sont donnés en annexe 1.

Chapitre 2. Microscopie de fluorescence en réflexion totale à l'échelle de la molécule unique

Pour passiver, on choisit d'utiliser le polyéthylène-glycol triéthoxysilane (PEG-Silane, 5 kDa, Laysan Bio, conditionné en poudre). La passivation est assurée car la fonction silane (voir figure 2.10) du PEG réagit avec les fonctions hydroxyles activées de la silice pour former une liaison covalente, donc très stable. Le PEG va ainsi former une couche homogène et électriquement neutre sur la surface, ce qui empêchera d'éventuelles molécules de venir s'y accrocher aspécifiquement.

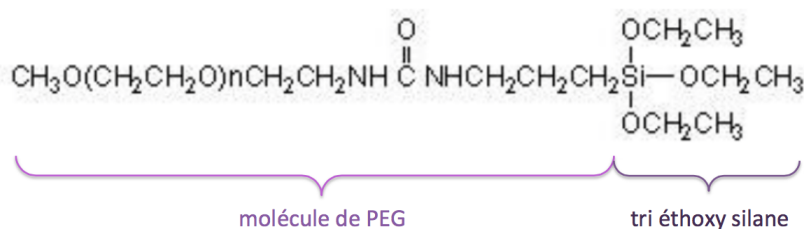


FIGURE 2.10 – Formule chimique semi-développée d'une molécule de PEG-Silane.

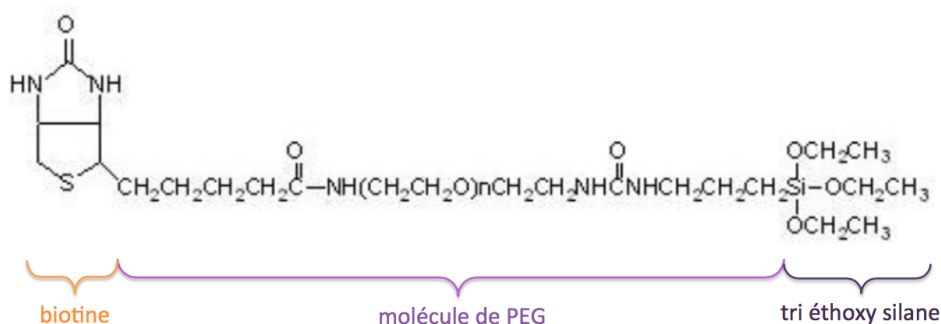


FIGURE 2.11 – Formule chimique semi-développée d'une molécule de PEG-Silane biotinylé.

Il faut créer dans le même temps des sites qui permettront l'accroche spécifique des systèmes rapporteurs. Ces sites d'accroche sont matérialisés par le couple biotine/neutravidine, deux molécules chimiques qui ont une très grande affinité et qui forment donc un complexe très stable. Nos systèmes seront accrochés spécifiquement aux molécules de neutravidine. Pour introduire des sites possédant des biotines, on mélange dans un tampon d'acide borique (pH=8,8 ; 100 mM en acide borique) du PEG-Silane sous forme de poudre et une solution de Biot-PEG-Silane (molécules de PEG-Silane qui portent une biotine à l'autre extrémité, diluées dans du méthanol) dont la formule semi-développée est donnée sur la figure 2.11. Les proportions de ce mélange et la constitution du tampon d'acide borique ont été optimisées pour assurer une passivation efficace et un nombre de sites d'accroche suffisant en surface.

Ce mélange va incuber dans la cellule microfluidique avant rinçage du canal avec un tampon TRIS. On injecte alors une solution de BSA (Bovin Serum Albumin, sous forme de cristaux initialement) diluée dans du TRIS. La BSA va combler les éventuelles aspérités dans la couche de PEG, terminant de passiver parfaitement l'ensemble de la surface.

2.3. Cellule microfluidique et positionnement de l'échantillon sur le microscope

On a alors une couche de passivation et des sites biotinylés dispersés à sa surface. On termine la chimie de surface en injectant une solution de neutravidine dans la cellule microfluidique. La neutravidine vient se fixer rapidement et de façon stable aux biotines déjà présentes. La surface est maintenant prête à recevoir les systèmes biologiques. L'ensemble du procédé est décrit sur la figure 2.12.

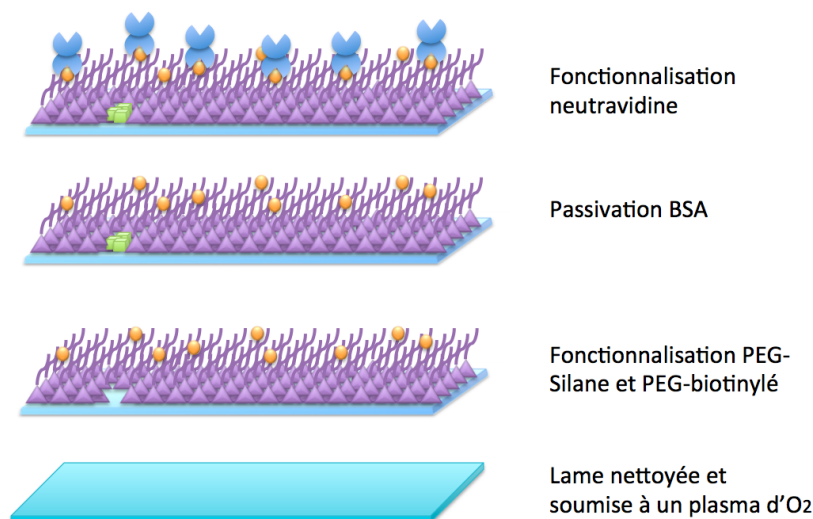


FIGURE 2.12 – Schéma descriptif des différentes étapes de chimie de surface (du bas vers le haut).

2.3.3 Positionnement de l'échantillon sur le microscope et contrôle en température

Une fois préparé, notre échantillon est positionné sur un porte échantillon lui-même fixé sur une platine de micro- et nano-positionnement. Celle-ci possède deux vis micrométriques pour déplacer manuellement l'échantillon au micron près par rapport à l'objectif de microscope de manière à changer la zone d'observation. C'est aussi une platine piezoélectrique de nano-positionnement 3 axes. On l'utilise pour effectuer un nano-positionnement axial de l'échantillon en temps réel.

L'extrait cellulaire injecté pour initier la traduction est optimisé pour être efficace à 30 ° C. Nous devons donc chauffer l'échantillon de manière homogène pour atteindre cette température. Deux systèmes sont mis en place à cet effet :

- un module Peltier intégré au porte échantillon,
- une bague chauffante placée sur l'objectif pour chauffer l'échantillon par le bas.

Le système de chauffage de l'échantillon est constitué d'une plaque de cuivre en contact avec l'échantillon, d'un petit radiateur pour faciliter le transfert thermique (en noir sur la figure 2.13) et d'un module Peltier qui chauffe la plaque de cuivre. Ce module Peltier est régulé en température par une boucle de rétroaction (PID) dont on modifie manuellement les réglages.

La zone de contact du cuivre avec l'échantillon a été conçue pour ne pas gêner les mouvements axiaux et latéraux de l'objectif, préserver une zone d'observation sur tout le canal et assurer un

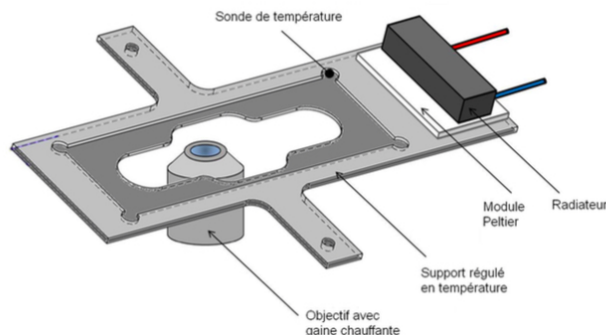


FIGURE 2.13 – Schéma descriptif du porte échantillon réglable en température et du chauffage de l'objectif.

contact thermique suffisant pour chauffer l'ensemble de l'échantillon. L'objectif est en contact avec la zone d'observation et il est lui-même vissé sur le microscope. L'objectif et le microscope étant en métal, ce sont de très bons conducteurs thermiques et ils constituent une sorte de puits thermique vis à vis de l'échantillon. C'est pourquoi il est nécessaire de chauffer aussi l'objectif de microscope pour maintenir la température souhaitée.

La combinaison de ces deux systèmes nous assure une bonne stabilité thermique (une fois que l'échantillon est thermalisé). L'échantillon est maintenu à une température de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durant toute l'expérience.

Le système de chauffage présenté maintient efficacement les échantillons à la température souhaitée mais présente des défauts lors de la thermalisation. En effet celle-ci peut prendre plusieurs dizaines de minutes. Le module étant directement en contact avec la platine de nanopositionnement métallique, il est parfois laborieux de thermaliser efficacement l'échantillon. Un dispositif amélioré en prenant en compte les limitations de ce système sera présenté au chapitre 3.

2.4 Acquisition du signal et rétroaction sur la mise au point

2.4.1 Acquisition du signal à l'aide d'un séquenceur

2.4.1.1 Rôle du séquenceur

Une des contraintes majeures de la prise d'acquisition est le photoblanchiment des fluorophores qui, parce que nous observons la disparition d'un signal de fluorescence, constitue une source de bruit importante dans nos mesures. Pour minimiser le photoblanchiment, nous n'éclairons pas les fluorophores en continu, mais nous réalisons des séquences d'images entre lesquelles l'échantillon n'est pas éclairé. L'acquisition du signal de fluorescence est ainsi orchestrée par un module appelé séquenceur conçu par André Villing, ingénieur de recherche en électronique au laboratoire. Le séquenceur pilote de façon synchronisée les lasers d'excitation et les différents éléments de la voie de détection, comme visible sur la figure 2.14.

Il agit directement sur la diode laser rouge par une commande analogique. On fait varier son

2.4. Acquisition du signal et rétroaction sur la mise au point

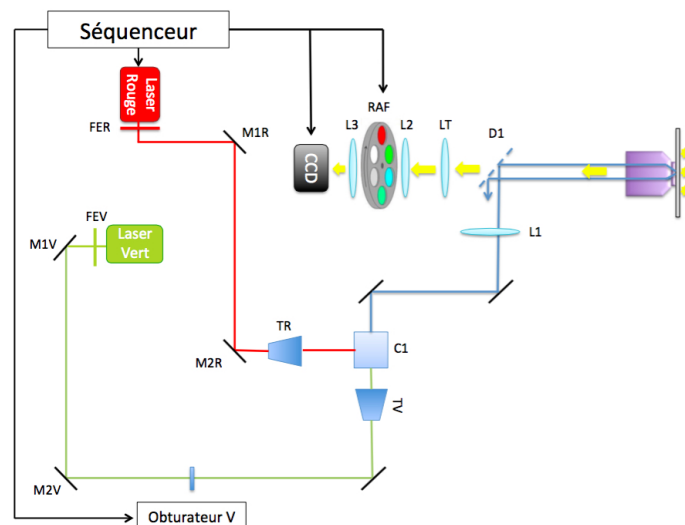


FIGURE 2.14 – Schéma d'action du séquenceur sur les éléments du montage expérimental.

intensité lumineuse en temps réel. Le laser vert qui est un laser solide ne peut pas être piloté par le séquenceur. Il est allumé en continu pendant les expériences et c'est un obturbateur piloté par une commande numérique du séquenceur qui laisse passer le faisceau vert ou bien l'arrête. Sur la voie de détection, la caméra et la roue à filtres sont pilotées par le séquenceur. La roue à filtres reçoit l'ordre de tourner lorsque l'on veut observer dans l'une ou l'autre des longueurs d'onde émises par nos fluorophores. La caméra n'est quand à elle déclenchée qu'aux moments où l'on souhaite enregistrer une image.

2.4.1.2 Séquence temporelle d'acquisition

La séquence temporelle d'acquisition (cf. figure 2.15) correspond à une acquisition dans le rouge suivie d'une acquisition dans le vert. Cette sous-séquence se répète N fois, avec entre chaque paire d'images acquises un temps de pause. Le choix de ce temps de pause répond à un compromis entre minimiser le photoblanchiment et garder une résolution temporelle suffisante pour suivre la cinétique du ribosome.

La séquence commence quand l'extrait cellulaire qui initie la traduction est injecté dans le canal. On va alors faire l'acquisition d'une image dans le rouge pendant 100 ms puis d'une image dans le vert pendant 100 ms. La caméra et les lasers d'excitation sont synchronisés pour l'acquisition de ces images. Entre ces deux images la roue à filtres tourne pour adapter le filtre de détection à la source d'excitation. Il faut au minimum 600 ms de délai pour cette étape. Enfin après ces deux images, on stoppe l'acquisition pendant le temps de pause défini.

Ensuite cette séquence temporelle se répète en boucle le nombre de fois voulu. Nous réalisons généralement des films de 100 images dans chaque couleur ce qui correspond à un temps total d'observation de quelques minutes, variable selon le temps de pause.

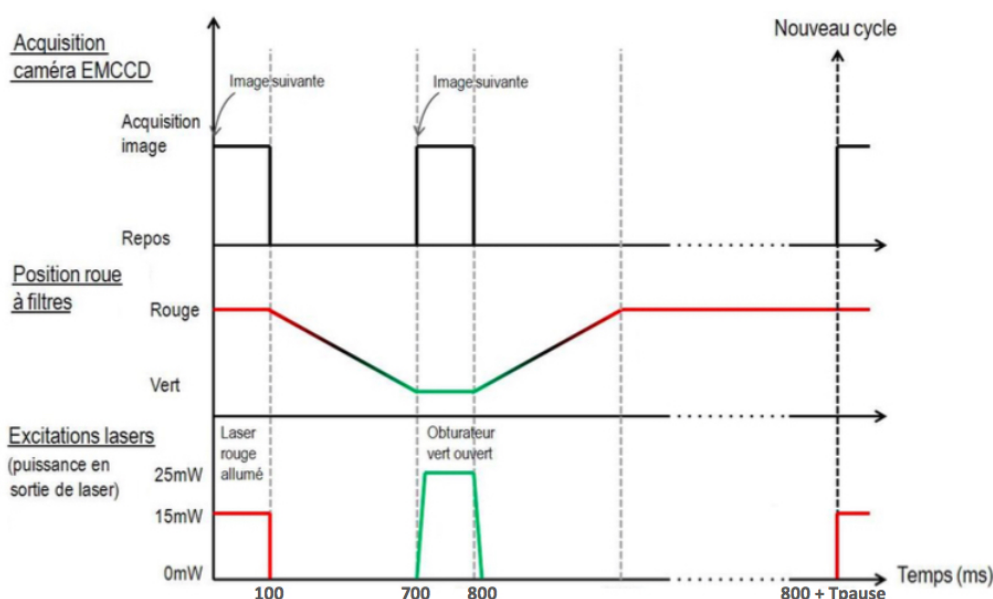


FIGURE 2.15 — Séquence temporelle d'acquisition des images TIRFM (extrait de [Fizman 2013])

2.4.2 Développement d'un système de maintien de la mise au point

Pendant l'acquisition de la séquence temporelle, plusieurs éléments nous obligent à mettre en place une rétroaction sur la mise au point dans chaque couleur. En effet la profondeur de champ de l'objectif n'est que de quelques centaines de nm. Il suffit donc de très peu de chose pour qu'il y ait variation de cette mise au point. Le passage d'une couleur à l'autre entraîne un léger défocus dû au chromatisme résiduel de l'objectif. De plus, il y a toujours un petit décalage entre le début du film d'acquisition et l'arrivée de l'extrait cellulaire. Pendant l'injection, la dépression créée par l'aspiration du liquide entraîne une légère variation de l'épaisseur du canal et de fait une petite variation de la mise au point. Nous devons donc veiller à maintenir la mise au point lors de cette phase d'injection. Il en va de même si la température varie un peu dans le canal.

Nous avons développé un système de maintien de la mise au point pendant toute la séquence d'acquisition basé sur une boucle de rétroaction. Pour cela on prélève une partie du faisceau vert avant son élargissement grâce à l'action couplée d'un polariseur et d'un cube séparateur en polarisation. On prélève dans ce faisceau sonde seulement une faible proportion (environ $1/10^{\text{ème}}$) de la puissance du faisceau d'excitation. Réfléchi par trois miroirs successifs sur un trajet indépendant des faisceaux principaux, le faisceau sonde est envoyé dans l'objectif avec un angle supérieur à l'angle critique, comme on peut le voir sur la figure 2.16. Il est totalement réfléchi et suit un trajet de retour symétrique. On intercepte le faisceau sur son trajet retour

2.4. Acquisition du signal et rétroaction sur la mise au point

avec un miroir d'or pour l'envoyer sur un détecteur 4 quadrants⁵ (QPD).

Le décalage entre l'aller et le retour du faisceau dépend de la distance entre l'objectif et la lamelle (cf. figure 2.16). Ici on fait en sorte que ce décalage se traduise par un décalage du faisceau mesurable sur la QPD. Un programme Labview permet de synchroniser la lecture de l'intensité de chaque quadrant et de calculer en temps réel la position du spot sur le capteur.

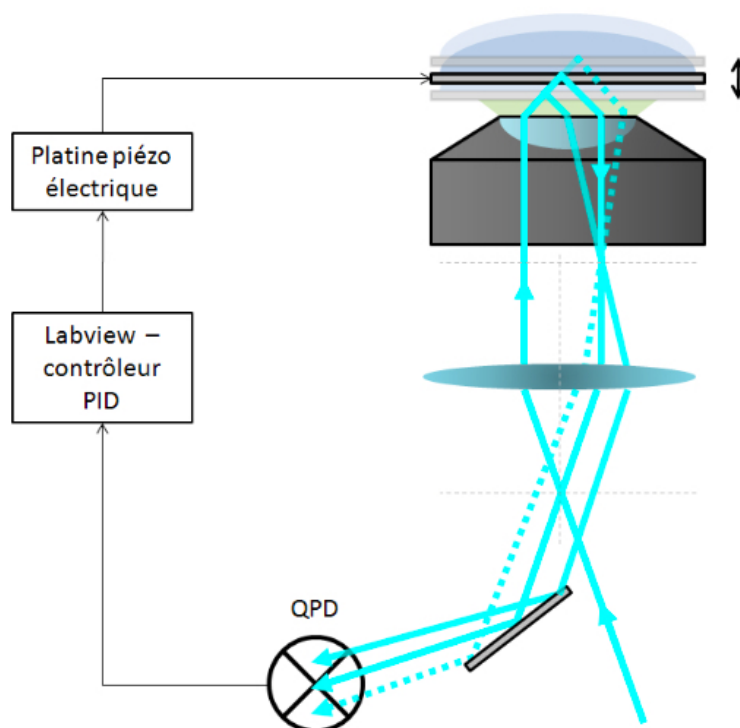


FIGURE 2.16 – Trajet du faisceau sonde réfléchi sur l'échantillon et boucle de rétroaction sur la mise au point appelé PID. (Extrait de [Fizman 2013])

Ainsi, si la mise au point varie, le faisceau sonde retour se décale sur le capteur et nous pouvons mesurer ce décalage par rapport à une référence définie préalablement. On met en place, dans le même programme Labview, une boucle de rétroaction (PID). Pour rétroagir sur la position de l'échantillon, on utilise le mouvement axial de la platine de nano-positionnement. On génère une rampe de tension de 3 V sur la platine qui va balayer en réponse une distance de 3 μm en z. On enregistre pour chaque valeur de la position de la platine, la valeur de la position du faisceau sonde correspondante sur la QPD. La relation entre ces deux grandeurs doit être linéaire pour un bon fonctionnement de la rétroaction. On définit ensuite une valeur de consigne de la position du spot dans chaque couleur. Une fois la boucle de rétraction enclenchée, à chaque fois que la valeur mesurée sur le capteur diffère de la consigne, un ordre est donné à la platine de nano-positionnement pour ajuster la position de l'échantillon afin de maintenir la mise au point.

5. L'électronique de ce capteur a été réalisée par Frédéric Moron, du service électronique du LCF.

La gamme dynamique de tension réellement exploitable avec le système décrit équipé d'un capteur QPD est en réalité de 2 V. Hors de cette gamme la réponse du capteur n'est plus linéaire en fonction de la tension en entrée. On souhaite par la suite augmenter la gamme de tension exploitable pour augmenter la stabilité de notre système de maintien du focus.

2.5 Traitement des données TIRFM et extraction de la cinétique de départ des jalons fluorescents

Une fois l'acquisition des données effectuée, nous devons extraire l'information cinétique de nos films de 200 images racontant chacun l'histoire de plusieurs centaines de ribosomes. Un programme IGOR Pro a été développé en interne par Nicolas Fiszman durant sa thèse. Il m'a fallu comprendre et m'approprier les différentes étapes de ce traitement pour interpréter les données cinétiques obtenues et assurer au quotidien le traitement des données de nos expériences.

2.5.1 Objectifs du traitement des données : soustraire le fond de fluorescence pour détecter des molécules uniques

La forme du signal délivré par la caméra nous indique les traitements qui seront nécessaires pour extraire l'information cinétique qui nous intéresse. Nous avons acquis des films alternés dans le rouge et dans le vert. Ce film raconte l'évolution de notre système biologique sur un temps T qui peut varier entre quelques minutes et une dizaine de minutes selon les expériences. Cette échelle de temps est amplement suffisante pour ne rien manquer du phénomène biologique en jeu : la traduction.

2.5. Traitement des données TIRFM et extraction de la cinétique de départ des jalons fluorescents

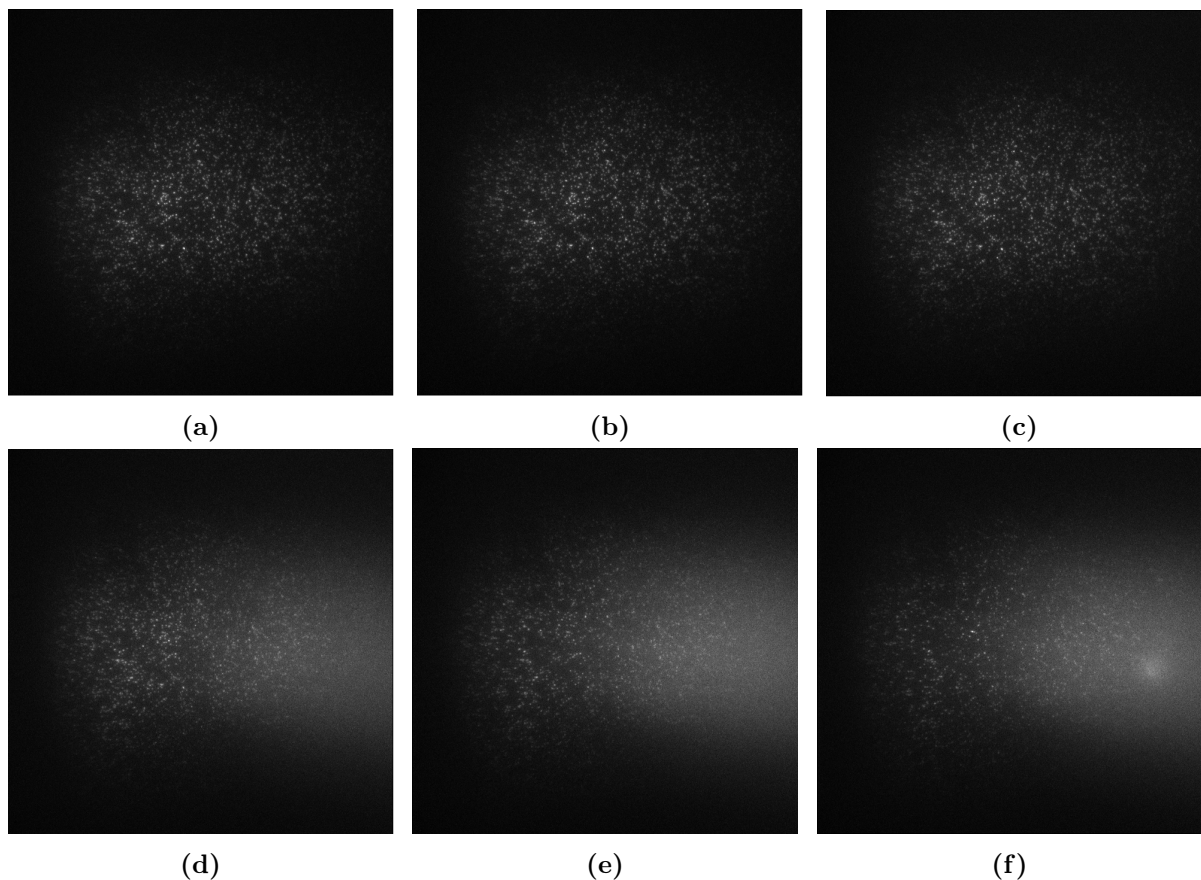


FIGURE 2.17 – Images TIRFM dans le rouge issues de différents moments d’un film d’acquisition type. (a) Image n° 1. (b) Image n° 3. (c) Image n° 5, juste avant l’arrivée du RRL sur la zone d’observation. (d) Image n° 6. Arrivée du RRL sur la zone d’acquisition. (e) Image n° 100. Image acquise à la moitié du temps total d’acquisition. (f) Image n° 200. Dernière image du film

Seulement, comment à partir de ces films peut-on remonter à une cinétique ? Si l’on considère les images d’un film typique présentées dans la figure 2.17 on constate que nous sommes confrontés à deux difficultés : on doit

- composer avec un fond de fluorescence parasite variable spatialement (le bruit n’est pas homogène sur l’ensemble de l’image) et temporellement (fluorescence parasite du RRL arrivant en cours de film, par exemple),
- détecter sur l’image les molécules uniques et déterminer l’instant de départ de chacune d’elles.

2.5.2 Traitement du fond de fluorescence

2.5.2.1 Nature et composantes du fond de fluorescence

Le fond de fluorescence parasite sur une image peut-être divisé en 2 composantes : 1) une composante lentement variable spatialement qui correspond à la moyenne du fond en chaque

point. 2) Une composante qui varie rapidement selon la position spatiale. Cette composante appelée bruit correspond à l'écart-type du fond.

$$Fond = \langle Fond \rangle + \sigma_B$$

σ_B ne correspond pas seulement au bruit de fluorescence parasite. Il existe d'autres sources de bruit comme le bruit d'amplification et le bruit de lecture propre à la caméra CCD. Mais on considère dans notre cas que ces autres sources de bruit sont négligeables devant le bruit de fluorescence parasite : $\sigma_B \sim \sigma_B f$. Le bruit de fluorescence est proportionnel à la racine-carrée du flux local d'excitation ($\sigma_{Bf} \propto \sqrt{N}$). Donc si l'on est dans une zone où le signal de fluorescence est plus élevé, le bruit de fluorescence le sera aussi.

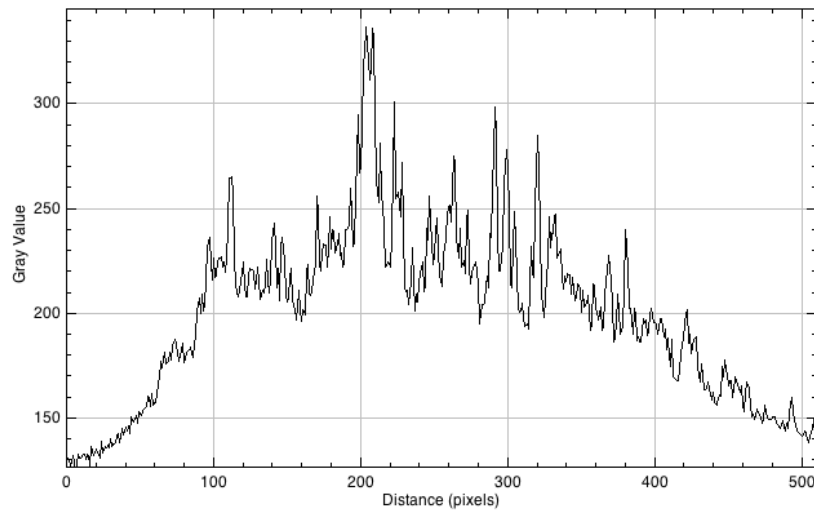


FIGURE 2.18 – Profil spatial du flux local des pixels issus d'une section horizontale sélectionnée au centre de l'image 2.17a

La figure 2.18 permet d'identifier facilement la composante lentement variable du fond (l'enveloppe du profil spatial). Il est en revanche plus difficile de visualiser les variations rapides qui participent aussi des pics de signal.

A ce fond de fluorescence présent sur toutes les images s'ajoute pour nombre d'entre elles le fond de fluorescence propre au RRL visible sur la figure 2.17d.

2.5.2.2 Soustraction du fond par Rolling Ball

Pour soustraire à nos images la partie lentement variable du fond de fluorescence on utilise une technique de traitement d'image appelée Rolling Ball.

Mais avant tout traitement, il nous faut réaliser des opérations préliminaires sur le logiciel Fiji. On sépare dans un premier temps les images acquises dans le rouge de celles acquises dans le vert. A partir du film initial, on récupère deux films, un pour chaque couleur.

On effectue ensuite une soustraction du fond par Rolling Ball. Le Rolling Ball est une opération mathématique sur une image, utilisée pour soustraire le fond de l'image sans dégrader le

2.5. Traitement des données TIRFM et extraction de la cinétique de départ des jalons fluorescents

signal d'intérêt. Le principe est de considérer l'image comme une surface sous laquelle on fait parcourir une sphère de rayon donné. Cette sphère est choisie pour être suffisamment large pour couvrir, lors de son déplacement, la forme générale de la surface dont les variations spatiales sont lentes sans pouvoir entrer dans les pics du signal. La surface couverte par la sphère est alors considérée comme le fond de fluorescence et sera soustraite à l'image.

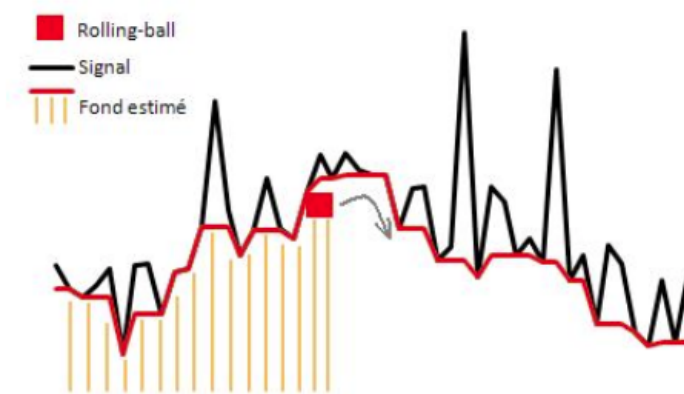


FIGURE 2.19 – Schéma explicatif de la méthode du Rolling Ball en 1D

L'avantage de cette méthode est d'être utilisable même si l'on ne connaît pas a priori la forme du fond de fluorescence. Nous utilisons après différents tests une sphère d'un rayon de 20 pixels. En effet, les pics de signal correspondant à nos molécules uniques ne font pas plus de quelques pixels². Choisir une sphère avec un diamètre de 20 pixels nous assure de ne pas dégrader le signal de nos molécules.

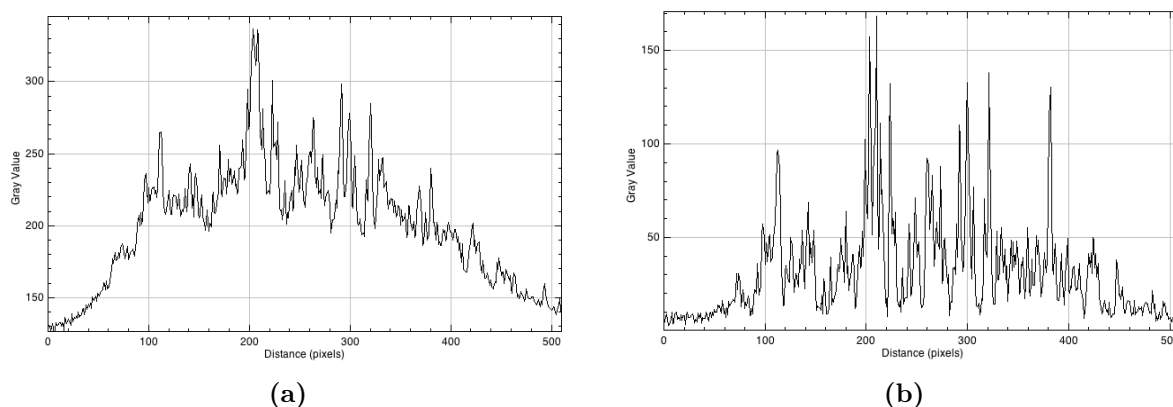


FIGURE 2.20 – Effet de l'opération de Rolling Ball sur le profil spatial du fond de fluorescence. (a) Profil spatial de l'intensité sur l'image 2.17a avant Rolling Ball. (b) Profil spatial d'intensité sur l'image 2.17a après Rolling Ball

Le résultat de cette opération est présenté dans la figure 2.20. On constate que le Rolling Ball a bien permis de soustraire la composante lentement variable du fond de fluorescence. Il est en particulier efficace pour minimiser le fond de fluorescence du RRL. En revanche le bruit de

fluorescence (fluctuations du fond) ne peut-être soustrait par cette méthode. Nous résoudrons cette question lors du traitement par le logiciel IGOR Pro présenté plus loin.

Après le traitement par Rolling Ball on termine la prise en charge des films sur Fiji en corrigeant les films d'une translation systématique de 1 pixel observée empiriquement entre les images dans le rouge et les images dans le vert. Cette translation peut-être due à différents biais expérimentaux, optiques ou simplement liés à l'échantillon. Nous n'en cherchons pas la cause car cette dérive étant systématique, elle est aisément corrigible. Les deux films sont prêts à être traités et analysés avec le logiciel IGORPro pour la suite des opérations.

2.5.2.3 Soustraction du bruit de fluorescence des images

Après l'opération de Rolling ball il ne reste que les fluctuations du fond (bruit de fluorescence) et le signal des fluorophores. Sur la figure 2.20b on voit bien que le signal et les fluctuations du fond sont plus basses sur les bords de l'image qu'au centre. Cela est dû au fait que l'excitation n'est pas homogène sur l'ensemble de l'image, elle est plus forte au centre. On doit renormaliser l'image pour corriger cet effet.

Pour ce faire, on calcule la moyenne locale de l'intensité $I(x, y) : \langle I(x, y) \rangle_{loc}$ (on moyenne les pixels avec leur voisinage, en considérant un voisinage de 50 pixels). Ce procédé dessine une carte qui rend bien compte de l'intensité d'excitation laser sur l'ensemble de l'image et de ses inhomogénéités. Le bruit de fluorescence étant proportionnel à la racine carrée du flux local d'excitation, on considère que : $\sigma_{Bf} \propto \sqrt{\langle I(x, y) \rangle_{loc}}$. Nous pouvons donc déterminer pour l'ensemble des pixels la valeur des fluctuations du fond résiduel et renormaliser l'image par cette grandeur pour rendre ces fluctuations homogènes spatialement en calculant :

$$\frac{I(x, y)}{\sqrt{\langle I(x, y) \rangle_{loc}}}$$

Il est important de noter que par cette opération le signal de fluorescence est lui-même renormalisé. Les pics de signal correspondants aux particules centrales (qui sont plus éclairées que celles en périphérie et donc plus brillantes) sont renormalisés au même titre que le bruit de fluorescence.

Le fond résiduel est très faible et ses fluctuations sont renormalisées sur l'ensemble de l'image. Nous pouvons désormais, par une opération de seuillage, séparer le signal du bruit de fluorescence pour détecter nos fluorophores uniques.

2.5.3 Extraction de la cinétique de départ des marqueurs

2.5.3.1 Détection des particules et opération de seuillage

Opération de seuillage Pour extraire la cinétique associée à chaque couple ribosome-ARNm représenté sur nos images par une molécule unique il nous faut déjà détecter et identifier les positions de ces molécules uniques. Pour cela on réalise une opération de seuillage. On définit un seuil d'intensité au dessus duquel tout pixel sera considéré comme appartenant à une molécule unique. Le seuil est défini manuellement par l'utilisateur. Il n'est pas évident de choisir un seuil. Il faut qu'il soit suffisamment élevé pour éviter qu'il y ait trop de faux positifs mais suffisamment bas pour repérer la majorité des fluorophores sur l'image. Dans la pratique c'est

2.5. Traitement des données TIRFM et extraction de la cinétique de départ des jalons fluorescents

une grandeur qu'il nous faut souvent ajuster en fonction des conditions optiques et de l'évolution de l'expérience.

Un des problèmes auquel nous avons été confrontés, en particulier lorsque le rapport signal/bruit n'était pas satisfaisant, était la présence de pixels uniques pratiquement aussi intenses que les points correspondant à des molécules uniques, mais dus à un fond de fluorescence résiduel. L'augmentation du seuil n'était pas adaptée pour éliminer ces faux positifs car on élimine dans le même temps des particules que l'on souhaite détecter. Le seul critère du seuil n'est donc pas suffisant pour détecter sélectivement nos molécules uniques. Nous devons y ajouter des critères de taille.

Critères de taille des fluorophores Après le seuillage, une fonction de détection des particules est appliquée pour dénombrer et localiser les fluorophores. C'est dans cette fonction que l'on impose des critères de sélection des molécules uniques par leur taille.

Une molécule unique avec les paramètres de détection de l'expérience ne couvre pas plus de 9 pixels². On impose donc le critère suivant pour décider si une particule peut-être considérée comme une molécule unique :

$$1\text{pixel} < \text{côté} < 3\text{pixels}$$

Le choix de ce critère permet d'éviter un grand nombre de faux positifs. Le processus de seuillage et de détection est appliqué aux deux premières images du film. Pour qu'une molécule unique soit considérée par la suite, on impose qu'elle soit présente sur ces deux premières images. Nos molécules uniques sont maintenant localisées, on va pour chacune d'elle extraire sa trace temporelle, c'est à dire son intensité de fluorescence en fonction du temps.

2.5.3.2 Obtention des traces temporelles des particules détectées

Classification des particules selon leur comportement temporel On extrait la trace temporelle de chaque molécule unique pour isoler l'instant de départ individuel d'un fluorophore lorsqu'il est détaché par le ribosome. La trace temporelle correspond (pour un fluorophore considéré comme immobile au cours du temps) à l'évolution temporelle de l'intensité à la position de chaque fluorophore. La variation de cette intensité nous permettra de décider si le fluorophore est dans un état allumé/présent ou bien absent/éteint.

Le problème qui se pose est que les traces temporelles à notre disposition ne sont pas toujours compatibles avec la définition d'une molécule unique. La trace temporelle canonique d'une molécule unique qui blanchit ou qui est détachée doit correspondre à une brusque disparition de signal en une étape. Mais nombre de traces temporelles ne présentent pas ce comportement canonique, mais plutôt des profils divers avec parfois une variation du signal en plusieurs étapes (plusieurs fluorophores présents au même endroit) ou une diminution momentanée du signal qui passe sous le seuil puis augmente à nouveau (effet de clignotement des fluorophores).

Le programme va d'abord distinguer les traces canoniques des traces non canoniques par une opération d'autocorrélation. La proportion de traces non canoniques sur une population donnée n'est pas négligeable, elle est en général autour de 20%. Les particules n'ayant pas un comportement canonique sont mises à part ; elles constituent la catégorie 1.

On sépare le reste de la population statistique en deux catégories :

- Catégorie 2 : les particules qui sont présentes du début à la fin du film
- Catégorie 3 : les particules qui disparaissent en une étape clairement marquée au cours du film

Pour isoler les particules qui restent tout au long du film, on détecte les particules présentes sur les deux dernières images par une opération de seuillage. Si une particule est à la fois sur les premières et sur les dernières images, elle est mise à part par le programme.

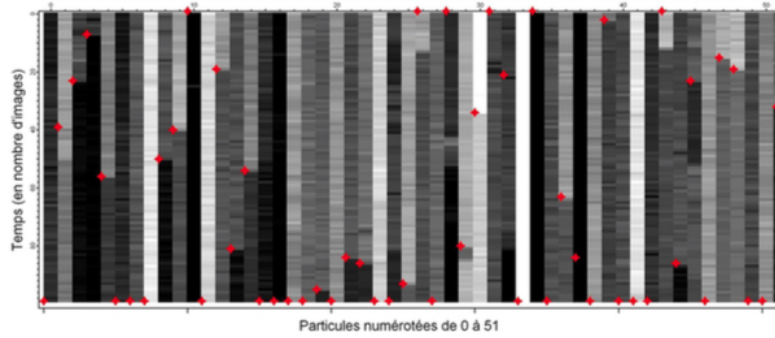


FIGURE 2.21 – Évolution de l'intensité au cours du temps pour 50 particules détectées par le programme.

La figure 2.21 résume visuellement le découpage en trois catégories décrit dans ce paragraphe. Ce graphe représente en vertical l'évolution de l'intensité d'une particule au cours du temps (en images). En horizontal, chaque colonne correspond à une particule précédemment détectée par le programme. Les croix donnent l'instant de départ défini pour chaque particule.

Pour les particules dont la trace temporelle n'est pas canonique, l'instant de départ est fixé à -1, les croix rouges sont en haut du graphe. Pour les particules dont la trace est canonique mais qui ne partent pas au cours du film, l'instant de départ est fixé à la dernière image (croix rouges en bas du graphe 2.21, ici fixées à 49, généralement fixées à 99 lorsque l'on fait l'acquisition de 100 images par couleur). Les autres particules sont celles qui disparaissent en une étape pendant l'acquisition.

Par la suite, sera prise comme référence de population initiale (pour déterminer la proportion de départ au cours du temps) la population des catégories 2 et 3. Les particules appartenant à la catégorie 1 ne sont pas prises en compte dans la suite du traitement.

Au final on retient une population statistique de N_0 particules. A chaque particule correspond un instant de départ T_i , on a donc au total un échantillon $T_0, T_1, \dots, T_{N_0}$ de N_0 observations. On peut alors tracer la distribution statistique des instants de départ.

2.5.3.3 Courbes de départ cumulées : première évaluation de la cinétique de départ des sondes fluorescentes dans chaque couleur

Lorsque nous avons traité nos films d'acquisition selon la procédure décrite plus haut, à partir de notre échantillon statistique dans une couleur de $N_0^{UP/DN}$ temps de départ, nous retraçons toujours en premier lieu la proportion de sondes fluorescentes restants à l'instant t : $\frac{N(t)^{UP/DN}}{N_0^{UP/DN}}$

2.5. Traitement des données TIRFM et extraction de la cinétique de départ des jalons fluorescents

par rapport à leur nombre initial N_0 . Cette courbe appelée courbe de départs cumulés visible dans la figure 2.22 nous donne un premier aperçu de la cinétique de départs des sondes fluorescentes, et ce dans chaque couleur.

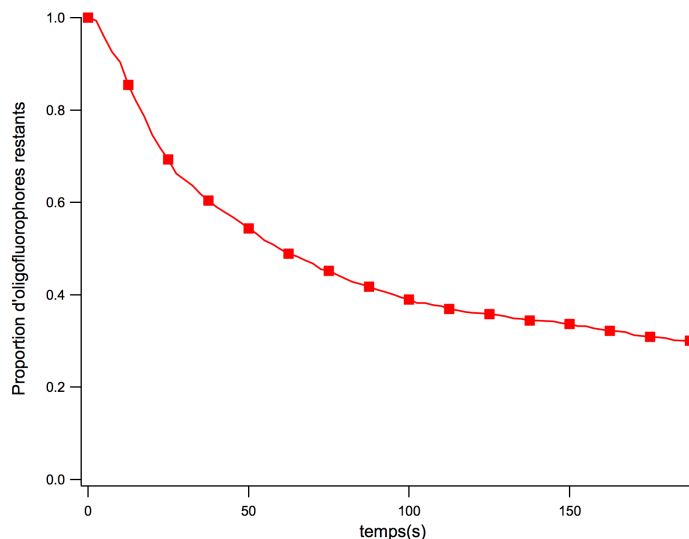


FIGURE 2.22 – Exemple de courbe de départs cumulés dans une couleur, distribution que l'on peut retracer à partir de notre échantillon statistique de N_0 temps de départs dans une couleur : $T_0, T_1, \dots, T_{N_0}$.

Nous verrons dans les chapitres qui suivent, que si cette distribution ne permet pas d'extraire tels quels les paramètres cinétiques de la traduction, c'est un outil très utile et rapidement accessible (nous l'affichons immédiatement après l'acquisition) pour évaluer l'importance respective des événements inducteurs de départs. Ils sont majoritairement au nombre de 3. Une source de signal : la traduction, et deux sources de bruit : le photoblanchiment et les départs instantanés. En réalisant des tests ciblés décrits dans le chapitre 3, on peut déduire simplement par l'analyse des courbes de départs cumulés l'importance respective de chacun de ces phénomènes. Cela nous permet par exemple de vérifier si l'optimisation d'un paramètre expérimental influe sur la diminution ou l'augmentation d'une source inductrice de départs.

2.5.3.4 Traitement particulier des particules colocalisées

Nous cherchons à déterminer le temps mis par le ribosome pour parcourir la distance entre nos deux jalons fluorescents. Pour effectuer cette mesure il nous faut déterminer les instants de départs individuels de chaque jalon, mais on doit aussi s'assurer qu'ils sont tous deux présents sur l'ARN messenger. En pratique ce n'est pas le cas pour tous les systèmes mais seulement pour environ 50% d'entre eux. On va donc isoler cette sous-population au moment du traitement des données pour étudier leur cinétique à part.

La distance entre les deux fluorophores n'étant que de quelques nm, s'ils sont sur le même ARNm, alors ils sont colocalisés dans le rouge et dans le vert (situés à la même position spatiale sur l'image comme visible sur la figure 2.23). Pour s'assurer que des particules sont colocalisées, la technique la plus rigoureuse consisterait à faire de la super localisation. Un émetteur unique

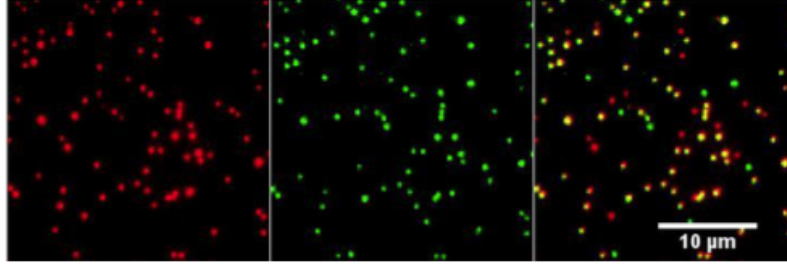


FIGURE 2.23 – De gauche à droite : section d’une image TIRFM dans le rouge, dans le vert et superposée dans les deux couleurs. Les points jaunes sur l’image de droite marquent la présence de deux particules colocalisées.

est représenté sur nos images par une tache d’Airy. Pour localiser précisément la molécule, on peut modéliser la tache d’Airy par une gaussienne dont l’expression est :

$$G(x, y) = A \times \exp \left(-\frac{(x - x_0)^2}{2w_0^2} - \frac{(y - y_0)^2}{2w_0^2} \right) \quad (2.1)$$

avec A une constante, (x_0, y_0) les coordonnées spatiales du centre de la gaussienne et w_0 sa largeur à mi-hauteur. La position du centre de la gaussienne nous donne alors la position de la molécule avec une précision spatiale largement en dessous de la limite de diffraction. Seulement pour super-localiser les molécules, deux conditions doivent être rassemblées. La tache de diffraction correspondant à une molécule doit être répartie sur un grand nombre de pixels (au moins une dizaine de pixels) et le rapport signal/bruit doit être excellent. Or pour avoir un très bon rapport Signal/Bruit, il faut éclairer avec une puissance d’excitation importante, ce que nous ne faisons pas pour limiter le photoblanchiment de nos fluorophores.

De plus, pour assurer un rapport signal/bruit suffisant pour nos expériences, nous limitons la tâche de diffraction sur 4 à 9 pixels (pour avoir une meilleure intensité par pixel). Nous ne travaillons pas dans des conditions de super-localisation car ce n’est pas notre objectif. Il est primordial pour notre approche de ne pas photoblanchir les fluorophores prématurément.

Nous détectons les colocalisations simplement par comparaison des images dans le rouge et dans le vert, en considérant les fluorophores dont les pixels se recouvrent. Nous acceptons une précision moindre qui implique que si un ARNm ne possédant qu’un jalon vert est fortuitement très proche d’un autre ARNm avec juste un jalon rouge, nous ne distinguerons pas ce cas d’un ARNm seul possédant les deux marqueurs.

La probabilité d’une telle colocalisation fortuite est néanmoins faible. Environ un pixel sur 500 est marqué, ce qui signifie que la probabilité que deux fluorophores de couleur différente se retrouvent colocalisés par hasard est de $1/500^{\text{ème}}$. Comme nous avons environ un millier de fluorophores visibles sur la zone de la caméra, cela signifie moins d’une dizaine de faux positifs.

Une fois qu’on a effectué cette opération, on détecte sur l’image les particules après une opération de seuillage et on retient leur localisation (barycentre de l’intensité des pixels au dessus du seuil). Pour chaque film (rouge et vert) indépendamment, on effectue ensuite le même traitement que celui présenté précédemment (sélection par la taille, identification des temps

2.5. Traitement des données TIRFM et extraction de la cinétique de départ des jalons fluorescents

de départ...) mais uniquement pour la sous-population identifiée des particules colocalisées. On extrait ainsi séparément la cinétique de départ des deux marqueurs.

Une ultime sélection est appliquée pour éliminer les cas où un seul des deux marqueurs cesse d'émettre de la fluorescence, pour ne garder qu'une sous population de systèmes qui remplit les deux critères suivants :

- les deux marqueurs sont présents initialement sur l'ARN messenger,
- la trace temporelle des deux fluorophores présente une disparition du signal de fluorescence en une seule étape (traces canoniques).

En effet un évènement de traduction implique nécessairement le départ des deux marqueurs successivement, alors qu'un départ spontané de l'ARNm ou le photoblanchiment peut n'affecter que l'un des deux fluorophores. Dans la pratique cette sélection sévère présente un vrai enjeu si l'on souhaite accumuler une statistique suffisante. Le taux de colocalisations étant rarement supérieur à 70%, la sous-population des particules colocalisées est déjà réduite. Si en plus on ne considère que le cas où les deux marqueurs sont détachés ou photoblanchis, cette sous-population se réduit notablement. A cette étape, cette sous-population statistique sera d'autant plus importante que l'efficacité de traduction de notre système sera grande et le taux de colocalisation élevé. Ces deux paramètres auront une importance capitale pour la réalisation pratique de notre étude, et ont demandé un réel effort d'optimisation.

2.6 Conclusion

Ce chapitre décrit notre dispositif expérimental de TIRFM dans son ensemble, tel qu'il a été imaginé, développé et optimisé avant mon arrivée en thèse.

La technique de microscopie de fluorescence et les fluorophores ont été sélectionnés en fonction des contraintes imposées par notre système biologique et par le principe de notre étude cinétique. Nous avons choisi le TIRFM puisqu'il s'agit d'une technique de microscopie plein champ qui permet d'imager des molécules uniques avec un faible bruit de fond. Les fluorophores utilisés sont des fluorophores organiques de petite taille (pour ne pas gêner l'activité du ribosome) présentant de très bonnes propriétés photophysiques.

Le dispositif de TIRFM ne se résume pas à un montage optique. Nous avons décrit dans ce chapitre l'ensemble des composantes optiques, mécaniques, électroniques, thermiques et fluidiques nécessaires pour mettre en œuvre nos expériences de mesure cinétique. Un des points caractéristiques de notre dispositif est la synchronisation complète des différents éléments, essentielle lorsque l'on veut suivre la dynamique d'un système biologique.

Après une phase d'acquisition, une phase de traitement des données est essentielle pour extraire l'information cinétique d'une série d'images TIRFM acquises dans le temps. Nous avons discuté ici des différentes étapes de ce traitement sur le logiciel IGOR Pro qui aboutissent à déterminer précisément les instants de départ de nos jalons fluorescents. Nous montrerons dans le chapitre 4 les conclusions biologiques apportées par le traitement statistique de cette donnée et son interprétation.

Mon travail de thèse s'est construit sur la base expérimentale solide décrite dans ce chapitre, fruit des travaux de plusieurs doctorats successifs. Tel quel le dispositif a permis de réaliser une preuve de principe de la mesure de la cinétique du ribosome mammifère en molécule unique. L'enjeu du début de mon doctorat était de partir de cet acquis pour aller explorer de nouvelles problématiques biologiques telles que les erreurs programmées de la traduction eucaryote. Chaque nouvelle question biologique implique alors de se confronter à de nouveaux enjeux expérimentaux, ce qui fera l'objet du chapitre 3.

Je présenterai dans ce chapitre des améliorations apportées aux éléments de montage TIRFM pour conforter nos acquis et élargir les possibilités de nos expériences. Je m'attacherai plus particulièrement à décrire mon apport pour répondre à une problématique majeure de notre étude : comment réduire les départs non traductionnels des jalons fluorescents (photoblanchiment et départs spontanés), principale source de bruit de nos mesures ?

Mise en œuvre d'une expérience d'étude de la cinétique en molécule unique

Sommaire

3.1 Histoire de l'expérience de nos rêves	84
3.1.1 De l'échantillon idéal...	84
3.1.2 ...A des conditions expérimentales optimisées	84
3.2 Améliorations optiques	85
3.2.1 Réduction du fond de fluorescence parasite	86
3.2.2 Optimisation du système de maintien de la mise au point : utilisation d'une barette CCD	91
3.2.3 Tentative d'optimisation des propriétés photophysiques des marqueurs fluo- rescents	91
3.3 Stabilité thermodynamique des ARNm et des oligo-fluorophores . . .	97
3.3.1 Description du complexe thermodynamique étudié	97
3.3.2 Protocole d'hybridation et formation du complexe ARN/oligos	98
3.3.3 Rappels des lois thermodynamiques régissant la formation du complexe ARNm-oligonucléotides	99
3.3.4 Pistes d'amélioration de la stabilité thermodynamique	102
3.4 Expérience réelle : bilan	107
3.4.1 Amélioration de la stabilité et du rapport signal/bruit	107
3.4.2 Caractéristiques de l'échantillon réel	108
3.5 Conclusion	111

L'objectif de ce chapitre est de présenter sous tous ses aspects ce que nous avons imaginé comme étant notre idéal expérimental, et de décrire les stratégies qui nous ont permis de nous rapprocher de cet idéal.

L'expérience de nos rêves intègre à la fois des aspects liés au dispositif optique, au contrôle des paramètres extérieurs et des aspects relatifs à l'échantillon biologique lui-même. Nous décrirons dans un premier temps l'ensemble de ces aspects, et les objectifs expérimentaux qui en découlent.

Dans un second temps, nous décrirons les améliorations apportées à notre dispositif optique et à notre protocole expérimental pour atteindre les objectifs définis. Enfin, nous établirons un bilan de l'expérience réelle, et feront un point sur les optimisations qui ont pu être apportées.

3.1 Histoire de l'expérience de nos rêves

3.1.1 De l'échantillon idéal...

Comment caractériser un échantillon idéal pour la réalisation de nos expériences ? Si nous résumons les enjeux de notre étude, on peut trouver des critères quantitatifs pour décrire "*l'échantillon parfait*". D'abord puisque l'on travaille à l'échelle de la molécule unique, il nous faut un grand nombre de systèmes accrochés sur la surface pour augmenter la statistique, mais ce jusqu'à un certain seuil. Si la concentration initiale en systèmes rapporteurs est trop importante, la surface est trop chargée et on ne sera plus dans des conditions de molécule unique. En pratique nous considérons qu'au delà de 2000 systèmes sur une zone d'observation, la zone en question n'est plus exploitable. Nous parlons de couverture pour décrire le nombre de systèmes présents. La couverture idéale correspond à une zone avec 1000-1500 systèmes rapporteurs bien distincts les uns des autres.

Nous avons vu dans le chapitre 2 que nous nous intéressions particulièrement aux ARN messagers qui possèdent à la fois un marqueur fluorescent rouge et un marqueur vert. Il est difficile d'obtenir 100% de systèmes doublement marqués, mais cette proportion doit être maximisée dans les faits pour réaliser nos expériences. C'est également un marqueur de l'intégrité de l'ARN messenger étudié car, si celui-ci est dégradé, le taux de colocalisations (proportion des ARNm qui possèdent les deux marqueurs) est généralement faible.

Enfin nous caractérisons le taux de départs instantanés de nos marqueurs dans le temps sur un échantillon. Nos acquisitions cinétiques durent entre quelques minutes et une dizaine de minutes. Il est important de quantifier la quantité de marqueurs qui partent spontanément sur ces échelles de temps. Ce phénomène est dépendant de plusieurs facteurs : température, composition des tampons, choix des oligonucléotides, conditions d'hybridation et paramètres d'injections. Stabiliser l'accroche des marqueurs sur l'ARN messenger est un enjeu essentiel pour limiter le bruit de nos mesures, mais c'est l'un des plus complexe.

Il nous a fallu optimiser une à une méticuleusement plusieurs variables expérimentales jusqu'à trouver un jeu de paramètres qui aboutissait à combiner statistique (couverture et colocalisations) et stabilité des marqueurs fluorescents dans le temps. L'enjeu de cette partie est de présenter ces variables expérimentales et leurs impacts respectifs.

3.1.2 ...A des conditions expérimentales optimisées

Autour de l'échantillon, la définition des conditions expérimentales joue un grand rôle pour obtenir une expérience dite idéale. Un des principaux critères pour décrire cette expérience est la notion de **reproductibilité**. Pour accumuler une statistique suffisante, nous reproduisons une même expérience plusieurs fois avec des paramètres identiques. Dans ces conditions, l'idéal serait d'avoir des résultats identiques. Seulement dans les faits il est particulièrement difficile d'obtenir des expériences reproductibles. En effet nos expériences impliquent un grand nombre de paramètres, et nous n'avons pas de possibilité d'action sur tous ces paramètres. Certains paramètres biologiques ne peuvent être modifiés et impliquent une **variabilité intrinsèque** d'une expérience à l'autre.

Comme précisé dans le paragraphe précédent, les paramètres liés à l'échantillon peuvent être optimisés, mais cela demande une démarche pas à pas, méticuleuse qui sera décrite dans

3.2. Améliorations optiques

la deuxième partie de ce chapitre. En revanche, nos possibilités d'actions sur les paramètres physiques tels que la température, les réglages optiques, la stabilité mécanique sont plus importantes. **Une expérience qui se déroule au mieux est une expérience stable du point de vue de ces paramètres extérieurs.** L'objectif est de pouvoir faire varier les échantillons et les paramètres biologiques tout en conservant une grande stabilité des paramètres extérieurs comme la température, la mise au point ou la puissance d'excitation laser.

D'autres aspects pratiques rentrent en compte dans la définition d'une expérience modèle. Du point de vue optique, l'idéal est d'observer nos échantillons avec un **rapport signal/bruit maximal et constant pendant la durée de nos expériences.** De plus, comme nous l'avons évoqué au chapitre 2, dans un monde idéal, les marqueurs fluorescents ont une durée de vie illimitée et ne sont pas sujets au photoblanchiment. Bien sûr, en réalité, **le photoblanchiment, source inévitable de bruit, est l'enjeu optique principal de nos mesures qui doit être évalué et minimisé.**

3.2 Améliorations optiques

Le dispositif expérimental présenté au chapitre 2 a permis de constituer une preuve de principe pour nos expériences de mesure de la traduction en molécule unique. La vitesse de traduction d'un ribosome unique a été mesurée entre deux jalons fluorescents espacés de 9 codons. Seulement ce premier système rapporteur présenté a été imaginé pour réaliser cette preuve de principe et n'est pas parfaitement adapté dans la mesure où l'on veut étudier des événements rares tels que les erreurs programmées.

En effet il faut pour cela insérer entre les deux jalons fluorescents des structures secondaires qui favorisent le décalage de la phase de lecture en -1 (erreur programmée que nous ciblerons dans ce travail de thèse), et il faut pour cela une distance suffisante entre les deux jalons. Avant d'insérer une structure, on doit s'assurer que l'on peut mesurer un signal de traduction en éloignant le second jalon fluorescent du premier. Cette modification implique que les phénomènes de photoblanchiment et de départ spontanés des marqueurs fluorescents, sources de bruit directement en concurrence avec le signal de traduction auront un poids plus important qu'auparavant. En effet, le second marqueur étant plus loin sur l'ARNm, il faudra plus de temps au ribosome pour l'atteindre et la probabilité que le marqueur cesse d'émettre entre temps pour une autre raison est donc plus élevée.

Un autre enjeu lorsque l'on considère l'étude des erreurs programmées est la nécessité d'augmenter la statistique de nos mesures. On va chercher à isoler des événements rares représentant une pourcentage faible de l'ensemble des événements de traduction. Pour en extraire une cinétique exploitable, il faut accumuler une statistique importante.

Nous présenterons, dans les sections qui suivent, les améliorations du dispositif expérimental et du protocole de mesure qui ont été apportées pour limiter photoblanchiment et départs spontanés de nos jalons fluorescents. Bien sûr, au delà de ces problématiques, nous présenterons aussi les améliorations visant simplement à optimiser le dispositif sur ses différents aspects pour améliorer nos performances expérimentales.

3.2.1 Réduction du fond de fluorescence parasite

3.2.1.1 Paramètres impliqués dans le réglage de l’onde évanescente

Améliorer l’onde évanescente d’excitation est un enjeu pour améliorer le rapport signal/bruit. Deux paramètres interviennent lors du réglage de l’onde évanescente : la collimation du faisceau incident et l’angle d’incidence à l’interface verre/eau. Si le faisceau est mal collimaté, le confinement de l’onde évanescente ne sera pas homogène sur toute la zone d’observation. Le rapport signal/bruit est alors dégradé sur une partie de l’image.

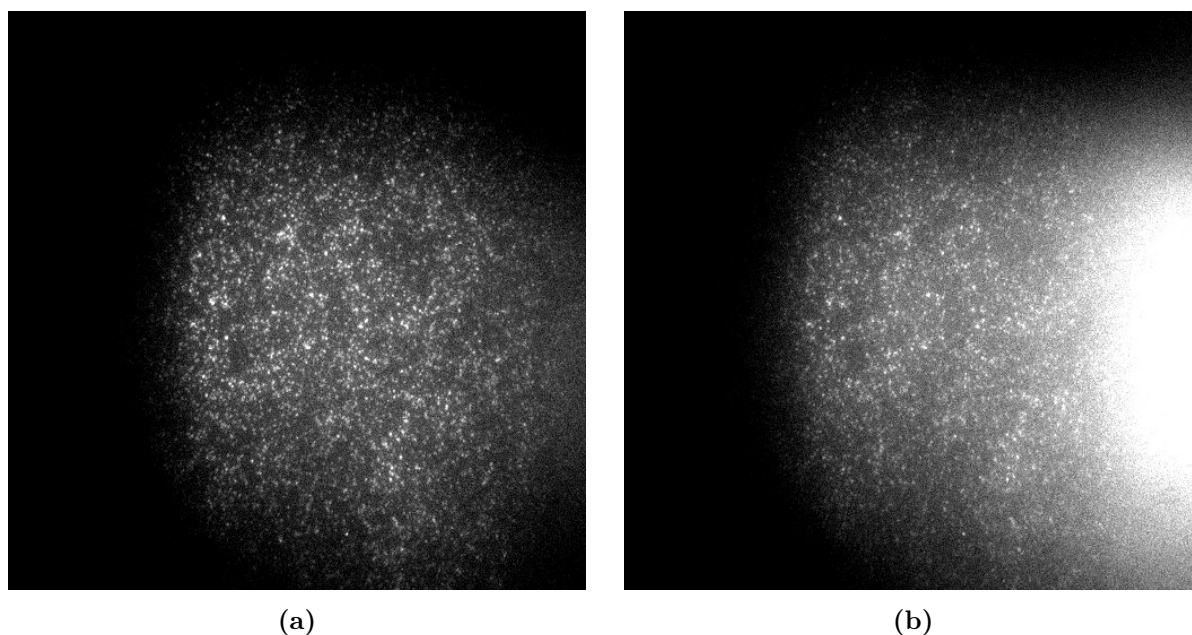


FIGURE 3.1 – Exemples d’images TIRFM dans le vert présentant un réglage de l’onde évanescente non optimisé. (a) image TIRFM acquise dans le vert avant l’arrivée du RRL. (b) Image TIRFM de la même zone au moment de l’arrivée du RRL dans la cellule. L’échelle de niveaux de gris est la même pour les 2 images.

L’angle d’incidence a également un impact sur le confinement de l’onde. Plus l’onde évanescente est confinée, meilleur sera le rapport signal/bruit, mais cela est surtout vrai à l’instant où l’on injecte le RRL dans la cellule. En effet le RRL émet une fluorescence parasite, en particulier dans le vert, comme visible sur la figure 3.1. **Mieux confiner l’onde évanescente en optimisant le réglage de l’angle d’incidence réduit l’impact de cette fluorescence parasite lors de l’acquisition.**

3.2.1.2 Amélioration de la voie d’illumination

Modification du chemin optique des faisceaux d’excitation Comme nous l’avons précisé dans la section 2.2.1 du chapitre 2, du fait du chromatisme de l’élargisseur de faisceau utilisé pour élargir les deux faisceaux d’excitation, l’onde évanescente ne peut être optimale dans les deux couleurs. On doit choisir un réglage correspondant à un compromis entre le réglage optimal pour le faisceau rouge et le faisceau vert.

3.2. Améliorations optiques

Pour résoudre cette difficulté, nous choisissons de dissocier totalement le parcours de chaque faisceau avant l'arrivée sur les miroirs M4 et M5 (cf. figure 3.2). Le faisceau vert est toujours élargi par le télescope $\times 10$. Le faisceau rouge ne rejoint plus le faisceau vert en amont par le biais d'un dichroïque, il est dirigé à l'aide de 2 miroirs (M1R et M2R sur la figure 3.2) dans un télescope $\times 4$ qui l'élargit indépendamment du faisceau vert¹. **On peut désormais optimiser la collimation de chaque faisceau indépendamment l'un de l'autre et agir plus généralement sur le réglage d'un faisceau d'excitation sans perturber le réglage dans l'autre couleur.**

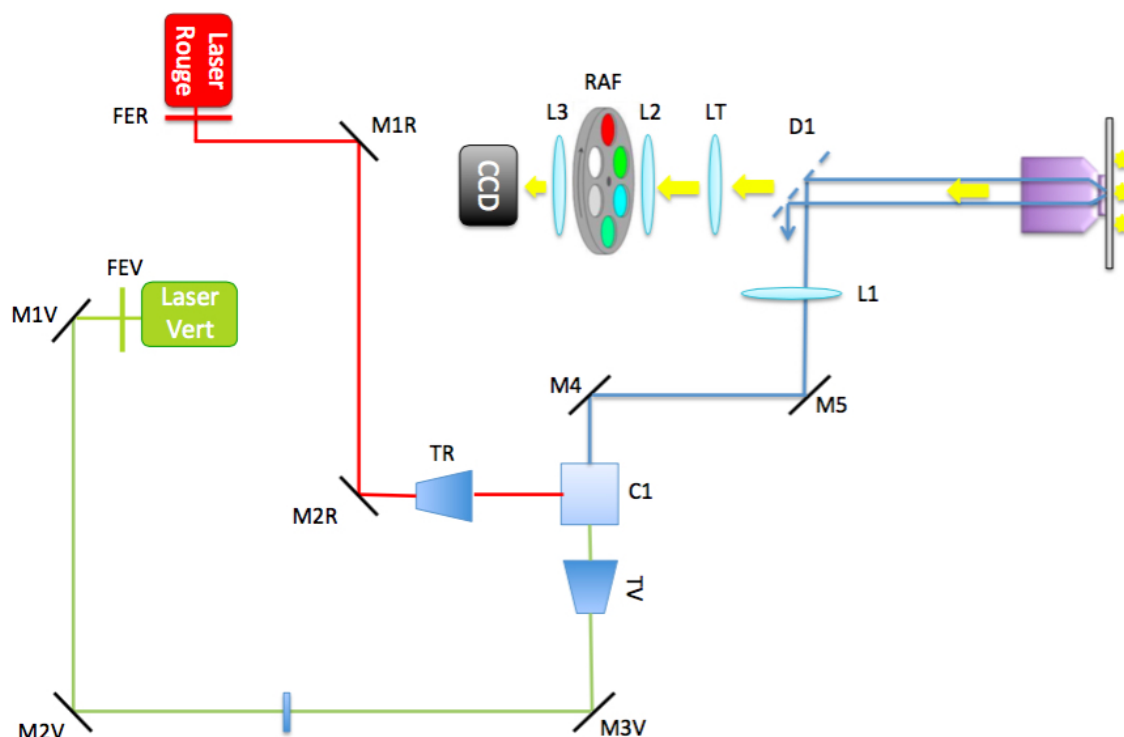


FIGURE 3.2 – Schéma du montage optique modifié pour rendre indépendant le chemin de chaque faisceau d'excitation.

Changement de la source laser rouge Quel que soit le réglage de l'onde évanescente, on constate dans le rouge que la zone d'observation n'est pas homogène en terme d'excitation (cf. figure 3.3). En fait la diode laser rouge n'a pas un profil spatial gaussien. Ce profil est découpé en deux lobes bien visibles sur l'image 4.6a. Dans cette configuration, tous les fluorophores ne sont pas excités de la même manière, et de fait le photoblanchiment n'est pas homogène sur l'ensemble

1. On a changé de laser rouge. C'est à présent une diode laser circularisée en sortie par des prismes anamorphoseurs, qui effectuent une partie de l'agrandissement du faisceau.

Chapitre 3. Mise en œuvre d’une expérience d’étude de la cinétique en molécule unique

de la zone d’observation. Cela introduit un biais de mesure que l’on souhaite minimiser même s’il est corrigé en partie par le programme de traitement des données. Pour cela on choisit une diode laser Toptica à 640nm. Le faisceau initialement asymétrique est rendu circulaire grâce à un prisme anamorphoseur disposé en sortie de la source.

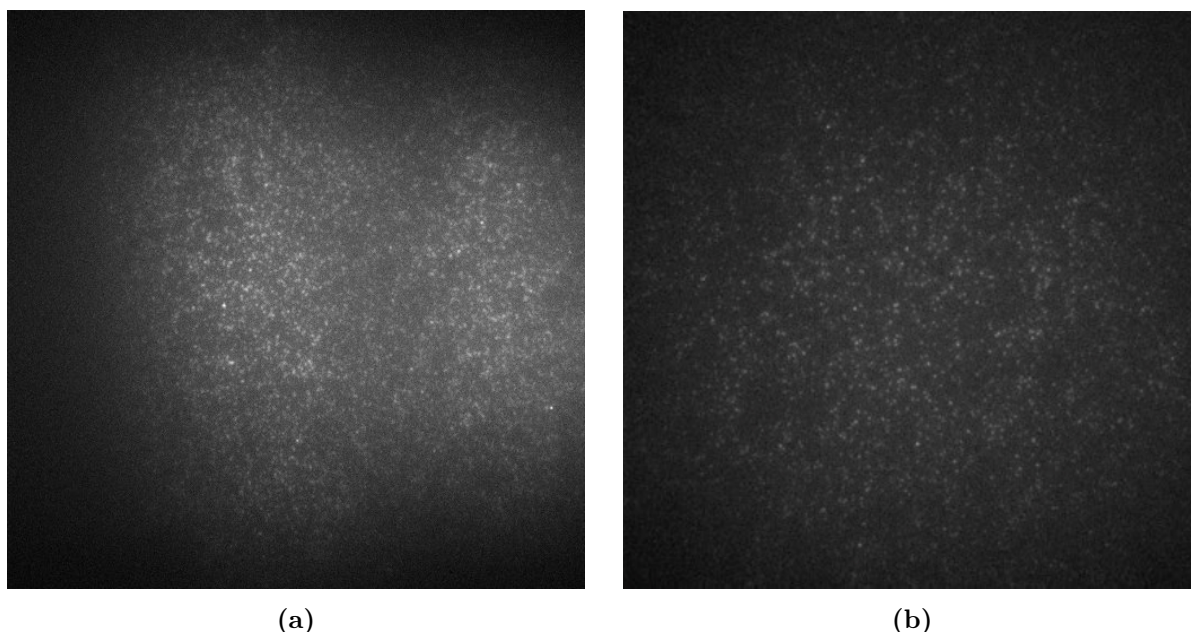


FIGURE 3.3 – Comparaison des images TIRFM dans le rouge pour les deux sources laser testées. (a) Image TIRFM réalisée avec la diode laser Oxxius. (b) Image TIRFM réalisée avec la nouvelle diode laser Toptica.

On parvient, grâce à cette nouvelle source, à éclairer avec un mode gaussien (cf. figure 4.10b). Demeure une légère in-homogénéité d’excitation entre les bords et le centre de l’image qui ne peut être corrigée qu’a posteriori lors du traitement des images.

3.2.1.3 Objectif possédant une ouverture numérique de 1,49

Au cour de ma thèse, nous avons eu l’opportunité de travailler avec un nouvel objectif à grande ouverture numérique grâce au prêt de François Treussart (enseignant-chercheur au laboratoire Aimé Cotton). La valeur de l’ouverture numérique de ce nouvel objectif est de 1,49 contre 1,45 précédemment. **Changer d’objectif de microscope nous a permis d’améliorer nettement notre rapport signal/bruit tout en diminuant la puissance d’excitation de nos lasers, ce qui est déterminant pour limiter le photoblanchiment.**

Augmentation de l’efficacité de collection L’efficacité de collection des photons émis par les fluorophores dépend de l’angle limite d’ouverture de l’objectif. Dans le cas du nouvel objectif, l’angle limite d’ouverture vaut 78° contre $73,5^\circ$ pour l’ancien objectif à 1,45. On collecte les photons d’émission dans un angle solide plus important, ce qui implique que l’on collecte plus de signal de fluorescence mais aussi plus de bruit de fluorescence parasite. Seulement le bruit

3.2. Améliorations optiques

de fluorescence parasite évolue proportionnellement à $\sqrt{N}$ avec N le nombre de photons de fluorescence collectés, tandis que le signal évolue lui proportionnellement à N .

$$\begin{cases} \text{Bruit} \propto \sqrt{N} \\ \text{Signal} \propto N \end{cases}$$

$$\Rightarrow S/B \propto \frac{N}{\sqrt{N}}$$

En conséquence l'augmentation de l'angle de limite d'ouverture induit une augmentation du rapport Signal/Bruit de nos images.

Confinement de l'onde évanescente et efficacité d'excitation La modification de l'ouverture numérique a un également un impact sur l'onde évanescente et notamment sur son confinement. On rappelle que l'expression de la longueur de pénétration dans le milieu est :

$$d = \frac{\lambda_{excitation}}{2\pi n_1} \frac{1}{\sqrt{\left(\frac{n_1}{n_2} \sin(i_1)\right)^2 - 1}} \quad (3.1)$$

Pour une longueur d'onde d'excitation donnée on peut tracer le graphique représentant la profondeur de pénétration en fonction de l'angle incident. L'angle limite pour l'objectif à 1,45 est de $73,5^\circ$ contre 78° pour l'objectif à 1,49. La gamme d'angles pour laquelle on a une réflexion totale est donc plus grande avec ce second objectif² que pour le premier. Pour la gamme d'angles représentée dans la figure 3.4, on constate que l'onde évanescente est plus confinée entre 73° et 78° , gamme d'angles spécifique à l'objectif 1,49, car la profondeur de pénétration d est réduite.

On observe également sur cette figure deux régimes différents pour l'évolution du confinement de l'onde évanescente. Entre $65,5^\circ$ et 73° la profondeur de pénétration varie beaucoup avec la valeur de l'angle incident. Pour des angles plus élevés (entre 73° et 78°), cette variation est moindre, donc le réglage de l'onde évanescente est moins sensible à une modification de l'angle incident dans cette gamme de travail. Avec l'objectif ouvert à 1,45, on est donc dans un régime où une petite modification de l'angle d'incidence entraîne une variation importante de la profondeur de pénétration tandis que pour l'objectif ouvert à 1,49, on peut travailler avec des angles plus grands et se placer dans un régime où une variation de l'angle d'incidence influe peu sur la variation de la profondeur de pénétration.

En conclusion, avec le nouvel objectif à 1,49, on peut travailler dans une gamme d'angles incidents qui nous permettent d'obtenir une onde évanescente jusqu'à deux fois mieux confinée et moins sensible à la variation de l'angle d'incidence quand on réalise un réglage optique. On a donc un système plus stable, et on améliore grandement notre rapport signal/bruit en réalisant une sélection spatiale plus efficace.

2. On rappelle que la valeur de l'angle critique pour l'interface considérée est $i_{1l} = 65,5^\circ$. Pour ON=1,45 la gamme d'angles de travail est donc comprise entre $65,5^\circ$ et $73,5^\circ$, soit 8° d'amplitude. Pour ON=1,49 cette gamme s'échelonne entre $65,5^\circ$ et 78° , soit $12,5^\circ$ d'amplitude.

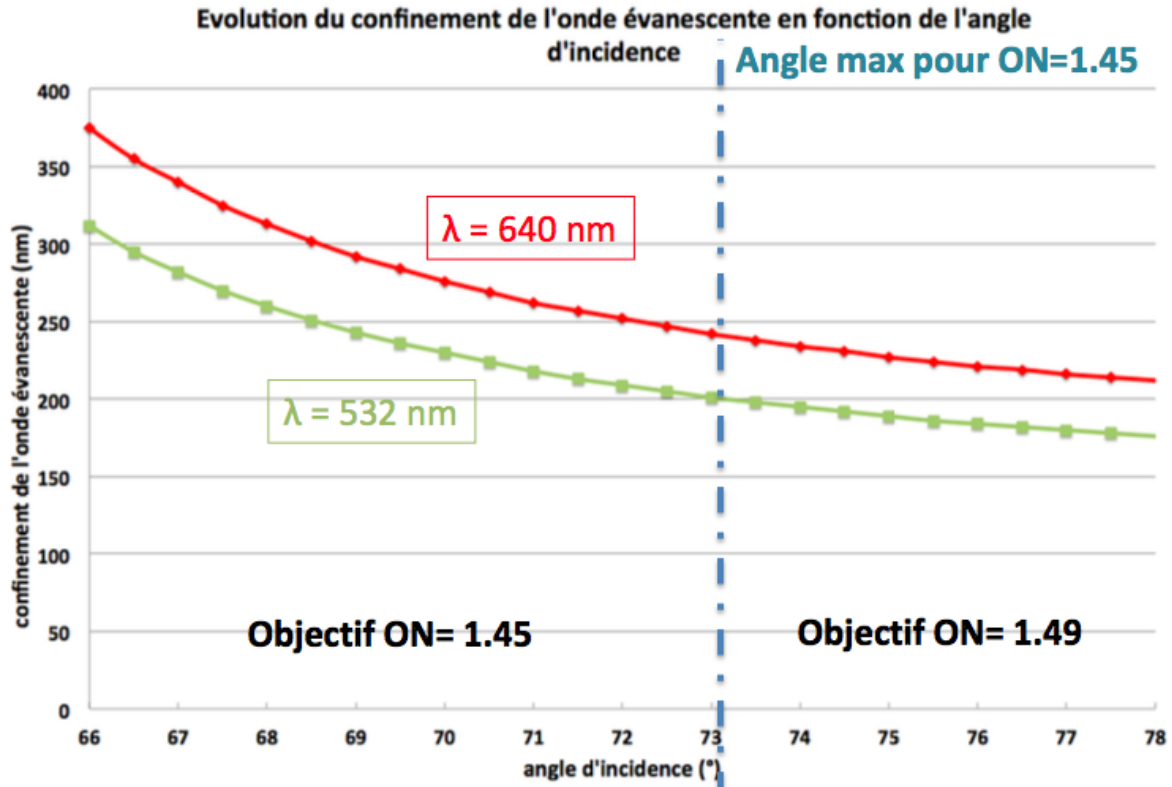


FIGURE 3.4 – Évolution du facteur de transmission T_{TE} (courbe noire) et de la longueur de pénétration de l'onde évanescence d en fonction de l'angle d'incidence du faisceau d'excitation tracés d'après l'équation 3.1. Les courbes rouge et verte correspondent à d respectivement pour une excitation à 640 nm et à 532 nm.

Amélioration notable du rapport signal/bruit Pour évaluer le gain de notre nouvel objectif, on peut évaluer le rapport signal/bruit avant et après le changement d'objectif. Le rapport signal/bruit d'une image peut être calculé via l'expression suivante :

$$S/B = \frac{\langle Signal \rangle - \langle Fond \rangle}{\sigma_{Fond}} \quad (3.2)$$

Le bruit correspond dans notre cas au fond de fluorescence de nos images et le signal aux spots lumineux de l'image représentatifs d'une molécule unique.

Pour évaluer le rapport signal/bruit, nous avons effectué sur plusieurs images des mesures de la moyenne et de l'écart type du fond de fluorescence au centre de l'image, puis le même nombre de mesures pour le signal au centre de l'image toujours. On peut alors comparer les valeurs obtenues pour des image acquises avec l'objectif à 1,45 et des images acquises avec l'objectif à 1,49 (avec des puissances d'excitation identiques). **Nos mesures nous ont permis de conclure que le rapport signal/bruit a été multiplié par un facteur 10 en changeant l'objectif de microscope.** On est alors en mesure de diminuer la puissance d'excitation laser tout en préservant un rapport signal/bruit suffisant pour l'acquisition de nos mesures.

3.2. Améliorations optiques

Concrètement, nous sommes passés d'une puissance d'excitation dans le rouge de 10 mW à une puissance de 4 mW et dans le vert d'une puissance d'excitation de 20 mW à 4 mW tout en conservant un rapport signal/bruit plus élevé que précédemment. La conséquence principale de cette baisse de puissance est la diminution automatique du photoblanchiment des marqueurs fluorescents puisqu'ils sont excités à des puissances plus faibles.

3.2.2 Optimisation du système de maintien de la mise au point : utilisation d'une barrette CCD

Un autre apport pour améliorer la stabilité optique de notre système et ainsi faciliter la prise d'acquisition a été la modification du système de maintien de focus. On a remplacé la photodiode 4 quadrants (QPD) par une barrette CCD constituée d'une ligne de 35 pixels.

Un des problèmes de la QPD réside dans la nécessité de centrer le faisceau sonde sur le capteur pour que son fonctionnement soit optimal. Au fil du temps il était fréquent que le faisceau se décentre et qu'il soit nécessaire de reprendre le réglage du faisceau sonde. De plus avec ce capteur, nous n'arrivions à exploiter qu'une gamme de tension appliquée sur la platine de 2V, ce qui était parfois insuffisant si d'importantes variations de mise au point survenaient pendant l'acquisition. Le changement de ce composant est motivé par la nécessité de renforcer la stabilité du système pour réaliser nos expériences de façon plus confortable.

Le principe optique du système de maintien de la mise au point est identique à celui présenté dans la section 2.4.2, page 70 du chapitre 2. Le faisceau sonde est totalement réfléchi sur l'échantillon au même titre que les faisceaux d'excitation et va ensuite par le biais d'un miroir d'or positionné en sortie du cube C1 (cf. figure 3.2) être renvoyé sur la CCD.

La barrette CCD est reliée à l'ordinateur via une carte d'acquisition National Instrument et exploité grâce à un programme LabView développé en interne. Le programme permet de calculer en temps réel le barycentre de l'intensité des 35 pixels, ce qui correspond à la position du spot sur la CCD. On peut alors générer une rampe de tension sur la platine de nano-positionnement et enregistrer le mouvement correspondant du spot sur la CCD. Si la réponse du capteur est linéaire par rapport à la rampe de tension, cela signifie que le spot se déplace convenablement sur la CCD et n'en sort à aucun moment. **On parvient après réglage à obtenir une réponse linéaire pour une rampe de tension de 3 volts, soit 50% de plus qu'avec l'utilisation d'une QPD. Avec cette amplitude, la stabilité de notre système de maintien de la mise au point est supérieure et suffisante pour nos applications.** Désormais les petites variations de mise au point dans le cadre de nos acquisitions sont très bien gérées par le système, et celui-ci reste stable pendant plusieurs mois avec des temps d'expérience et des temps de pause sans que l'on ait à revenir sur le réglage optique.

3.2.3 Tentative d'optimisation des propriétés photophysiques des marqueurs fluorescents

3.2.3.1 Différentes possibilités pour augmenter le temps de vie de nos marqueurs fluorescents

Utilisation d'un système ROXS L'utilisation d'un couple oxydant réducteur (système appelé ROXS pour Reducing and Oxidizing system) couplé à un système enzymatique pour dépléter

Chapitre 3. Mise en œuvre d’une expérience d’étude de la cinétique en molécule unique

le milieu en oxygène a été testé lors des thèses précédentes. La présence d’oxygène dans le milieu est en partie responsable du phénomène de photoblanchiment par la création de radicaux libres. Cependant, l’oxygène diminue aussi la durée de vie de l’état triplet ce qui ramène les fluorophores dans leur état fondamental. Le couple oxydant réducteur vient remplacer l’oxygène dans ce rôle, et combiné au système enzymatique, il permet d’augmenter notablement la durée de vie des fluorophores sans diminuer le taux de fluorescence. Seulement les tests effectués avec ce système, bien que très concluants dans le tampon TRIS (durée de vie augmentée jusqu’à 30 fois sous excitation laser) se sont révélés beaucoup moins concluants dans le RRL, milieu très riche en oxygène (cf. [Fizman 2013]). Non seulement la durée de vie des ATTO n’a pas été nettement augmentée, mais en plus l’amélioration de la durée de vie nécessite quelques dizaines de minutes pour être effective, ce qui n’est pas négligeable à l’échelle de nos expériences. Il existait donc un risque que la durée de vie des fluorophores varie au cours de l’expérience, ce qui est un problème si l’on souhaite estimer la contribution du photoblanchiment pour pouvoir la soustraire et extraire le seul signal de traduction. Cette méthode d’amélioration de la durée de vie des marqueurs a donc été abandonnée.

Fluorophores chimiquement protégés Il est aussi possible d’agir sur les propriétés photophysiques intrinsèques des marqueurs fluorescents par des procédés chimiques décrits dans la littérature [Altman 2012].

Les auteurs décrivent dans cet article des systèmes inhibiteurs de l’état triplet nommés **Triplet State Quenchers** ou TSQ (COT, NBA et Trolox)). Ces molécules vont diminuer la durée de vie de l’état triplet, afin d’augmenter la durée de vie avant photoblanchiment du fluorophore et évitant les réactions de dégradation photo-induites subies par le fluorophore pendant son passage dans l’état triplet. Si ces molécules sont généralement utilisées en solution dans le milieu d’étude à des concentrations mM, les auteurs proposent ici de les greffer directement sur le fluorophore pour le protéger. La sous-figure 3.5.a. présente la structure chimique générale de ces fluorophores modifiés³ et les sous-figures **b.** et **c.** illustrent des mesures de leurs propriétés photophysiques. Les auteurs ont vérifié que les caractéristiques spectrales des fluorophores sont inchangées par rapport à celles des cyanines dont ils sont dérivés (spectres d’absorption et d’émission, rendement quantique...). Ce fait étant établi, l’étude peut se concentrer sur le paramètre photophysique le plus significatif : le temps moyen passé dans l’état fluorescent de la molécule τ_{ON} (s)⁴. Comparé à l’ajout des molécules TSQ en solution ou à la molécule de cyanine seule, le temps moyen τ_{ON} est nettement supérieur pour les fluorophores directement protégés (cf. figure 3.5, **b**). Des premiers tests ont été réalisés in-vitro en étudiant des complexes fluorophores-ADN immobilisés en surface et éclairés par un laser à 640nm. Un système éliminant l’oxygène du milieu est utilisé pour limiter le photoblanchiment. Le temps de vie avant photoblanchiment dans ces conditions est multiplié par plus d’un facteur 10 dans le cas du fluorophore Cy5-Trolox en comparaison avec la cyanine seule. (cf. figure 3.5, **c** et 3.6, **a**).

3. La fonction NHS permet une accroche spécifique sur des fonctions amines, typiquement sur les lysines des protéines

4. Pour une molécule qui ne clignote pas, c’est équivalent à la durée de vie avant photoblanchiment, mais lorsqu’on travaille dans des milieux appauvris en oxygène, et avec des inhibiteurs de l’état triplet, on peut avoir des phénomènes de clignotement appuyés, avec des périodes de fluorescence, entrecoupées de périodes plus ou moins longues dans l’état triplet.

3.2. Améliorations optiques

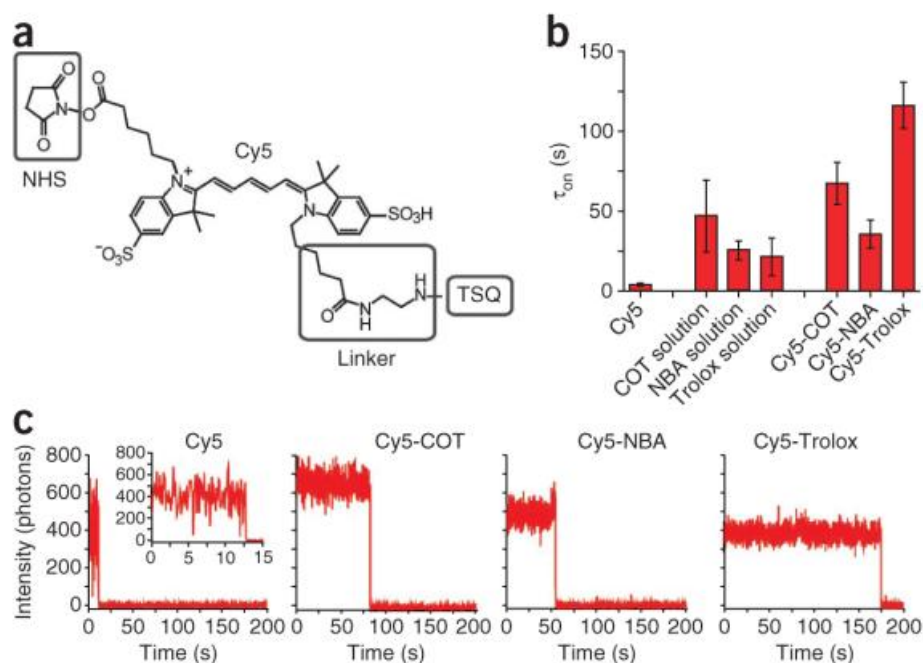


FIGURE 3.5 – Figure adaptée de [Altman 2012]. Propriétés photophysiques in-vitro et dans un milieu déplété en oxygène pour des fluorophores protégés par couplage direct de molécules TSQ. Test des propriétés photophysiques des marqueurs protégés comparés au fluorophore seul et à l’ajout des TSQ en solution. **a.** Structure topologique d’un fluorophore couplé à un TSQ. **b.** Temps de vie avant photoblanchiment pour : une cyanine seule, l’ajout de TSQ en solution, le fluorophore protégé avec couplage direct à différents TSQ. **c.** Evolution de l’intensité de fluorescence au cours du temps pour une cyanine seule et pour une cyanine couplée à un TSQ.

Les auteurs ont également étudié leur système in-vivo dans des cellules d’ovaires de hamster marquées par les différents types de fluorophores. Ici aucun système d’élimination de l’oxygène n’est utilisé. On constate que même dans ces conditions, les performances des fluorophores protégés en terme de photophysique sont très supérieures aux fluorophores non modifiés (cf. figure 3.6). Il est notable que selon les conditions de l’expérience, le fluorophore protégé qui présente les meilleures propriétés photophysiques peut varier. Pour l’étude in-vitro, c’est clairement le dérivé Cy5-Trolox alors que pour l’étude in-vivo Cy5-COT et Cy5-NBA sont plus adaptés.

En nous référant aux résultats de cet article, nous avons souhaité faire appel à cet outil pour améliorer les propriétés photophysiques de nos fluorophores. Nous avons pris contact avec la startup *Lumidyne technology* qui synthétise des fluorophores protégés et avons commandé des fluorophores adaptés à notre étude. Les résultats des tests effectués avec ces marqueurs protégés dans les conditions de nos expériences sont exposées dans la section qui suit.

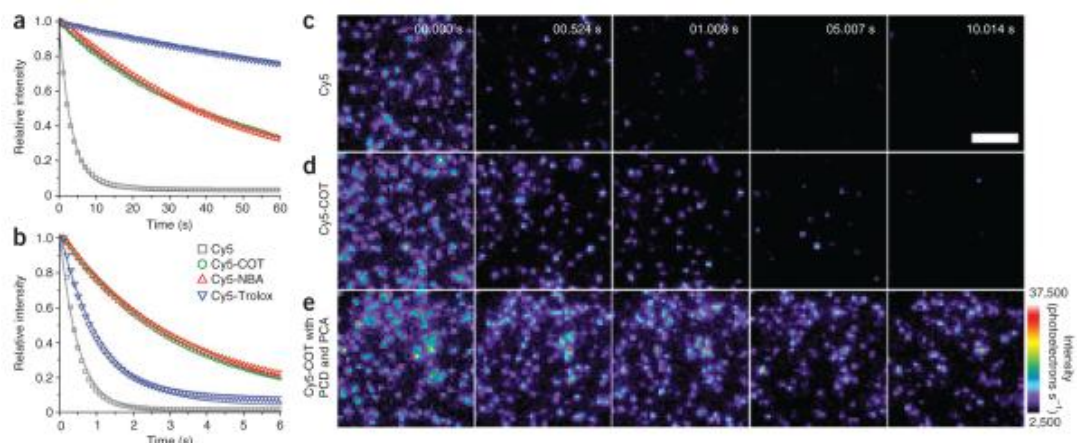


FIGURE 3.6 – Figure adaptée de [Altman 2012]. Propriétés photophysiques des fluorophores protégés in-vivo et sans déplétion en oxygène. **a.** et **b.** Courbes d’évolution de l’intensité de fluorescence au cours du temps pour des cyanines seules et des cyanines couplées à une molécule de TSQ. **c., d.** et **e.** images prises en microscopie de fluorescence illustrant le photoblanchiment des fluorophores au cours du temps pour des fluorophores seuls et des fluorophores protégés par ajout d’une molécule de COT (Cy5-COT)

3.2.3.2 Tests avec l’hybridation de marqueurs Lumidine (LD) chimiquement protégés

Les tests réalisés avec des oligonucléotides couplés à des marqueurs fluorescents lumidine protégés ont donné des résultats mitigés. Nous avons réalisé plusieurs séries de tests avec des ARN messagers différents qui n’ont pas abouti aux mêmes conclusions. Pour estimer pour chaque marqueur la part de départs liés au photoblanchiment et la part de départs liés à des détachements spontanés, nous avons acquis deux types de films :

- **(a) Des films rapides dans une seule couleur.** Dans ce cas, nous faisons l’acquisition d’une image toutes les 100 ms (au lieu d’une image toute les 5 s pour des films classiques). Cela n’est possible que dans une couleur. En effet, il n’est alors pas nécessaire d’actionner la roue à filtre, qui requiert un temps de latence d’au moins 600 ms. L’avantage de ces acquisitions, c’est que sur l’échelle de temps réduite du film (à peine 20 s), peu de départs spontanés ont lieu, et ce phénomène est alors négligeable devant le photoblanchiment
- **(b) Des films dits lents, ou plutôt classiques où l’on acquiert une image dans chaque couleur toutes les 5 s** (cf. 2.4.1.2, page 69 dans le chapitre 2). Dans ce cas on prend en compte le phénomène de départs spontanés en plus du photoblanchiment.

3.2. Améliorations optiques

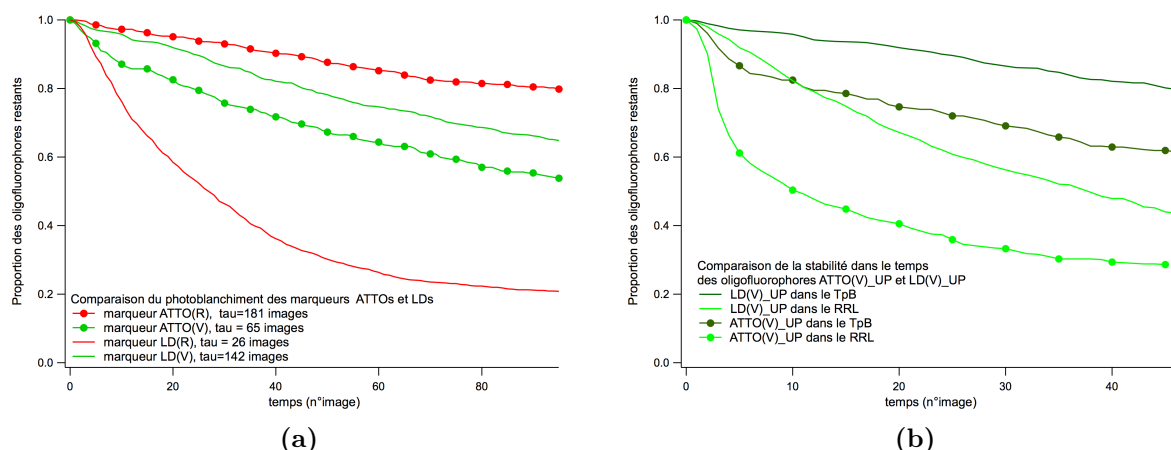


FIGURE 3.7 – Courbes de départs cumulés acquises pendant la première série de tests comparatifs des propriétés photophysiques des marqueurs ATTOs et LDs. (a) Comparaison des cinétiques de départs cumulés des deux types de marqueurs (courbes marquées par des cercles pour les ATTO et sans marqueurs pour les LD) par l’acquisition de films rapides dans le tampon B. (b) Comparaison des cinétiques de départs cumulés des marqueurs ATTO vert (courbes marquées par des cercles) et LD vert dans le tampon B (TpB) et dans le RRL par l’acquisition de films classiques.

Pour la première série d’expériences, les acquisitions de films rapides (type (a)) sont visibles sur la figure 3.7a et les acquisitions des films lents (type (b)) sur la figure 3.7b. La plupart des acquisitions ont été réalisées dans un tampon salin appelé tampon B (ou TpB) qui est celui utilisé pour diluer l’hybridation des systèmes rapporteurs. Pour les tests de la figure 3.7b, on a aussi réalisé des mesures dans l’extrait cellulaire RRL, mais dans des conditions qui nous assuraient qu’il n’y ait pas de traduction (ce point sera détaillé dans le chapitre 4, section 4.1.1.1, page 114) afin de prendre uniquement en compte le photoblanchiment et les départs spontanés des marqueurs.

Lors de cette première série d’expériences, nous avons constaté en premier lieu au regard des films rapides que la durée de vie avant photoblanchiment du marqueur LD rouge est bien inférieure à celle de l’ATTO rouge. En ajustant par une loi exponentielle les courbes de départs cumulés associées à chacun des marqueurs on trouve une durée de vie caractéristique avant photoblanchiment 7 fois plus longue (cf. figure 3.7a) pour le marqueur ATTO rouge que pour le marqueur LD correspondant. De plus la brillance de l’ATTO rouge est également nettement supérieure. Nous avons donc exclu d’emblée l’utilisation du marqueur LD rouge pour remplacer l’ATTO correspondant.

Pour les LD et ATTO verts, le constat est moins évident. Lors de cette première série d’expériences nous avons constaté que le photoblanchiment du LD vert était moindre par rapport à celui de l’ATTO vert dans les mêmes conditions d’illumination. De plus pour l’ARN considéré l’hybridation avec le LD s’est révélée plus stable dans le temps que celle avec l’ATTO vert (cf. figure 3.7b)⁵. Cet effet est encore plus fort lorsque l’on réalise l’expérience dans le RRL. L’écart entre les courbes de départs cumulés des films de type (b) correspondants aux deux marqueurs

5. Cet aspect inattendu et que nous ne nous expliquons pas totalement n’est pas une amélioration optique en soi mais comme nous le verrons dans la section 3.3.3, c’est tout de même un résultat concluant pour l’amélioration globale de nos expériences.

(figure 3.7b) est nettement plus important que ce même écart pour les courbes des films rapides de type (a) pour ces mêmes marqueurs. Ce n’est donc pas majoritairement le photoblanchiment mais bien les départs spontanés des sondes fluorescentes qui sont responsables d’un tel écart entre le départs cumulés des marqueurs lumidine verts et ceux des marqueurs ATTO verts sur la figure 3.7b.

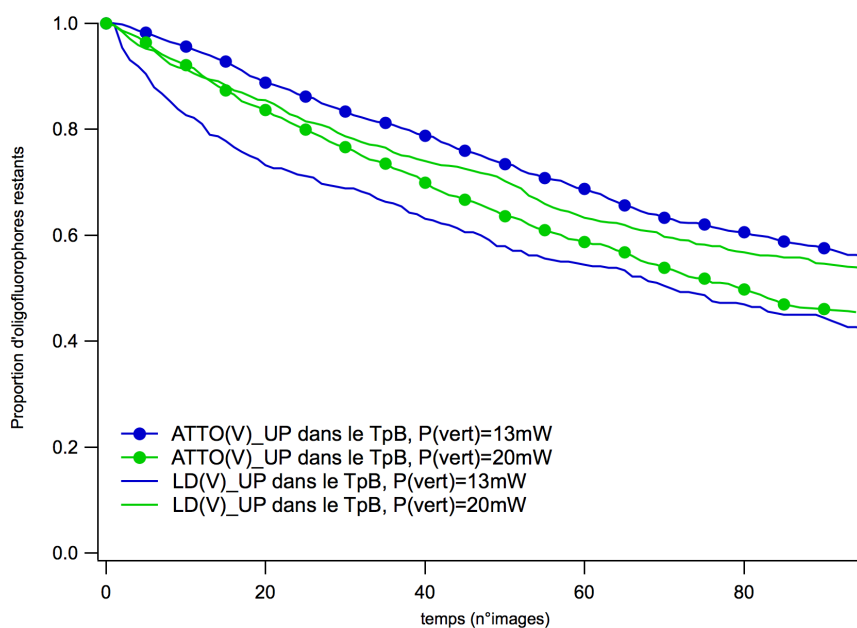


FIGURE 3.8 – Courbes de départs cumulés dans le vert acquises pendant la seconde série de tests sur un nouvel ARN messenger. Il s’agit ici uniquement de l’acquisition de films lents dans le tampon B en faisant varier la nature de l’oligofluorophore UP(V) et la puissance d’excitation dans le vert

Nous avons de fait travaillé un temps avec une configuration hybride comprenant un oligofluorophore LD532-UP et un autre ATTO640-DOWN, qui nous a apporté des améliorations ponctuelles précieuses pour plusieurs séries d’expériences.

Par la suite, lors d’expériences sur un ARN messenger différent nous avons à nouveau comparé le LD vert et l’ATTO vert dans des conditions expérimentales comparables à la première série de tests, en ne faisant cette fois l’acquisition que de films lents (type (b)), puisque le photoblanchiment est similaire entre les deux marqueurs. Nous avons alors constaté (cf. figure 3.8) que les départs cumulés pour l’ATTO vert et le lumidine vert étaient soit comparables (pour une puissance de 20 mW), soit que l’ATTO vert partait moins au cours du temps (pour une puissance de 13 mW). Ce résultat a remis en question nos premières conclusions, et nous a poussé à repartir sur un système marqué par un couple d’ATTO vert et rouge.

La conclusion que l’on peut tirer de ces expériences est que dans nos conditions expérimentales, l’utilisation de marqueurs protégés du type Lumidine n’a pas été un élément majeur pour résoudre le problème du photoblanchiment et des départs spontanés. On peut noter que dans un contexte particulier (un ARNm, une série d’expériences, un jeu de paramètres expérimentaux), l’utilisation du lumidine vert

3.3. Stabilité thermodynamique des ARNm et des oligo-fluorophores

nous a permis d'améliorer temporairement les résultats de nos mesures.

Le cas particulier de ce test photophysique illustre parfaitement une difficulté majeure de nos expériences. Confrontés à un grand nombre de paramètres expérimentaux, nous sommes contraints d'accepter que dans un contexte expérimental, un jeu de paramètres sera particulièrement adapté et fructueux, mais que le seul changement d'un ARN messenger ou d'une condition biologique nous oblige fréquemment à revenir sur ce jeu de paramètres. Nous devons travailler avec la conscience de cette limitation.

3.3 Stabilité thermodynamique des ARNm et des oligo-fluorophores

La stabilité thermodynamique des oligofluorophores est avec le photoblanchiment l'un des problèmes majeurs que nous avons dû résoudre pour optimiser le déroulement de nos expériences et ouvrir la voie à d'autres perspectives d'études. Comme pour les améliorations optiques, nous n'avons pas exploré une seule piste, nous sommes intervenus à tous les niveaux de la préparation de l'échantillon. Nous décrirons dans cette section, d'abord les paramètres thermodynamiques essentiels pour comprendre les raisons de l'instabilité des sondes fluorescentes, puis l'ensemble des stratégies mises en place pour minimiser ce phénomène et obtenir une hybridation stable dans le temps.

3.3.1 Description du complexe thermodynamique étudié

Nos sondes fluorescentes sont accrochées sur l'ARN messenger via une liaison codon-anticodon comme visible sur la figure 3.9. Ici 12 nucléotides complémentaires assurent l'accroche des oligonucléotides.

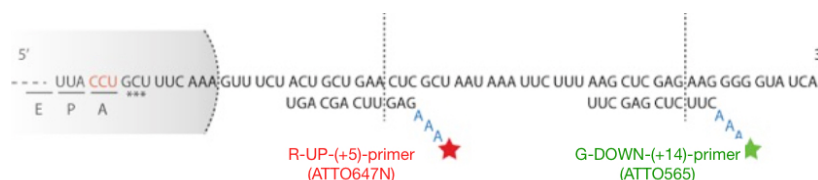


FIGURE 3.9 – Hybridation des oligo-fluorophores sur l'ARN messenger

On peut caractériser l'interaction entre l'ARNm et un oligonucléotide en la considérant comme une réaction chimique de complexation décrite par l'équation de réaction suivante :



Nous présenterons dans la sous section qui suit notre protocole de complexation des oligofluorophores sur l'ARN messenger puis nous présenterons les paramètres thermodynamiques de cette réaction pour mieux comprendre quels sont ceux qui jouent un rôle dans la stabilité du complexe ARNm-oligonucléotides. Ces paramètres identifiés, nous décrirons les actions mises en œuvre pour améliorer la stabilité thermodynamique de façon efficace.

3.3.2 Protocole d’hybridation et formation du complexe ARN/oligos

Après avoir préparé la surface de l’échantillon par une étape de chimie de surface, l’étape clé d’accroche des sondes fluorescentes sur l’ARNm est l’étape dite d’hybridation. C’est pendant cette étape que les éléments isolés constitutifs de notre système rapporteur (ARNm, sondes fluorescentes, oligo-biotinylé) vont être associés pour former un système prêt à être traduit.

5 μ l d’ARN messenger (1 μ M)

2 μ l oligo-fluorophore rouge (10 μ M)

2 μ l oligo-fluorophore vert (10 μ M)

0,5 μ l oligonucléotide biotinylé (10 μ M)

0,5 μ l tampon T4DNA ligase

10 μ l d’hybridation mère

Les éléments sont ajoutés à des concentrations initiales autour du μ M pour favoriser la formation des différents complexes. L’ajout d’un tampon appelé T4DNA ligase apporte les concentrations salines nécessaires pour que l’hybridation soit efficace. Le mélange est ensuite placé 5 min à 68 °C, 5 min à 37 °C et 5 min dans la glace à 4 °C. Chauffer à haute température permet de bien séparer toutes les espèces en solution. L’association se fait ensuite progressivement à plus basse température.

Une fois l’hybridation réalisée, il nous faut diluer cette solution. La molécule unique impose de travailler avec des concentrations de l’ordre du nM. L’hybridation mère est donc beaucoup trop concentrée. On réalise une première dilution dans un tampon, appelé tampon B, au 1/100ème qui sera elle-même diluée environ 20 fois dans ce même tampon pour la solution finale injectée dans la cellule microfluidique. L’ultime dilution peut-être ajustée en fonction de la concentration de la solution d’ARN messenger qui peut légèrement varier autour de 1 μ M.

L’étape d’hybridation est la pierre angulaire de notre protocole pour obtenir une bonne couverture et la stabilité thermodynamique tant recherchée. Mais c’est une étape qui était très optimisée dès mon arrivée en thèse. Nous avons constaté que nous avions peu de marge de manœuvre sur cette étape pour améliorer notamment la stabilité des marqueurs. Le moindre changement dans la réalisation de l’hybridation mère implique une variation très importante du comportement thermodynamique de nos systèmes. Ce n’est donc pas l’étape qui laisse la plus grande amplitude pour des améliorations plus subtiles. De fait, ce protocole est resté inchangé car tout à fait satisfaisant tout au long de ce projet de thèse.

Pour déterminer les paramètres intrinsèques au système ou extérieurs qui jouent un rôle dans la stabilisation de l’hybridation, il faut comprendre les paramètres thermodynamiques qui régissent la formation du complexe ARNm-oligonucléotides.

3.3. Stabilité thermodynamique des ARNm et des oligo-fluorophores

3.3.3 Rappels des lois thermodynamiques régissant la formation du complexe ARNm-oligonucléotides

3.3.3.1 Paramètres thermodynamiques

L'équilibre décrit dans l'équation 3.3 a été beaucoup étudié en biologie notamment pour déterminer la stabilité de structures secondaires doubles brins sur l'ARNm telles que celles impliquées dans le FS-1 présentées au chapitre 1. Deux grandeurs caractérisent particulièrement la thermodynamique de l'équilibre 3.3 : la température de fusion T_m et l'enthalpie libre ΔG_0 . L'enthalpie libre exprimée par les biologistes en kcal/mol est l'énergie à fournir par unité de matière pour défaire la séquence double-brin considérée. Ces grandeurs sont reliées l'une à l'autre par le système d'équations suivant :

$$\Delta G_0 = \Delta H_0 - T \Delta S_0 \quad (3.4)$$

$$T = \frac{\Delta H_0}{\Delta S_0 + R \ln\left(\frac{[\text{ARN}][\text{Oligo}]}{[\text{Complexe}]}\right)} \quad (3.5)$$

$$\Rightarrow T_m = \frac{\Delta H_0}{\Delta S_0 + R \ln\left(\frac{[\text{ARN}]_{\text{init}}}{2}\right)} \quad (3.6)$$

avec R la constante des gaz parfaits, et T la température. La température de fusion est par définition la température pour laquelle la moitié des oligos sont hybridés à leur complémentaire. Dans ce cas on peut écrire : $[\text{ARN}] = [\text{Oligo}] = [\text{Complexe}] = \frac{[\text{ARN}]_{\text{init}}}{2}$ pour des concentrations initiales en ARNm et en oligos supposées égales. On a alors

L'enthalpie standard de formation ΔH_0 et l'entropie standard de formation ΔS_0 qui interviennent dans ce système d'équation dépendent de la séquence nucléotidique choisie et des conditions de salinité. Plusieurs approches sont alors possibles. Il est possible de mesurer le T_m d'une séquence donnée en utilisant ses propriétés d'hyperchromicité. Lorsque les séquences doubles-brins ARN-ARN sont soumises à une dénaturation (perte de leur structure double-brin) leur absorption dans l'UV augmente. On peut donc mesurer le taux d'absorption en fonction de la température imposée au système. Ces courbes appelées courbes de dénaturation donnent accès au T_m pour une séquence donnée dans des conditions de salinité données, ce qui permet de remonter à l'entropie et l'enthalpie standard, puis par le biais de l'expression (3.4), à l'enthalpie libre du système pour une température T .

Une autre approche, théorique cette fois, se base sur un modèle dit du plus proche voisin qui part de l'idée que la stabilité d'une paire de base dépend de l'identité et de l'orientation spatiale des paires de bases voisines. Ce modèle s'appuie sur une bonne correspondance des valeurs calculées avec celles obtenues par la méthode précédente des courbes de fusion. A partir de ce modèle, des études [von Ahsen 2001, Chen 2012] parviennent à calculer les valeurs de ΔS_0 et ΔH_0 pour les différentes paires de bases dans des conditions de température et de salinité fixées. Par exemple pour une des séquence utilisée pour nos travaux, AAA GAG UUC AGC AGU, on trouve $\Delta S_0 = -1,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$ et $\Delta H_0 = -579 \text{ kJ.mol}^{-1}$. En utilisant les valeurs théoriques de l'entropie standard et de l'enthalpie standard, on peut, en considérant l'équation réciproque

de (3.5), retracer l’évolution théorique du ratio d’oligos déshybridés en fonction de la température pour différentes séquences d’oligos. Cette évolution est illustrée sur la figure 3.10 (les concentrations initiales en oligos et en ARNm sont toujours considérées comme identiques).

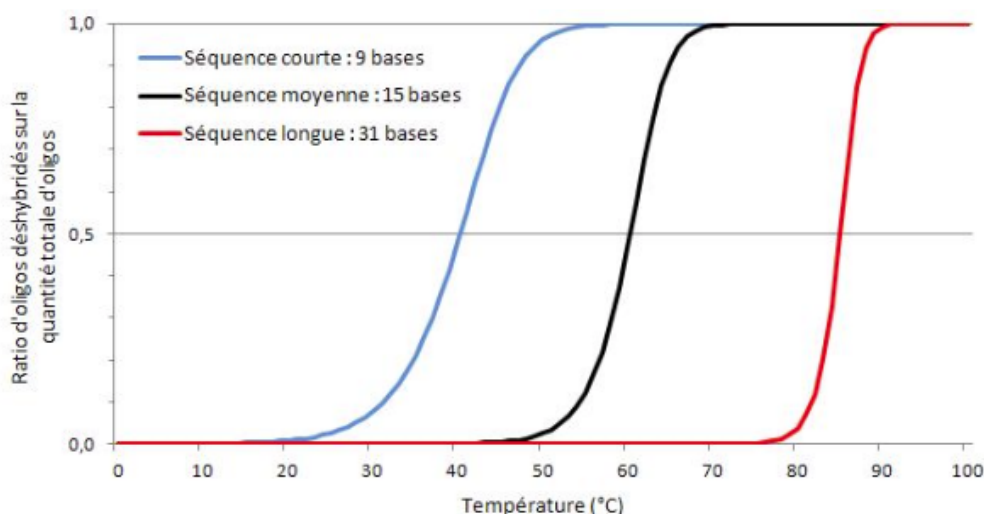


FIGURE 3.10 – Figure issue des travaux de thèse de Nicolas Fiszman [Fiszman 2013]. Courbes de déshybridation théoriques de différentes séquences d’oligonucléotides en fonction de la température.

3.3.3.2 Importance de la séquence choisie et dépendance en température

Comme le montrent les courbes théoriques représentées sur la figure 3.10, la stabilité des oligonucléotides dépend avant tout de deux paramètres : la température et la séquence des oligos (longueur et nature des nucléotides). Ces dépendances sont directement retranscrites dans les grandeurs principales qui caractérisent l’équilibre thermodynamique du système :

- la température de fusion T_m qui correspond à une température critique au dessous de laquelle il faut se placer pour s’assurer de la stabilité de nos marqueurs,
- l’enthalpie standard de formation ΔH_0 et l’entropie standard de formation ΔS_0 , qui dépendent directement de la nature de la séquence étudiée.

Choisir judicieusement la séquence de nos oligonucléotides et contrôler précisément la température de nos échantillons est donc primordial pour limiter l’instabilité des marqueurs.

3.3.3.3 Dépendance de la concentration initiale en ARNm et marqueurs

En plus d’être dépendante de la séquence choisie, l’équation 3.6 montre bien que la valeur de T_m dépend de la concentration initiale en ARNm et en oligonucléotides.

Il est fréquent dans la littérature de considérer que cette dépendance inscrite dans le terme $R \ln \left(\frac{[ARN]_{init}}{2} \right)$ est négligeable, puisque la composante ci-dessous est petite devant le terme

3.3. Stabilité thermodynamique des ARNm et des oligo-fluorophores

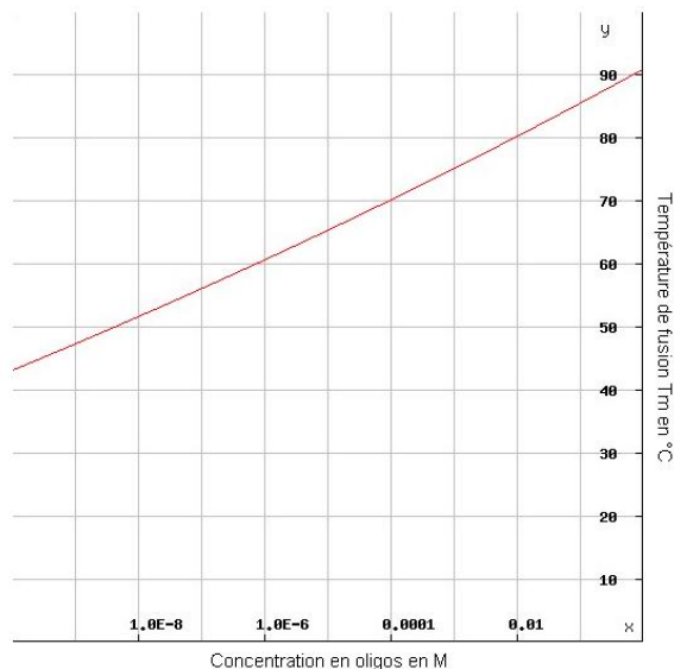


FIGURE 3.11 – Figure issue des travaux de thèse de Nicolas Fiszman [Fiszman 2013]. Évolution théorique de la température de fusion T_m en fonction de la concentration initiale en espèces (ARNm et oligo-nucléotides).

ΔS_0 . Effectivement pour la séquence décrite, diluer 10 fois ne fait varier le T_m que de 5°C . Seulement, nous travaillons à l'échelle de la molécule unique et sommes donc amenés à diluer un grand nombre de fois les solutions. Le rinçage dans la cellule micro-fluidique des particules non fixées contribue à diluer encore plus fortement le milieu dans lequel l'équilibre (3.3) est étudié. Aussi on ne peut négliger la dépendance en concentration du T_m . Cette dépendance est représentée sur le graphique 3.11.

On constate une variation importante de T_m avec la concentration initiale en oligos dans le milieu. Il est tout à fait différent de travailler avec des concentrations mM et les concentrations mises en jeu en molécule unique. C'est un effet qu'il nous faut prendre en compte pour évaluer la stabilité de nos marqueurs en conditions réelles d'expérience.

3.3.3.4 Autres facteurs et limitations du modèle proposé

Il est important de noter que les données quantitatives qui précèdent sont établies à partir d'un modèle théorique qui a ses limites. Les valeurs calculées de ΔH_0 et ΔS_0 le sont pour des liaisons ADN-ADN et sans prendre en compte certains paramètres physicochimiques tel que la concentration en ions Na^+ ou Mg^{2+} . On peut comparer les résultats de plusieurs études qui réalisent des hypothèses de départ différentes.

Comme le montre la figure 3.12 qui récapitule les conclusions de ces études, **un écart de notable de plusieurs degrés sur la température de fusion est observable selon les**

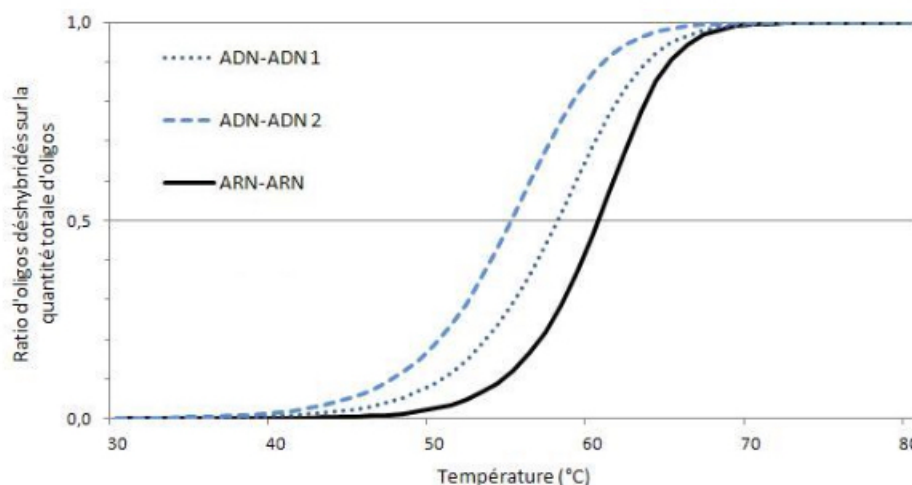


FIGURE 3.12 – Figure issue des travaux de thèse de Nicolas Fiszman [Fiszman 2013]. Courbes de déshybridation théoriques pour différents types d’hybridations en fonction de la température. Ces courbes théoriques sont issues des travaux de [SantaLucia 1996, Breslauer 1986, Chen 2012].

hypothèses du modèle et sa mise en œuvre. La courbe en tirets bleus (1) correspond à des liaisons ADN-ADN selon [SantaLucia 1996], celle en pointillés bleu ciel (2) à des liaisons ADN-ADN selon [Breslauer 1986], celle en noir à des ARN-ARN selon [Chen 2012], et ce pour des conditions expérimentales comparables. Il est donc nécessaire de garder un œil critique sur les valeurs théoriques du T_m qui nous donne une indication sur la stabilité potentielle de nos marqueurs fluorescents mais ne nous garantit pas d’être totalement prémunis des départs spontanés.

3.3.4 Pistes d’amélioration de la stabilité thermodynamique

3.3.4.1 Amélioration de la stabilité : allongement de la séquence de l’oligo

En se basant sur les considérations thermodynamiques présentées dans le paragraphe précédent, on peut choisir judicieusement la séquence de l’oligonucléotide adaptée à nos conditions d’expérience. Il est clair au vu de la figure 3.10 qu’il faut choisir une séquence suffisamment longue pour que la température de travail de $T=30^\circ\text{C}$ soit bien inférieure au T_m de l’oligo et ce, pour les concentrations molaires utilisées. On voit par exemple sur la figure 3.10 qu’une séquence de 9 bases a un T_m trop faible pour qu’on puisse envisager une accroche stable à 30°C . En réalité deux séquences d’oligonucléotides ont été utilisées pour la réalisation de nos expériences.

Chronologiquement la première séquence choisie présentée dans la section précédente comportait 12 nucléotides hybridés (cf. figure 3.9). Son T_m théorique est évalué à 38°C ⁶. Si on prend en compte la concentration finale de nos marqueurs qui est de l’ordre du nanomolaire, T_m passe à 31°C . Notre température de travail (30°C) est proche, ce qui peut poser, en théorie du moins, des problèmes. En pratique, nous devons vérifier expérimentalement la stabilité de

6. $\pm 2^\circ\text{C}$ en fonction des logiciels utilisés.

3.3. Stabilité thermodynamique des ARNm et des oligo-fluorophores

l'hybridation. Nous avons effectivement été confrontés à des problèmes de départs spontanés, en particulier quand on se trouve dans l'extrait cellulaire où les conditions physico-chimiques varient du tampon B.

Nous avons alors choisi d'utiliser une séquence rallongée de 3 nucléotides. On constate sur la figure 3.10 que plus la séquence est longue, moins la variation de température impacte la stabilité du complexe, la courbe pouvant être assimilée à un échelon variant sur quelque degrés d'un état hybridé à un état déshybridé. Le T_m théorique est alors autour de 42 °C, soit 34 °C après dilution. C'est donc une piste intéressante pour améliorer la stabilité du complexe qui nous intéresse.

Résultats des tests avec des oligonucléotides rallongés Nous avons testé la stabilité des oligonucléotides court et long à la fois dans le tampon B utilisé pour réaliser l'hybridation et dans l'extrait cellulaire.

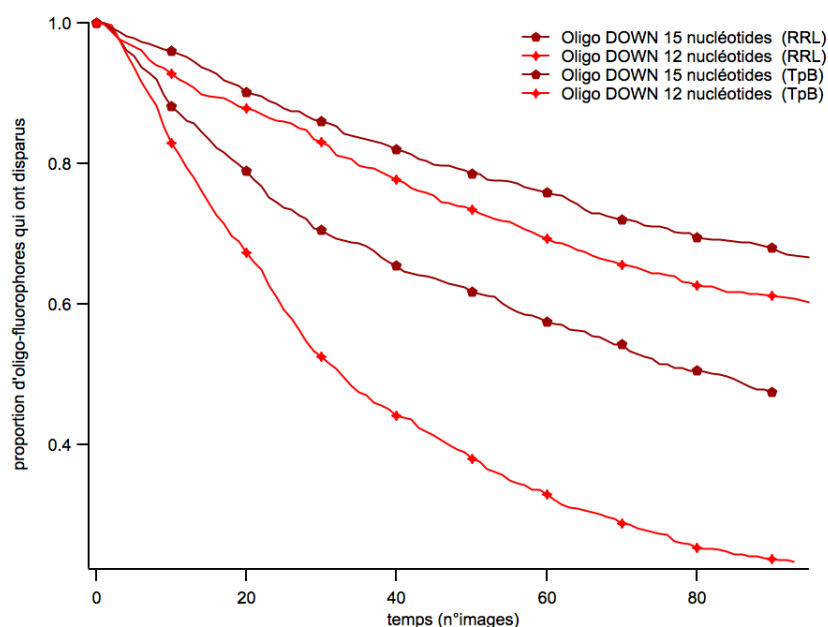


FIGURE 3.13 – Courbes de départs cumulés pour l'oligofluorophore DOWN(R). On compare ici des acquisitions de films classiques avec les oligonucléotides (12 nucléotides) ou allongés (15 nucléotides). Ces tests sont réalisés dans le tampon B (courbes marquées par des pentagones) et le RRL (courbes marquées par des losanges), l'ensemble des autres paramètres expérimentaux étant identique.

Ces tests ont été réalisés sur un ARNm pour lequel il ne peut pas y avoir de traduction. On constate sur les courbes cumulées de la figure 3.13 que pour cet ARNm les sondes fluorescentes avec un oligonucléotide plus long partent nettement moins au cours du temps que celles avec un oligonucléotide plus court et ce, dans le tampon ayant une salinité identique à celle de l'extrait cellulaire. Les fluorophores étant les mêmes dans les deux cas, on peut supposer que la durée de vie avant photoblanchiment est la même quelle que soit la longueur de l'oligonucléotide. Il ne reste donc que la stabilité thermodynamique comme facteur pouvant provoquer le départ des sondes. L'écart observé entre les cinétiques indique clairement qu'augmenter la longueur des

Chapitre 3. Mise en œuvre d’une expérience d’étude de la cinétique en molécule unique

oligonucléotides stabilise l’hybridation de ceux-ci sur l’ARN messager dans le tampon B et dans le RRL.

Considération énergétique : détachement des oligos par le ribosome Augmenter la séquence de l’oligo nous a permis d’améliorer la stabilité de celui-ci, mais en ce cas, pourquoi ne pas choisir simplement l’oligo le plus long possible ? Ici intervient un compromis qui a déjà été abordé lors de la description du principe de l’expérience. S’il est important que l’oligo soit stable, il est primordial que le ribosome soit en mesure de le détacher, et ce sans que sa cinétique soit trop affectée. Aussi allonger l’oligo c’est ajouter une difficulté énergétique supplémentaire pour le ribosome.

La grandeur qui permet d’évaluer le coût énergétique que représente l’ouverture de la séquence double-brin pour le ribosome est l’enthalpie libre ΔG_0 . Plus l’enthalpie libre est importante, plus la séquence est stable et difficile à ouvrir pour le ribosome.

Les travaux de [Chen 2013] ont comparé différentes structures secondaires (par nature plus stables que nos duplexes ARNm/oligonucléotides) et déterminé selon leur stabilité l’impact de ces structures sur la cinétique du ribosome. Les résultats de cette étude peuvent être résumés dans le tableau 3.1.

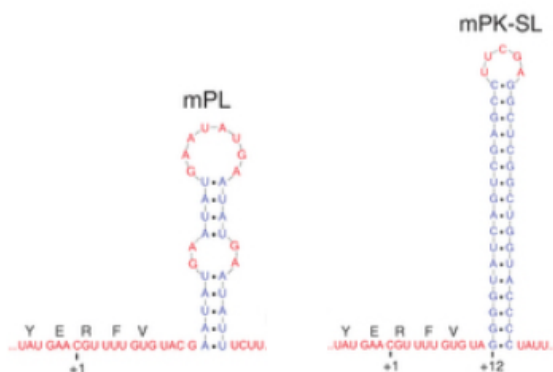


FIGURE 3.14 – Structures secondaires étudiées dans l’article de [Chen 2013].

structure	ΔG_0 (kcal/mol)	impact cinétique (%)
mPL	- 5,6	référence
mPK-SL	- 37.1	40%
mSL-15	- 42,6	76%

TABLE 3.1 – Table récapitulant les mesures de l’impact cinétique des structures secondaires étudiées par [Chen 2013] sur la cinétique du ribosome en fonction de leur stabilité thermodynamique.

Nous avons calculé à l’aide d’un logiciel spécialisé (mFold) l’énergie libre de nos structures doubles brins ARN-ARN : $\Delta G_0 = -18$ kcal/mol. La comparaison avec les structures étudiées

3.3. Stabilité thermodynamique des ARNm et des oligo-fluorophores

dans l'article de [Chen 2013] nous donne un ordre de grandeur de l'impact de la structure sur la cinétique du ribosome : entre 0 et 20% de ralentissement. Bien que cet impact soit non négligeable et implique une légère sous-estimation de la vitesse de traduction réelle, nous considérons qu'il sera inclus dans les barres d'erreur de notre mesure cinétique.

3.3.4.2 Optimisation des cycles de température

Amélioration du système de contrôle en température de l'échantillon sur le microscope Assurer une stabilité thermique maximale est essentiel pour limiter les départs spontanés des marqueurs fluorescents. Nous avons constaté que le premier porte échantillon (cf. chapitre 2, figure 2.13) parvenait à maintenir la température de l'échantillon à la température de consigne la majorité du temps mais il arrivait qu'il soit nécessaire d'isoler la plaque de cuivre de la platine métallique avec un isolant. Nous avons fait l'essai avec simplement un bout de papier, puis pour assurer une meilleure isolation nous avons tenté de couvrir le dessous de la plaque de cuivre avec du papier téflon. Malgré cela, le système était parfois très long à se stabiliser et il pouvait ponctuellement échouer totalement à thermaliser l'échantillon.

Face à cette difficulté, nous avons modifié le design de cet élément grâce à l'aide de l'atelier de mécanique du Laboratoire Charles Fabry qui a imaginé et fabriqué en fonction de nos besoins un nouveau porte-échantillon incluant un module Peltier. Nous avons ajouté à nos critères de stabilité thermique une autre exigence, celle d'avoir un meilleur maintien mécanique de l'échantillon sur le porte échantillon. Nous avons en effet constaté à plusieurs reprises des dérives latérales sur nos images, que nous pensions être dues à une dérive mécanique de l'échantillon pendant l'acquisition. Le schéma du dispositif est présenté sur la figure 3.15 ci-dessous.

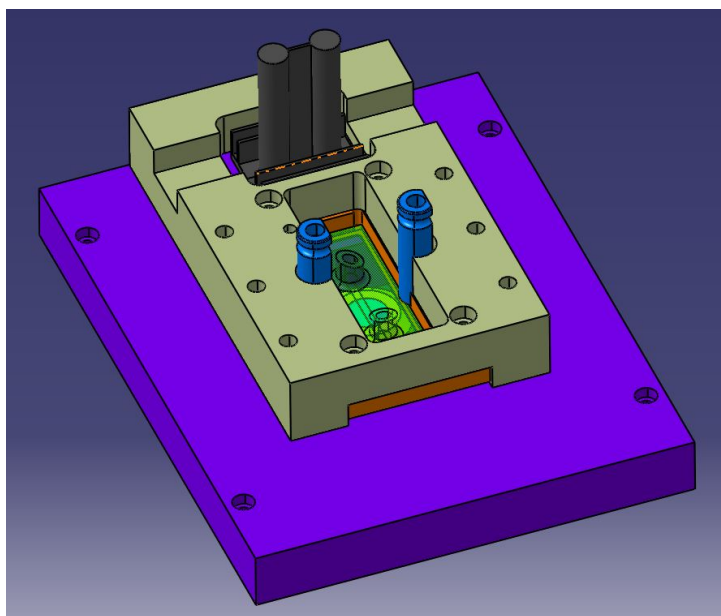


FIGURE 3.15 – Schéma fait avec le logiciel SolidWorks (réalisé par André Guilbaud responsable de l'atelier de mécanique du LCF) descriptif du nouveau porte échantillon incluant un module Peltier.

Chapitre 3. Mise en œuvre d’une expérience d’étude de la cinétique en molécule unique

On retrouve le module Peltier qui chauffe l’échantillon, couplé à un radiateur (en noir). La zone de contact a été définie pour assurer un bon contact thermique avec l’échantillon mais en prenant en compte le diamètre du nouvel objectif à $ON=1.49$, plus large que le précédent, afin de ne pas gêner l’amplitude de son mouvement lors des réglages. L’échantillon est maintenant maintenu par deux vis à ressorts. Il est parfaitement immobile dans le porte-échantillon une fois qu’elles sont en place. La partie blanche, en téflon, qui est ensuite fixée sur la platine de nano-positionnement (matérialisée par la plaque violette) sert à isoler thermiquement l’échantillon et la plaque de cuivre de cette platine métallique. Comme avec l’ancien système, la température est régulée par une boucle de rétroaction électronique, mise au point par Frédéric Moron, du service électronique du LCF.

Une fois le réglage de régulation effectué, on a pu constater que ce nouveau système permettait de chauffer l’échantillon à la température souhaitée au bout de seulement quelques minutes. Jusqu’à aujourd’hui nous n’avons plus rencontré de difficulté due à une défaillance de ce système. **Couplé au système de chauffage de l’objectif, il assure une température homogène sur l’échantillon et une grande stabilité thermique, appréciable pour réaliser nos expériences où de nombreux paramètres sont critiques pour limiter les instabilités thermodynamiques.**

Protocole de préparation de l’échantillon Avant injection dans la cellule fluide la dilution finale de l’hybridation est pré-chauffée à 30°C . Cette étape intermédiaire a initialement un rôle biologique bien précis. Les premières expériences de traduction en molécule unique étaient réalisées avec des ribosomes pré-attachés sur l’ARN messager. Ces ribosomes attendent alors seulement l’arrivée de l’extrait cellulaire pour commencer à traduire. La complexation des ribosomes était réalisée en ajoutant à la dilution finale de l’hybridation une solution de sous-unités ribosomiques 60S et 40S séparées et en incubant ce mélange 10 min à 37°C avant l’injection et l’observation.

Nous détaillerons dans un chapitre ultérieur notre choix de réaliser des expériences sans pré-incuber de ribosomes, simplement en laissant les ribosomes du RRL s’initier tous seuls. L’étape de complexation des ribosomes a donc évolué vers un autre usage lorsque nous avons cessé de les pré-attacher. La dilution finale de l’hybridation est simplement chauffée seule.

Nous appliquons initialement le même protocole que précédemment en chauffant 10 min à 37°C . Notre hypothèse consistait à dire que les systèmes les moins bien hybridés et donc les plus instables se détacheraient pendant cette étape de chauffe. Nous observions une couverture moins importante, mais les systèmes accrochés en surface étaient visiblement plus stables.

Au fur et à mesure que nous trouvions des éléments supplémentaires pour stabiliser l’hybridation des marqueurs sur l’ARN messager (choix de nouveaux oligo-nucléotides, stabilisation de la température de l’échantillon, optimisation des tampons...), nous avons adapté le temps d’incubation et la température de chauffe de cette étape intermédiaire. Aujourd’hui la dilution finale est chauffée 2 min à 30°C avant injection dans la cellule. On limite ainsi les chocs thermiques éventuels lorsqu’on injecte le RRL, lui-même pré-chauffé à 30°C , dans la cellule. **Il est important de préciser que cette étape est l’un des curseurs à notre disposition pour adapter finement notre protocole aux conditions de nos expériences.** C’est un paramètre qui a beaucoup varié et qui peut encore beaucoup varier avec l’évolution de nos expériences et des

3.4. Expérience réelle : bilan

enjeux biologiques. Loin d'être une recette immuable notre protocole évolue perpétuellement sur la base d'observations empiriques pour s'adapter à chaque nouvelle problématique.

3.3.4.3 Optimisation d'un tampon de rinçage pour limiter le choc salin

Les systèmes rapporteurs baignent initialement dans le tampon B dont les concentrations salines ont été optimisées pour maximiser la stabilité des marqueurs. Seulement lorsque l'on injecte le RRL dans la cellule microfluidique, les concentrations salines de ce nouveau milieu sont différentes et le passage rapide d'un milieu à l'autre peut provoquer un choc salin qui déstabilise les marqueurs fluorescents accrochés à la surface. Cet effet provoque le départ prématuré des marqueurs au moment même où l'on est en train de réaliser nos acquisitions.

On ne peut modifier la composition du RRL qui est lui-même optimisé pour que la traduction soit la plus efficace possible. A la place on réalise un tampon, appelé Tampon B-RRL dont les concentrations salines sont identiques à celles du RRL. On injecte dans la cellule ce tampon juste avant l'injection du RRL et le début de l'acquisition. Ainsi les marqueurs fluorescents déstabilisés par la différence de concentrations se détachent avant l'acquisition, et ne restent en surface que les marqueurs les plus stables, qui seront ceux observés au cours du film. Ce faisant, on limite le bruit de mesure dû aux départs spontanés.

3.4 Expérience réelle : bilan

3.4.1 Amélioration de la stabilité et du rapport signal/bruit

Nous avons décrit dans la première partie de ce chapitre les modifications apportées au dispositif expérimental dans le but d'assurer une meilleure stabilité vis à vis de certains paramètres extérieurs et d'améliorer le rapport signal/bruit.

- Notre dispositif expérimental est très stable dans le temps. Nous pouvons interrompre nos expériences et les reprendre plusieurs semaines après selon les besoins, sans que les réglages optiques, thermiques et mécaniques ne soient affectés. Au cours d'une journée d'expérience les réglages optiques, le maintien de la mise au point et la rétroaction en température fonctionnent de façon optimale sans que l'on ait besoin d'intervenir. Nous avons acquis durant mon doctorat un vrai confort dans la réalisation de nos expériences.
- L'amélioration des sources laser et le changement de l'objectif de microscope nous ont permis d'améliorer notre rapport signal/bruit en particulier en présence de l'extrait cellulaire. Le réglage de l'onde évanescente est stable dans le temps et peut être optimisé indépendamment pour chaque source d'excitation.
- Concernant le photoblanchiment, l'usage de marqueurs protégés n'a pas apporté d'amélioration majeure. Le bilan de ce test est mitigé. Après plusieurs essais dans des conditions expérimentales différentes, nous ne sommes pas parvenus à une conclusion tranchée.

3.4.2 Caractéristiques de l’échantillon réel

3.4.2.1 Couverture et colocalisations

L’échantillon réel, celui que nous observons dans le quotidien de nos expériences n’est bien sûr pas un échantillon idéal selon les trois critères présentés plus tôt mais il présente des performances toutefois satisfaisantes. Sur une journée d’acquisition nous analysons généralement entre 6 et 12 échantillons.

N ° échantillon	$N_{\text{tot}}(\text{V})$	$N_{\text{tot}}(\text{R})$	colocalisations(%)
1	425	657	44%
2	583	509	52%
3	628	1067	56%
4	556	774	52%
5	796	1118	61%
6	423	687	53%
Total	3411	4812	53%

TABLE 3.2 – Exemple de données quantitatives pour 6 échantillons concernant la couverture dans le vert ($N_{\text{tot}}(\text{V})$), le rouge ($N_{\text{tot}}(\text{R})$) et le taux de colocalisations.

Le tableau 3.2 donne l’exemple de quelques échantillons pris dans des conditions expérimentales homogènes (même hybridation mère, même protocole expérimental, mêmes paramètres optiques) et des chiffres associés correspondant aux couvertures et au pourcentage de colocalisations pour ce jeu de données.

On constate que la couverture est variable d’un échantillon à un autre, et pas toujours idéale. Mais si l’on totalise l’ensemble des échantillons, on obtient tout de même une statistique sur plusieurs milliers de systèmes différents, ce qui est significatif. Le taux de colocalisations est stable sur l’ensemble des échantillons du jeu de données. En fait, ce paramètre est plutôt dépendant de la nature de l’ARN messenger. Si celui-ci n’est pas dégradé, on obtient des taux de colocalisations majoritairement supérieurs à 50% pour tous les ARNm testés. Pour certains ARNm nous sommes parvenus à des taux de colocalisation de 70%.

3.4.2.2 Expériences de mutagenèse : spécificité de l’accroche

Pour s’assurer que ce que l’on observe sur nos images correspond bien à des marqueurs fluorescent hybridés à des positions précises de l’ARN messenger, on réalise une expérience de mutagenèse. Il s’agit simplement de muter séparément les sites d’appariement (UP et DOWN) de l’oligo-fluorophore rouge et de l’oligo-fluorophore vert. La mutation consiste à changer la séquence de l’un de ces sites en sa séquence complémentaire pour que l’accroche des sondes fluorescentes sur l’ARNm ne soit plus spécifique.

On enregistre des images pour un ARNm classique ainsi que pour les ARNm mutés respectivement au site UP et au site DOWN. La figure 3.16 ci-dessous montre les observations associées à ce test. Le résultat de cette expérience est sans appel. Pour le cas où l’on a muté le site UP sur l’ARNm, on n’observe tout simplement aucune accroche des marqueurs R-UP sur la

3.4. Expérience réelle : bilan

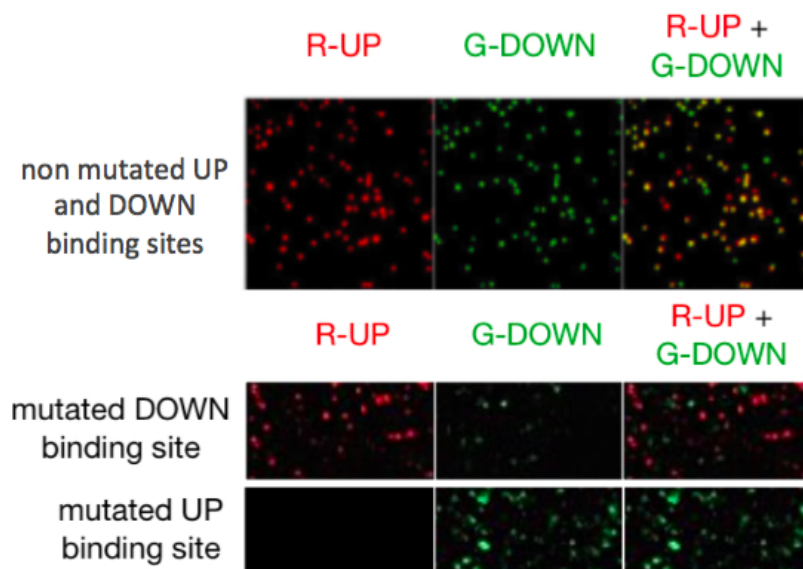


FIGURE 3.16 – Expérience de mutagenèse sur les sites d’accroche des oligo-fluorophores. En haut, accroche et colocalisations lors d’une expérience classique. En bas, accroche et colocalisation lorsque l’on mute successivement chacun des sites (images du haut : mutation du site UP, images du bas : mutation du site DOWN)

surface (seulement 5 à 6 points observables sur la zone). Le constat est plus mitigé lorsque l’on teste l’ARNm muté au site DOWN. Une cinquantaine de particules sont présentes en surface. Seulement, ces particules sont aussi présentes si l’on observe une zone avant d’injecter les systèmes rapporteurs. Le bruit de fond dans le vert est plus important que dans le rouge à cause de la fluorescence parasite de la lamelle de verre. Par ailleurs, les particules observées ne sont pas colocalisées avec les marqueurs fluorescents rouges (seulement 2% de colocalisations pour l’échantillon) et sont très instables. On peut les voir apparaître et disparaître à l’échelle de la dizaine de secondes. Aussi on peut conclure que quand l’on observe des échantillons avec plusieurs centaines de particules présentes en surface dans les deux couleurs et des taux de colocalisations autour de 50%, on est bien dans le cadre d’une accroche spécifique et stable de nos marqueurs fluorescents sur l’ARN messager.

3.4.2.3 Stabilité des marqueurs à l’issue des améliorations réalisées

L’action sur les différents paramètres thermodynamiques a permis de réduire notablement l’instabilité des sondes fluorescentes. L’étape de pré-chauffage de l’hybridation a contribué à réduire les départs spontanés dans le tampon B. L’utilisation d’un tampon de rinçage a contribué à diminuer la déstabilisation des sondes fluorescentes au moment de l’injection du RRL. Mais l’élément qui a apporté le plus grand gain en terme de stabilité est l’utilisation des oligonucléotides allongés (15 nucléotides contre 12 auparavant), qui a eu un impact positif important, tant dans le tampon B que dans l’extrait cellulaire RRL.

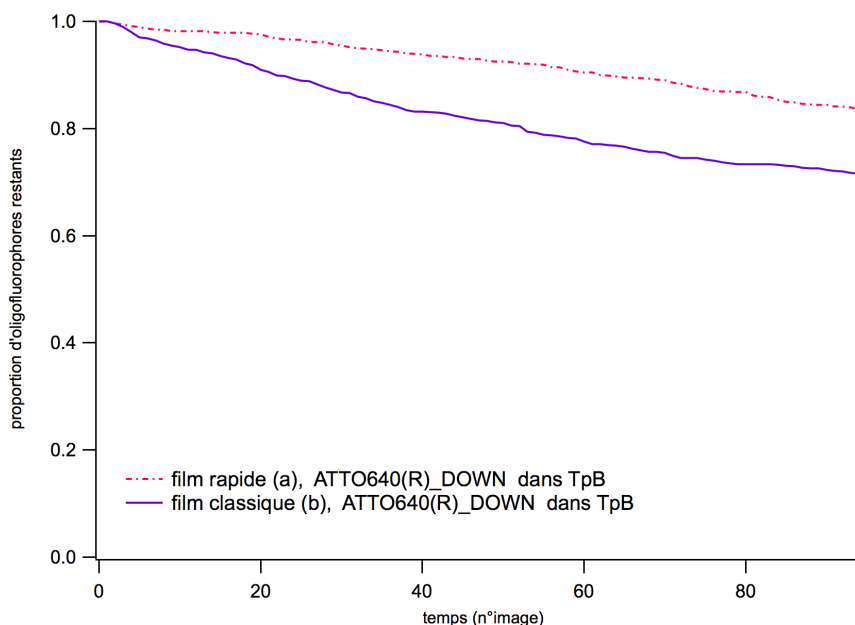


FIGURE 3.17 – Courbes de départs cumulés dans le rouge correspondant à l’acquisition d’un film lent (pointillés) ou d’un film rapide (trait plein) dans le tampon B. Ces acquisitions récentes illustrent les performances atteintes en terme de stabilité thermodynamique des sondes fluorescentes.

La figure 3.17 présente des courbes de départs cumulés dans le tampon B acquises récemment et qui illustrent les gains en terme de stabilité obtenus grâce à l’ensemble de nos actions. La courbe en pointillés correspond à l’acquisition d’un film rapide et celle en violet à l’acquisition d’un film lent⁷, les autres conditions expérimentales étant identiques. On constate que la proportion de départs à un instant t pour le film lent est peu différente de celle pour le film rapide. Le photoblanchiment étant conservé entre ces deux acquisitions, cette faible différence est due à une faible proportion de sondes fluorescentes affectées par l’instabilité thermodynamique.

On peut donc conclure que, dans le tampon B, nous avons grandement réduit cette source de bruit à l’échelle de nos expériences. L’instabilité est plus importante lorsque nos marqueurs sont dans le RRL. Toutefois, nous sommes aussi parvenus à la diminuer grandement dans ce milieu. L’ensemble de ces améliorations a constitué un tournant dans nos expériences, la diminution importante des départs spontanés a permis de sortir de façon évidente le signal de traduction du bruit. Dans ces conditions, l’hybridation est suffisamment stable pour que nous n’ayons plus besoin de recourir à un tampon de rinçage.

7. cf. description des conditions d’acquisition des films rapides et lents dans la sous-section 3.2.3.2 de ce chapitre, page 94.

3.5 Conclusion

Ce chapitre récapitule l'un des deux aspects principaux de mon travail de thèse. Partant d'un dispositif et d'un protocole existant, nous nous sommes appliqués à étudier chaque aspect de l'expérience dans le but de l'optimiser. Nous avons été guidés à chaque pas par ce que l'expérience nous avait permis de définir comme l'expérimentation modèle. Celle-ci est caractérisée par un ensemble de paramètres physico-chimiques et biologiques que nous avons pu identifier et que nous avons essayé d'optimiser un par un avec les moyens d'actions à notre disposition.

En particulier nous sommes parvenus à réduire les deux principales sources de bruit en concurrence avec la traduction : l'instabilité thermodynamique et le photoblanchiment. En apportant des améliorations à notre dispositif optique nous sommes parvenus à diminuer grandement le photoblanchiment de nos marqueurs tout en améliorant notre rapport signal/bruit. Pour ce qui est des instabilités thermodynamiques, le choix de rallonger les oligonucléotides sur lesquels sont fixés les marqueurs fluorescents a été payant, puisque les départs dus à une instabilité sont désormais minoritaires lors d'une acquisition par rapport au photoblanchiment. En réduisant ainsi les sources de bruit de notre mesure, il nous est beaucoup plus facile d'acquérir et d'interpréter un signal puisque l'on est sûr qu'il est biologiquement significatif.

Nous avons au terme de cette démarche atteint des conditions de reproductibilité, de stabilité et de confort expérimental qui nous permettent désormais de nous concentrer sur les problématiques biologiques et leur difficultés inhérentes. C'est ce qui constitue le deuxième aspect de ma thèse : aller au delà d'une preuve de principe en posant de nouvelles questions biologiques à partir de nos acquis. Ce second objectif fera l'objet du chapitre qui suit.

Caractérisation de la traduction eucaryote initiée par une IRES : mise en lumière d'une cinétique à deux temps caractéristiques

Sommaire

4.1 Etude de la cinétique d'initiation et d'élongation	114
4.1.1 Cinétiques de départs cumulés : acquisition et évaluation de la variabilité	114
4.1.2 Cinétiques de départs : histogramme et départs instantanés	116
4.2 Etude de l'initiation par une IRES CrPV en présence de ribosomes pré-incubés	119
4.2.1 Système biologique	119
4.2.2 Une dynamique à deux temps : modélisation des courbes cinétiques	119
4.2.3 Interprétation biologique des temps caractéristiques longs et courts	124
4.3 Un second contrôle biologique : expériences avec les ribosomes du RRL	127
4.3.1 Description de l'ARNm	127
4.3.2 Courbes cinétiques avec les ribosomes du RRL	127
4.3.3 Comparaison des cinétiques des ribosomes endogènes et des ribosomes pré-incubés	129
4.3.4 Efficacité de reconnaissance et de traduction	129
4.4 Bilan : quelles conditions d'études choisir pour la suite du projet ? . .	131
4.5 Conclusion	132

Une fois les expériences réalisées et les données traitées, on a alors en notre possession une information cinétique à l'état brut qui doit être analysée et ajustée avec un modèle adéquat pour permettre une interprétation biologique. Nous exposerons dans ce chapitre un modèle permettant de décrire nos cinétiques de traduction et comment ce modèle aboutit à une conclusion biologique concrète sur l'interaction entre le ribosome et l'IRES CrPV utilisée pour initier la traduction.

Nous comparerons ensuite le comportement de deux types de ribosomes. Nos expériences sont initialement réalisées en pré-incubant des ribosomes purifiés à partir du RRL sur nos ARNm. Or l'extrait cellulaire RRL contient lui-même des ribosomes. Aussi, deux types de ribosomes sont en concurrence dans le milieu d'étude quand on réalise nos acquisitions, et ces deux populations sont indissociables au vu de nos cinétiques. Pour évaluer l'impact de la présence de ces ribosomes endogènes sur la cinétique, nous présenterons les résultats d'expériences où nous ne pré-attachons

pas de ribosomes sur l'ARNm. On observe alors exclusivement la cinétique des ribosomes du RRL.

4.1 Etude de la cinétique d'initiation et d'élongation

4.1.1 Cinétiques de départs cumulés : acquisition et évaluation de la variabilité

4.1.1.1 Principe de l'acquisition des courbes cinétiques : Expériences de contrôle

Nous avons exposé dans le chapitre 2 comment nous aboutissons à l'acquisition d'une cinétique de départ des sondes fluorescentes à partir d'une mesure expérimentale. Nous visualisons immédiatement après l'acquisition, cette cinétique sous la forme d'une courbe dite de départs cumulés $N(t)$ déjà présentées au chapitre 3. **On rappelle que ces cinétiques retracent le nombre de sondes fluorescentes encore présentes à l'instant t , en renormalisant par le nombre initial de sondes présentes sur l'échantillon.**

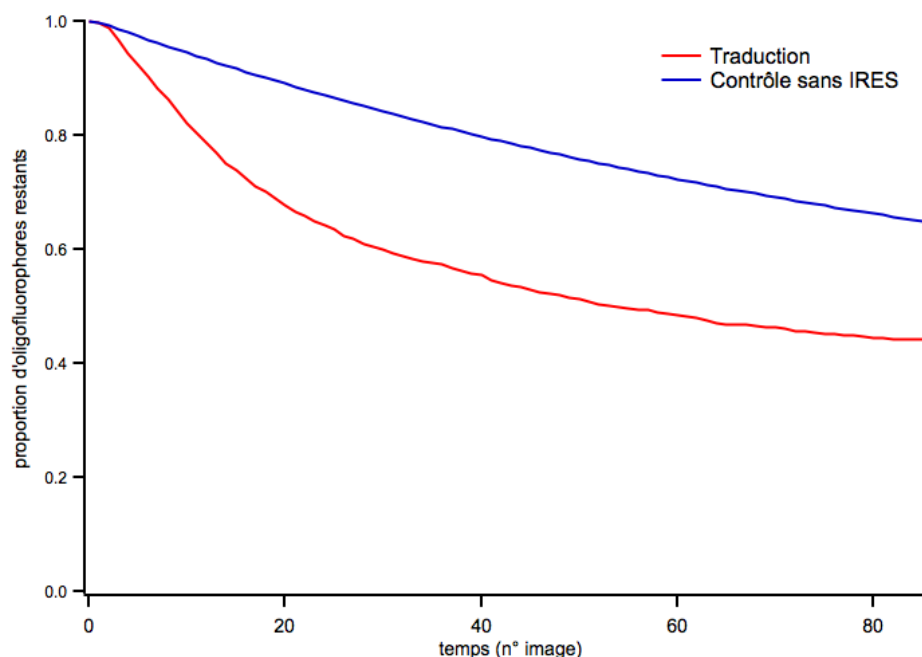


FIGURE 4.1 – Courbes de départs cumulés des oligofluorophores dans le rouge pour l'expérience de traduction (en rouge) et l'expérience de contrôle sans la structure IRES (en bleu).

Lors d'une mesure de la cinétique de traduction, les sources de bruit sont multiples. Même si nous sommes parvenus à réduire les événements non traductionnels, il reste toujours une part de ces événements dans les cinétiques de traduction. Pour évaluer et soustraire cette contribution et ainsi ne conserver que les départs dus à la traduction, nous réalisons une expérience de contrôle. Pour cela nous synthétisons un ARN messenger pareil en tout point à celui utilisé lors des premières expériences de traduction décrit au chapitre 1, dans la section 1.4.2.2, page 49

4.1. Etude de la cinétique d'initiation et d'élongation

à ce détail près que l'on supprime la structure IRES. Sans cette structure, les ribosomes ne peuvent pas s'initier sur l'ARN messager, il n'y a donc aucun évènement de traduction possible. Cette expérience contrôle nous permet de mesurer la cinétique de départ des évènements non traductionnels tels que le photoblanchiment et les départs spontanés¹. La cinétique de l'expérience de traduction $N^{exp}(t)$ sera par la suite renormalisée par la cinétique de l'expérience de contrôle $N^c(t)$ pour accéder à la cinétique des seuls évènements de traduction.

4.1.1.2 Variabilité de l'acquisition cinétique

Nous avons abordé dans le chapitre 3, l'importance dans notre étude d'accumuler une statistique suffisante. Si le nombre de systèmes biologiques sur un échantillon peut être optimisé à cet effet, il est nécessaire de dupliquer la même expérience plusieurs fois pour augmenter la statistique. En général pour une expérience sur un ARNm donné on reproduira au moins 3 fois la mesure. Il n'y a pas de maximum. Plus nous répliquons la mesure, meilleure sera notre statistique. Nos statistiques finales sont ainsi basées sur plusieurs milliers de systèmes biologiques traduits (entre 3000 et 10000 systèmes environ).

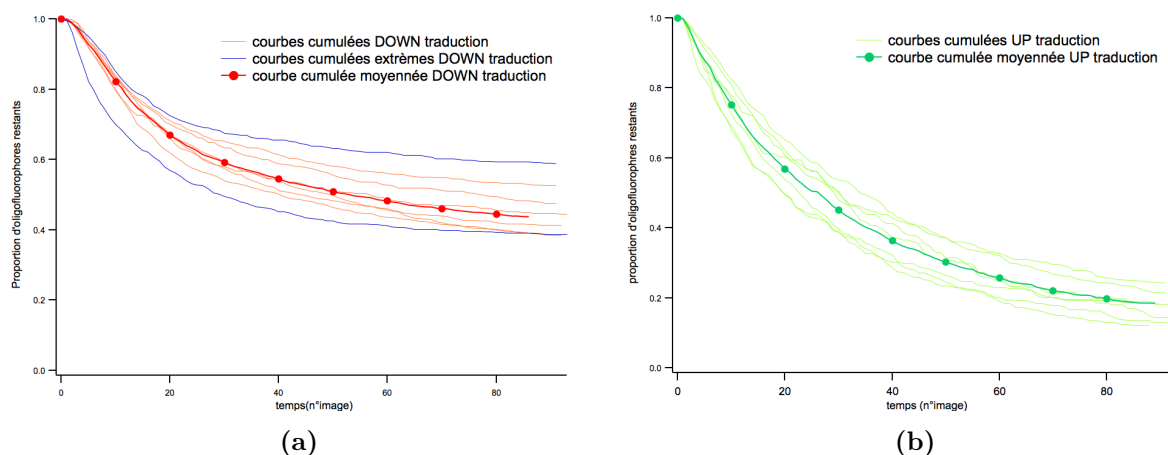


FIGURE 4.2 – (a) Ensemble des courbes de départs cumulés dans le rouge acquises sur une même journée d'expérience et dans des conditions expérimentales identiques. La courbe avec des marqueurs cercles est la moyenne pondérée de l'ensemble de ces acquisitions, mis à part les deux courbes bleues exclues car étant hors de notre intervalle de variabilité toléré. (b) Ensemble des courbes de départs cumulés dans le vert acquises sur une même journée d'expérience et dans des conditions expérimentales identiques. La courbe avec des marqueurs cercles est la moyenne pondérée de l'ensemble de ces acquisitions.

La figure 4.2 ci-dessus représente les courbes de départs cumulés de traduction acquises sur une journée d'expérience pour un même ARNm. La courbe marquée de cercles correspond à la moyenne pondérée de l'ensemble de ces acquisitions. **Mais pour que cette moyenne ait du sens, un paramètre important est celui de la variabilité de la mesure.** Les courbes

1. On peut noter que c'est cette expérience de contrôle qui a été utilisée lors des tests des fluorophores protégés et des oligonucléotides rallongés décrits respectivement dans les sections 3.2.3.2 et 3.3.4.1 du chapitre 3. Le contrôle sans IRES a été utilisé pour évaluer la part de départs dus spécifiquement aux départs spontanés et au photoblanchiment dans le RRL.

Chapitre 4. Caractérisation de la traduction eucaryote initiée par une IRES : mise en lumière d'une cinétique à deux temps caractéristiques

cumulées ne sont pas toutes confondues. Même si nous contrôlons précisément les paramètres expérimentaux, de petites variations de température, de salinité, de puissance,... peuvent induire une variabilité de la cinétique mesurée. Cette variabilité est inévitable et nous la tolérons dans la mesure où elle n'est pas trop importante. Mais au delà de cette variabilité intrinsèque à la nature de notre expérience, il arrive occasionnellement qu'une courbe cumulée soit très différente des autres courbes acquises dans les mêmes conditions expérimentales. On considère alors que cette forte variabilité reflète une variation non souhaitée d'un ou plusieurs des paramètres expérimentaux. On exclut dans ce cas volontairement ces acquisitions de nos échantillons statistiques.

Sur la figure 4.2, on peut voir un exemple de deux cas où la variabilité, mathématiquement représentée par l'écart type par rapport à la moyenne pondérée, est différente. Il s'agit d'une même journée d'expérience mais les courbes de la figure (a) correspondent aux départs dans le rouge et celles de la figure (b) aux départs dans le vert. On constate que l'écart type est plus important dans le rouge que dans le vert. L'écart type dans le rouge est trop important, on choisit dans ce cas de figure d'exclure de notre statistique les deux courbes extrêmes, représentées en bleu, pour éviter d'inclure des mesures non-représentatives dans notre échantillon statistique.

4.1.2 Cinétiques de départs : histogramme et départs instantanés

On ne peut pas interpréter directement les courbes de départs cumulés même si elles nous donnent une série de premières informations importantes. Pour aller plus loin, on regarde séparément l'ensemble des N_0^{UP} temps de départ T_i^{UP} dans le vert, l'ensemble des N_0^{DN} temps de départ T_i^{DN} dans le rouge, et les temps de départ T_i^{coloc} d'une sous-population de systèmes qui possèdent les deux marqueurs (particules colocalisées). On parlera dans ce cas de co-départs.

4.1.2.1 Analyse des instants de départ dans une couleur

Pour les départs dans chaque couleur individuellement, on analyse la distribution du nombre instantané de départs par image pour l'ensemble des particules détectées dans une couleur. Pour aboutir à cette distribution à partir de l'échantillon statistique des temps de départ dans une couleur extraits de l'analyse des films, on réalise trois opérations :

1. La première consiste à tracer les courbes de départs cumulés des expériences de traduction et de contrôle. Sur une série d'acquisitions, on réalise toujours la moyenne pondérée des courbes de départs cumulés pour les expériences de traduction et les expériences de contrôle. Ce sont ces courbes moyennes : $N_{moy}^{exp}(t)$ et $N_{moy}^c(t)$ qui seront considérées pour la suite de l'analyse.

2. On renormalise la moyenne pondérée des départs cumulés de l'expérience de traduction par la moyenne pondérée des départs cumulés de l'expérience de contrôle grâce à l'opération qui suit :

$$N^{trad}(t) = \frac{N_{moy}^{exp}(t) - N_{moy}^c(t)}{N_{moy}^c(t)}$$

La courbe renormalisée $N^{trad}(t)$ est illustrée en fushia sur la figure 4.3. Elle est logiquement plus bruitée que $N_{moy}^{exp}(t)$ et $N_{moy}^c(t)$. Si nécessaire, on peut aussi renormaliser $N_{moy}^{exp}(t)$ non pas par la moyenne pondérée des contrôles directement mais par un ajustement exponentiel de cette

4.1. Etude de la cinétique d'initiation et d'élongation

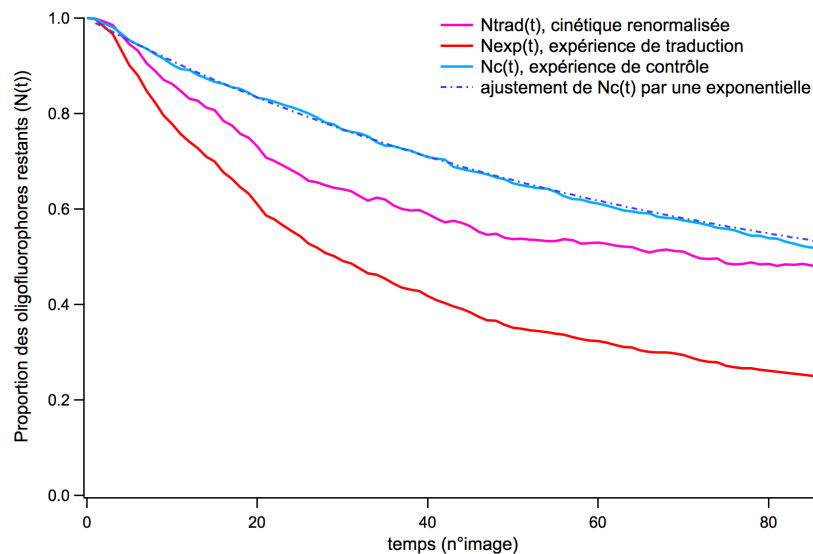


FIGURE 4.3 – Courbes de départs cumulés en fonction du temps pour une expérience de traduction (rouge), de contrôle (pointillés bleus avec en trait plein bleu son ajustement exponentiel) en fonction du temps. La courbe renormalisée est indiquée en fushia.

comme visible sur la figure 4.3 (courbe en pointillés). Cela permet de limiter encore le bruit de la mesure. Le problème de cet ajustement est qu'il n'est pas toujours valable pour le tout début de l'acquisition où la courbe n'a pas l'allure d'une exponentielle. Nous évaluons au cas par cas pour choisir la méthode de renormalisation la plus adaptée.

3. On dérive la courbe résultante $N^{trad}(t)$ pour obtenir le taux de départs instantanés dus à la traduction correspondant au taux de variation de l'écart entre les cinétiques cumulées de traduction et de contrôle à un instant t . On aboutit à une distribution $D^{trad}(t)$ semblable à celle visible sur la figure 4.4.

$$D^{trad}(t) = -\frac{d}{dt} \left(N^{trad}(t) \right)$$

Nous traçons ces distributions dans les deux couleurs. Il est possible d'appréhender simplement l'allure de cet histogramme.

Au début du film, au moment où la traduction commence, l'écart entre traduction et contrôle augmente et le nombre de départs à chaque image augmente lui-aussi jusqu'à atteindre un maximum. Puis au fur et à mesure que le temps passe, le nombre d'ARN messagers déjà traduits augmente et le taux de départs par image va commencer à diminuer. Il diminue jusqu'à devenir nul lorsque tous les ARNm sont traduits et qu'il n'y a donc plus d'activité biologique. Nous verrons dans un second temps comment interpréter et donner une explication biologique à l'allure des courbes de départs instantanés.

Chapitre 4. Caractérisation de la traduction eucaryote initiée par une IRES : mise en lumière d'une cinétique à deux temps caractéristiques

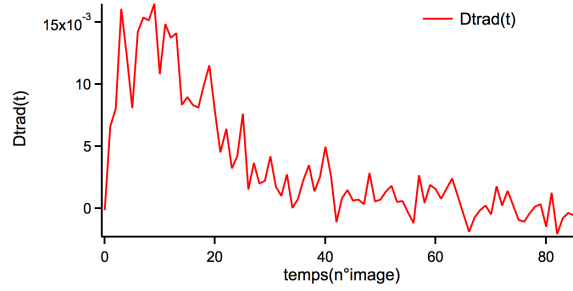


FIGURE 4.4 – Courbe brute représentant le taux de départs instantanés des jalons fluorescents ATTO DOWN en fonction du temps.

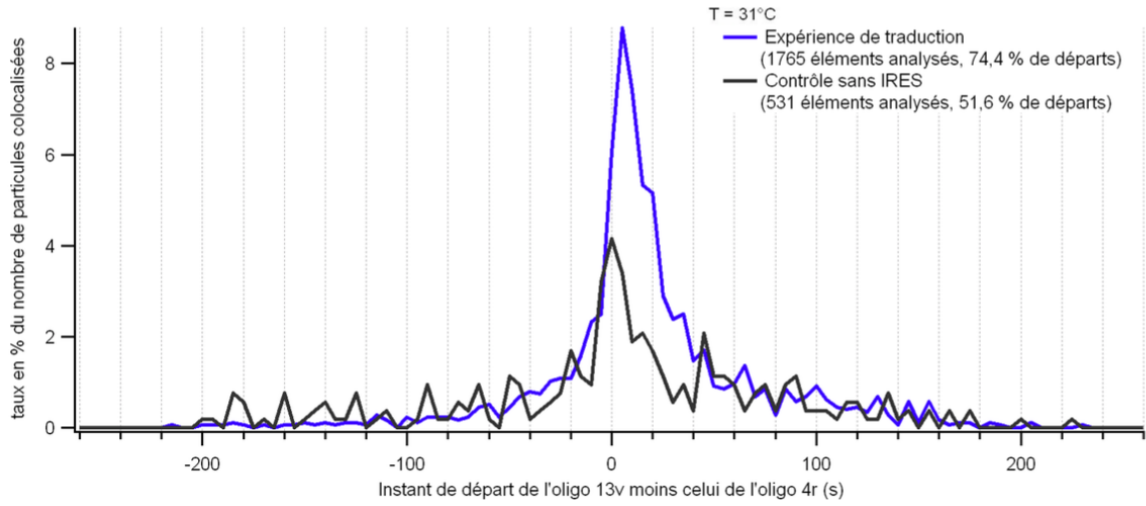


FIGURE 4.5 – Histogrammes des co-départs bruts pour les expériences de traduction (en bleu) et les expériences de contrôle (en noir). Chaque histogramme résulte de la concaténation des histogrammes de plusieurs échantillons afin d'obtenir une statistique suffisante.

4.1.2.2 Histogramme des co-départs

Pour la sous-population des N_0^{coloc} particules colocalisées, chaque couple de particules identifiées comme colocalisées correspond à un couple de temps de départ $\{T_i^{UP}; T_i^{DN}\}$.

On trace la distribution (ou histogramme) $H(T^{DN} - T^{UP})$ des intervalles de temps entre le départ du premier et le départ du second jalon : $T_i^{DN} - T_i^{UP}$. On construit l'histogramme associé aux expériences de traduction $H^{exp}(T^{DN} - T^{UP})$ après concaténation de l'ensemble des intervalles de temps de départ relatifs associés à ces expériences. De la même manière on construit l'histogramme pour les expériences de contrôle $H^c(T^{DN} - T^{UP})$. On obtient par exemple les deux histogrammes de la figure 4.5. Pour cet exemple l'histogramme de traduction correspond à une population totale de $N_{coloc}^{exp} = 1705$ particules colocalisées et celui de contrôle correspond à une population de $N_{coloc}^c = 531$ particules colocalisées.

Les histogrammes de traduction et de contrôle sont renormalisés respectivement par le

4.2. Etude de l'initiation par une IRES CrPV en présence de ribosomes pré-incubés

nombre de particules colocalisées pour l'expérience de traduction N_{exp}^{coloc} et pour l'expérience de contrôle N_c^{coloc} . On soustrait ensuite directement l'histogramme de contrôle à celui de traduction pour ne visualiser que les co-départs dus à la traduction dans l'histogramme résultant.

$$H^{trad}(T^{DN} - T^{UP}) = (H^{exp} - H^c)(T^{DN} - T^{UP})$$

Il s'agit maintenant d'ajuster cet histogramme résultant pour accéder à la vitesse d'élongation du ribosome.

4.2 Etude de l'initiation par une IRES CrPV en présence de ribosomes pré-incubés

4.2.1 Système biologique

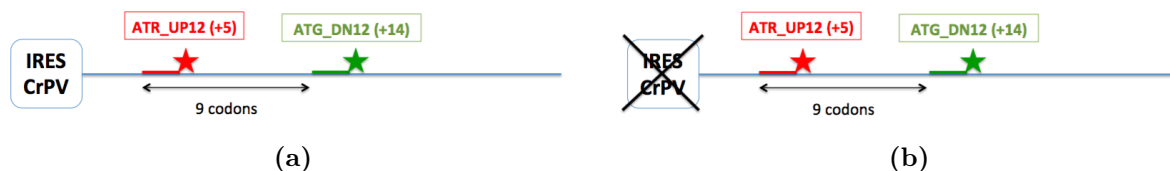


FIGURE 4.6 – Systèmes biologiques rapporteurs pour les expériences réalisées avec les ribosomes pré-incubés. (a) Premier système rapporteur CrPV-UP(+2)-DN(+11) du projet avec un faible écart entre l'IRES et le premier jalon ainsi qu'entre les jalons eux-même. L'IRES est une IRES de type 1 du Cricket Paralysis Virus (CrPV). (b) Système rapporteur de contrôle sur lequel on a retiré la structure IRES. Le ribosome est incapable de s'initier sur cet ARN messager.

Le premier ARN messager étudié a été pensé pour établir une preuve de principe de la mesure de cinétique de traduction du ribosome. Le premier jalon est placé près de la structure IRES CrPV pour vérifier que le ribosome est en mesure de le détacher. Le second jalon est positionné 9 codons plus loin. L'ARN messager de contrôle utilisé pour évaluer les départs non traductionnels est identique à ce premier ARNm, hormis la séquence IRES qui est supprimée.

Pour cette première expérience la résolution temporelle est fixée à une séquence d'images (une image dans le rouge pendant 100ms suivie d'une image dans le vert pendant 100ms d'exposition) toutes les 5 secondes.

4.2.2 Une dynamique à deux temps : modélisation des courbes cinétiques

Dans le paragraphe précédent, nous avons décrit les cinétiques brutes obtenues dans chaque couleur et pour les particules colocalisées. Pour interpréter ces distributions et leur donner un sens biologique, l'établissement d'un modèle probabiliste est nécessaire. Différents modèles mathématiques ont été testés pour ajuster au mieux les distributions statistiques selon leurs particularités.

4.2.2.1 Modélisation de l'histogramme des co-départs

Nous avons acquis deux histogrammes des co-départs bruts, l'un correspondant au cumul des expériences de traduction et le second au cumul des expériences de contrôle comme visible sur la figure 4.5. Nous choisissons de retrancher l'histogramme de contrôle tel quel sans réaliser un ajustement préalable (exponentiel ou gaussien). Ce choix se justifie par la variété des événements non-traductionnels considérés qui ne sont pas que dus à du photoblanchiment (soumis à une loi de décroissance mono-exponentielle). Pour éviter de simplifier excessivement la modélisation des événements non traductionnels, nous retranchons donc à l'histogramme brut de traduction renormalisé par le nombre de particules colocalisées étudiées, l'histogramme brut de contrôle lui-même renormalisé.

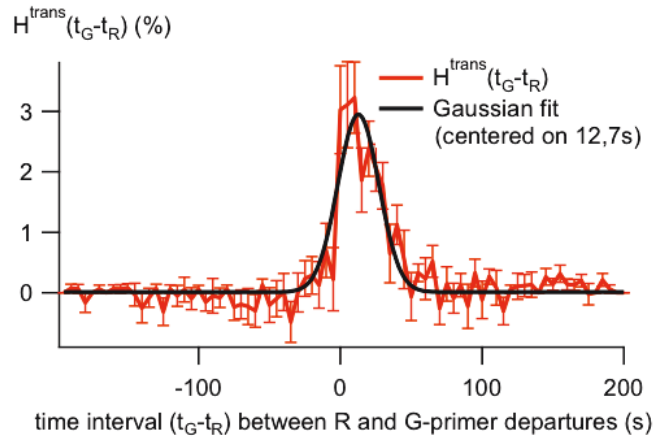


FIGURE 4.7 – Histogramme des co-départs résultant de la soustraction de l'histogramme de contrôle à l'histogramme de traduction. On ajuste cette distribution par une loi gaussienne centrée sur $T_{\text{moy}}^{G-DN} - T_{\text{moy}}^{R-UP} = 12,7 \pm 0,7s$.

Il est important de noter que si les co-départs liés à deux départs spontanés ou deux départs par photoblanchiment sont bien évalués dans le contrôle, des événements croisés correspondant à un jalon qui part par traduction et le second par un autre phénomène ne sont eux pas pris en compte dans les expériences de contrôle. Ils sont pourtant présents dans l'histogramme de traduction. Mais pour ces événements croisés qui sont dé-corrélés les uns des autres, l'écart temporel peut prendre un grand nombre de valeurs différentes. Ces événements seront répartis équitablement dans tout l'histogramme. Au contraire les co-départs par traduction sont des événements corrélés, correspondants à un faible intervalle de valeur de l'écart temporel. Le pic central de l'histogramme de traduction est donc très probablement dû à de tels événements corrélés, donc à des événements traductionnels.

Nous réalisons un ajustement gaussien sur l'histogramme résultant de la soustraction des deux histogrammes bruts (cf. figure 4.7). Le premier constat que l'on peut faire est que cet histogramme est décalé vers les intervalles de temps positifs soit : $T^{G-DN} - T^{R-UP} > 0 \Leftrightarrow T^{G-DN} > T^{R-UP}$. C'est un constat plutôt rassurant puisqu'il confirme que le second jalon part après le premier, ce qui est attendu dans le cas des événements de traduction. L'ajustement gaussien donne $T_{\text{moy}}^{G-DN} - T_{\text{moy}}^{R-UP} = 12,7 \pm 0,7s$, soit un temps caractéristique d'élongation

4.2. Etude de l'initiation par une IRES CrPV en présence de ribosomes pré-incubés

$t_{el} = 1,4 \pm 0,2s/\text{codon}$ puisque la distance parcourue par le ribosome entre les deux jalons est de 9 codons.

4.2.2.2 Modélisation des cinétiques de départs instantanés

Modéliser les évènements de traduction Entre l'injection de l'extrait cellulaire qui marque le temps initial de l'élongation et le détachement du premier jalon fluorescent, le ribosome effectue cinq cycles d'élongation. Ces évènements sont consécutifs par nature. L'allure de l'histogramme des départs instantanés du premier jalon est incompatible avec une cinétique à un seul temps caractéristique à cause de la forte asymétrie de la courbe autour du maximum. En effet, l'allure de la courbe est incompatible avec une cinétique décrite par la succession de 5 cycles d'élongations équivalents de probabilité $p(t) = \exp\left(-\frac{t}{t_{el}}\right)$. Une telle cinétique est décrite par

une loi d'Erlang $f(t) = \frac{t^{k-1} e^{-\frac{t}{t_{el}}}}{t_{el}^k (k-1)!}$ qui pour $k = 5$ ressemble à une loi gaussienne.

En effet, on voit bien sur la figure 4.8 que le taux de départs instantanés initialement nul augmente très rapidement jusqu'à atteindre un maximum puis décroît lentement jusqu'à redevenir presque nul à la fin du film. Il y a donc un premier temps caractéristique de croissance du taux de départ puis un second temps caractéristique de décroissance lente.

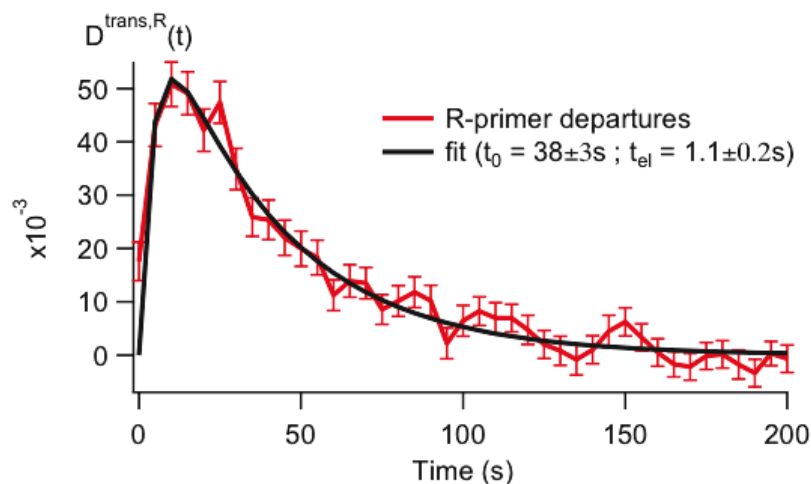


FIGURE 4.8 – Taux de départs instantanés $D^{\text{trad}}(t)$ pour le jalon ATR-UP12-(+5) sur un ARNm avec IRES CrPV en fonction du temps, et ajustement par la fonction $\mathcal{D}(t)$ (voir eq. ci-dessous). Les barres d'erreur sont obtenues par une procédure de bootstrap (cf. section 4.2.2.3).

L'histogramme de la figure 4.8 peut-être ajusté par plusieurs modèles à deux temps caractéristiques. Ces modèles sont décrits avec précision dans la thèse de Nicolas Fiszmann [Fizman 2013], nous ne les discuterons pas ici. On retient un ajustement par une loi de deux exponentielles consécutives de temps caractéristiques différents : $\mathcal{D}(t)$ dont l'expression est donnée ci-dessous :

Chapitre 4. Caractérisation de la traduction eucaryote initiée par une IRES : mise en lumière d'une cinétique à deux temps caractéristiques

$$\mathcal{D}(t) = \frac{A}{(t_0 - t_1)} \left(e^{-\frac{t}{t_0}} - e^{-\frac{t}{t_1}} \right)$$

Cette loi ajuste très bien nos données comme on peut le voir sur la figure 4.8 et nous donne un temps caractéristique long autour de 40 s et un temps caractéristique court de quelques secondes.

L'ajustement donne accès à un troisième paramètre A qui correspond à l'aire totale sous la courbe d'ajustement. Sous la forme d'un pourcentage ce paramètre correspond à la proportion d'ARN messagers traduits sur l'ensemble des ARN messagers marqués. Il est évalué individuellement pour chaque jalon fluorescent. Ce paramètre caractérise l'efficacité de reconnaissance de l'ARNm par le ribosome et son efficacité de traduction (ces deux événements étant pour nous indiscernables).

4.2.2.3 Évaluation des barres d'erreur : bootstrap

L'évaluation des temps long et court par simple ajustement des courbes de départs instantanés a une précision limitée, notamment en comparaison de celle obtenue avec l'histogramme des co-départs. C'est particulièrement vrai pour le temps court pour lequel un simple ajustement donne une erreur parfois comparable à sa valeur. Pour établir des barres d'erreur raisonnables sur nos distributions, nous faisons appel à une procédure statistique : le bootstrap.

Le bootstrap est une méthode particulièrement adaptée lorsque l'on considère des échantillons statistiques peu importants. Elle consiste à venir tirer aléatoirement avec remise une sous-population dans la population statistique de départ, à effectuer sur cette sous-population l'opération mathématique souhaitée, puis à ré-itérer l'opération sur un autre tirage aléatoire. La même particule peut être tirée deux fois. On répète cette opération le nombre de fois souhaité. In fine on récupère la valeur moyenne et l'écart type des paramètres que l'on souhaite évaluer. Plus on réitère la procédure de bootstrap, meilleure sera la précision sur la valeur finale des paramètres.

Dans notre cas, les populations statistiques initialement rentrées dans la procédure sont (1) la population des N_0^{exp} instants de départ des jalons fluorescents dans une couleur pour l'expérience de traduction et (2) la population des instants de départ de ce même jalon dans les expériences de contrôle N_0^c (cf. figure 4.9). On tire au hasard avec remise une sous-population parmi les N_0^{exp} temps de départ du jeu "traduction" et de même on tire au hasard une sous-population parmi le jeu "contrôle". On effectue sur ces sous-populations la renormalisation, la dérivation puis l'ajustement de la courbe brute obtenue. On récupère à chaque itération du bootstrap des valeurs du temps court, du temps long et de l'efficacité de traduction.

Une fois le nombre d'itérations souhaité effectué (on réalise en général un millier d'itérations), le programme renvoie les valeurs moyennes des trois paramètres ainsi que la distribution statistique correspondant à la moyenne de l'ensemble des distributions des sous-populations étudiées. Cette distribution est elle-même ajustée par la loi $\mathcal{D}(t)$. La procédure nous donne également des barres d'erreurs pour l'ensemble des éléments évalués (temps, distributions, efficacité de traduction).

4.2. Etude de l'initiation par une IRES CrPV en présence de ribosomes pré-incubés

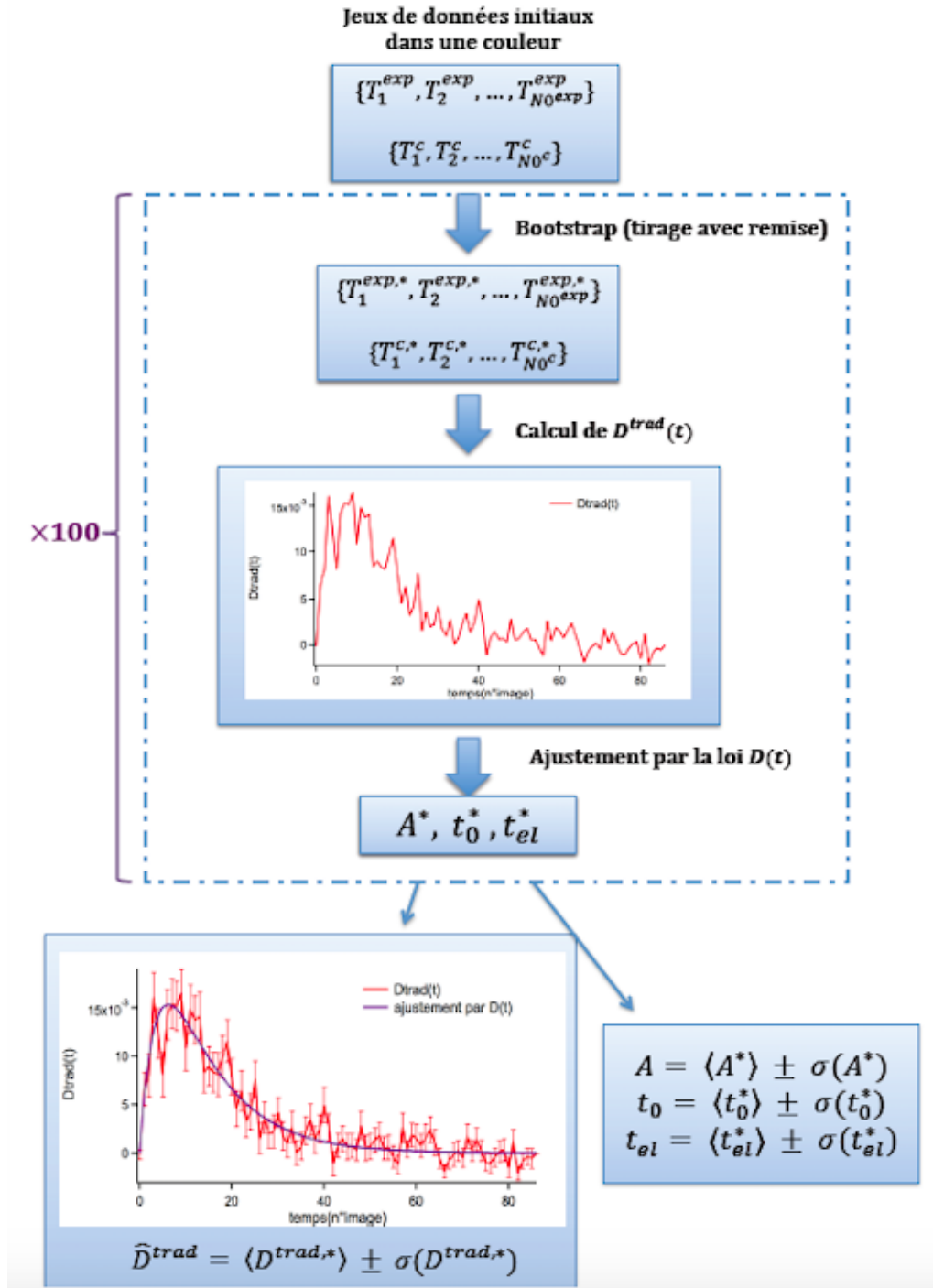


FIGURE 4.9 – Schéma récapitulatif des données en entrée et en sortie de la procédure de bootstrap effectuée dans le cadre de nos expériences.

Chapitre 4. Caractérisation de la traduction eucaryote initiée par une IRES : mise en lumière d'une cinétique à deux temps caractéristiques

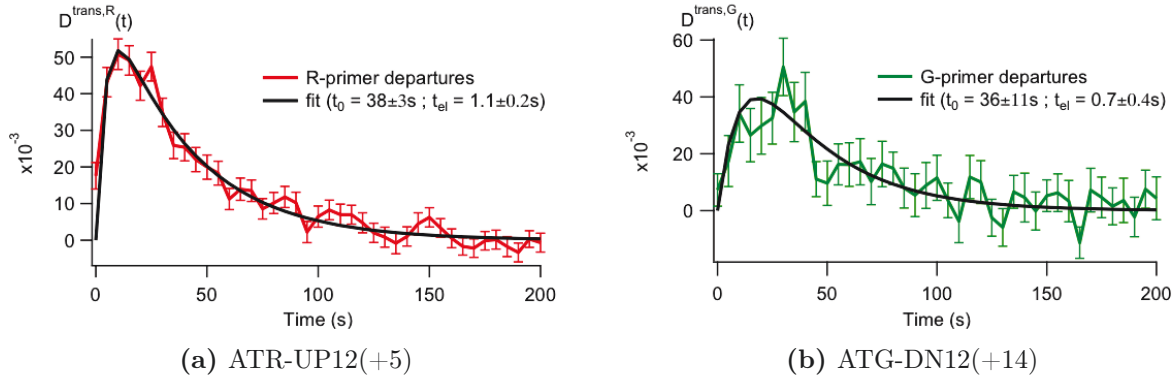


FIGURE 4.10 – Distribution $\langle D^{trad,*}(t) \rangle \pm \sigma(D^{trad,*}(t))$ du taux de départs instantanés des deux jalons ATR-UP12(+5) (A) et ATG-DN12(+14) (b) en fonction du temps. L'ajustement par $\mathcal{D}(t)$ et la détermination des barres d'erreur $\sigma(D^{trad,*}(t))$ sont réalisés à l'aide de la procédure de bootstrap. On réitère la procédure 1000 fois.

Un exemple des courbes obtenues en sortie de la procédure de bootstrap est donné sur la figure 4.10. On constate que l'erreur relative sur l'évaluation du temps court pour le premier jalon est de 18%, ce qui nettement plus faible que l'erreur évaluée avec un simple ajustement décrit dans la section précédente. Le bootstrap est un outil essentiel pour évaluer nos paramètres cinétiques avec précision malgré la variabilité de nos mesures et la difficulté d'accumuler une statistique très importante lors de nos expériences de molécule unique.

4.2.3 Interprétation biologique des temps caractéristiques longs et courts

4.2.3.1 Bilan des mesures cinétiques

Les informations cinétiques extraites de l'étude de l'histogramme des co-départs et des courbes de départs instantanés dans les deux couleurs sont résumées dans le tableau de la figure 4.1.

	ATR-UP12(+5)	ATG-GN12(+14)	ATR-UP12(+8)
A(%)	51 ± 1	46 ± 2	72 ± 2
t_0 (s)	38 ± 3	36 ± 10	47 ± 3
t_1 (s)	4,2 ± 0,8	10,4 ± 6,5	7,7 ± 1,0
Hyp 1 : t_{el} (s/codon)	1,1 ± 0,2	0,8 ± 0,5	1,1 ± 0,1
Hyp 2 : t_{el} (s/codon)	1,4 ± 0,3	0,9 ± 0,5	1,3 ± 0,1
t_{el} de l'histogramme	1,4 ± 0,2		

TABLE 4.1 – Tableau récapitulatif des temps caractéristiques long et court mesurés lors des expériences avec des ribosomes pré-incubés. Le tableau donne également la valeur de l'efficacité globale A.

On retrouve pour les deux couleurs, un temps long de l'ordre de 40 s et un temps court de quelques secondes. Divisé par le nombre de codons concernés, on trouve un temps d'élongation proche de la seconde par codon. Cette mesure est cohérente avec celle de l'histogramme qui

4.2. Etude de l'initiation par une IRES CrPV en présence de ribosomes pré-incubés

indique aussi un temps d'élongation avoisinant 1 s/codon. On constate que les paramètres cinétiques issus de la mesure réalisée en hybridant le premier jalon un peu plus loin sur l'ARNm (ATR-UP12(+8)) est cohérente avec les mesures cinétiques pour ATR-UP12(+5) et ATG-DN12(+14).

4.2.3.2 Temps caractéristiques long et court : confrontation à la littérature

Pour ce qui est du temps d'élongation court, son ordre de grandeur est cohérent avec les mesures réalisées dans la littérature et en particulier avec celles issues de récentes études *in-vivo* [Yan 2016, Wu 2016, Tanenbaum 2014] en molécule unique. Celles-ci mesurent une vitesse d'élongation moyenne de 0,4 s/codon. Ce temps est inférieur à celui que nous mesurons, ce qui n'est pas choquant dans la mesure où nous travaillons *in-vitro* avec des ribosomes qui ont été purifiés à partir du RRL et pré-incubés sur les ARN messagers.

Comment expliquer la présence d'un temps long dans la cinétique de traduction du ribosome ? Intuitivement on est tenté d'associer l'existence du temps long à la présence d'une IRES à l'extrémité de l'ARNm. Cet élément est très structuré et occupe initialement les sites A et P du ribosome grâce au domaine PKI², ce qui signifie que le ribosome est directement en interaction avec cette structure et doit s'en extraire.

Dans la littérature, plusieurs articles se sont intéressés aux mécanismes de l'initiation par une IRES CrPV. Nous avons présenté dans le chapitre 1 les articles [Petrov 2016] et [Fernández 2014], qui étudient l'interaction du ribosome et de la structure IRES lors de l'initiation, et en particulier le premier cycle de translocation qui correspond au passage du domaine PKI du site A au site P.

L'article [Zhang 2016] se concentre plutôt sur les premiers cycles d'élongation du ribosome et propose un modèle avec deux cycles d'élongation ralentis par la présence de l'IRES, suivis de deux cycles d'élongations canoniques, eux même ralentis. La force de ce travail est de pouvoir étudier toutes les sous étapes de l'élongation pour déterminer laquelle est cinétiquement limitante. En revanche ils utilisent un système largement hétérogène composé de ribosomes de crevettes, de facteurs d'élongation issus de levures et des ARN de transferts issus de bactéries *E. coli*. Bien qu'ils parviennent à observer une traduction effective, il n'en reste pas moins que la mesure n'est pas réalisée dans des conditions très physiologiques, et les temps d'élongation mesurés sont environ 40 fois supérieurs à ceux mesurés *in-vivo*. Dans le cas des premiers cycles d'élongations après l'initiation par l'IRES CrPV, ils constatent que c'est l'évènement de translocation, étape de l'élongation qui s'accompagne d'un changement de conformation du ribosome, qui serait cinétiquement limitante.

4.2.3.3 Proposition d'un modèle cinétique

Il est donc raisonnable de faire l'hypothèse que le temps long mesuré lors de nos expériences est bien dû à l'interaction du ribosome avec l'IRES lors des premiers cycles d'élongation. Plus précisément il correspondrait à l'évènement ou aux évènements de translocation nécessaires pour que le domaine PKI, en vert sur la figure 4.11, soit intégralement extrait des sites A,P et E du ribosome.

2. cf. chapitre 1, section 1.3.5.1 page 36

Chapitre 4. Caractérisation de la traduction eucaryote initiée par une IRES : mise en lumière d'une cinétique à deux temps caractéristiques

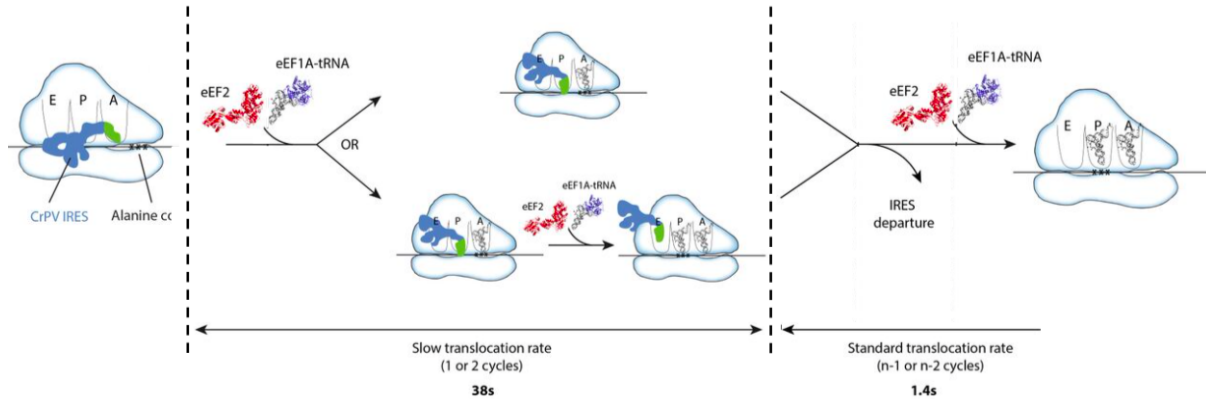


FIGURE 4.11 – Modèle descriptif de l'interaction d'un ribosome mammifère avec l'IRES CrPV durant le ou les deux premiers cycles d'élongation.

L'équipe de biologistes de l'I2BC avec lesquels nous collaborons sur le projet a proposé un modèle qui décrit l'existence d'un temps long correspondant aux premiers cycles d'élongation. La figure 4.11 schématise l'interaction du ribosome avec l'IRES lors des premiers cycles. L'IRES est initialement dans les sites A et P. Il faut à priori deux événements de translocation pour que l'IRES soit entièrement extraite du ribosome. Deux hypothèses sont alors envisageables pour le début de l'élongation :

- Hypothèse 1 : Seul le premier événement de translocation identifié par [Fernández 2014] est lent. Après le passage du site A au site P du domaine PKI, la phase d'élongation canonique commence bien que le ribosome soit encore en interaction avec l'IRES CrPV.
- Hypothèse 2 : Les deux premiers événements de translocation correspondant au mouvement du domaine PKI du site A au site P d'abord puis du site P au site E sont cinétiquement lents.

Le tableau de la figure 4.1 donne la valeur du temps d'élongation en s/codon en considérant chacune des deux hypothèses : celle d'un unique cycle d'élongation long (Hypothèse 1 notée Hyp 1 dans le tableau) et celle de deux cycles longs (Hypothèse 2 notée Hyp 2 dans le tableau). On constate que la différence au niveau du temps court est minime et incluse dans les barres d'erreur de la mesure. Nous n'avons pas la précision temporelle nécessaire pour réellement trancher entre ces deux hypothèses.

Ce modèle est cohérent avec les observations mécanistiques et dynamiques [Petrov 2016, Fernández 2014] décrites au chapitre 1, section 1.3.5, page 36, mais aussi avec celles de [Zhang 2016], qui eux se prononcent clairement pour deux cycles d'élongation lents plutôt qu'un seul. Après ces premiers cycles, l'IRES est extraite du ribosome et remplacée dans les sites A et P par des ARN de transfert. Commence alors une phase d'élongation classique avec une succession de cycles courts qui correspond au temps court d'élongation mesuré par deux biais (départs instantanés et histogramme des co-départs).

4.3. Un second contrôle biologique : expériences avec les ribosomes du RRL

4.3 Un second contrôle biologique : expériences avec les ribosomes du RRL

Pré-incuber les ribosomes sur l'ARN messager était, lors des premières expériences, un moyen de limiter les difficultés en s'assurant que le ribosome soit déjà en position d'initier la traduction dès que l'extrait cellulaire est injecté dans la cellule microfluidique. Seulement l'extrait cellulaire lui-même contient des ribosomes dits endogènes. Pour vérifier que les cinétiques présentées dans la section précédente sont bien spécifiques aux ribosomes pré-incubés sur nos ARNm et qu'il n'y a pas présence de deux populations cinétiques différentes, nous avons réalisé des expériences de contrôle sans pré-incuber les ribosomes. De cette manière on caractérise la cinétique propre aux ribosomes endogènes.

4.3.1 Description de l'ARNm

Notre système biologique est accroché en surface. Au moment où l'on souhaite commencer les acquisitions, on injecte le RRL. Les ribosomes du RRL vont alors diffuser jusqu'aux ARN messagers et initier la traduction.

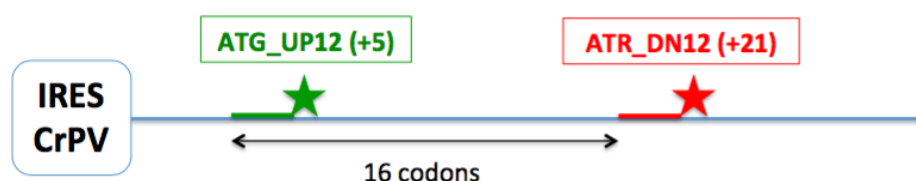


FIGURE 4.12 – Système biologique rapporteur utilisé pour les expériences de contrôle avec les ribosomes du RRL : CrPV-UP(+2)-DN(+18).

Pour réaliser ces expériences, nous utilisons le système biologique schématisé sur la figure 4.12. Par rapport au système décrit précédemment, le premier oligo UP est cette fois-ci couplé à l'ATTO vert et le second oligo DOWN à l'ATTO rouge. Nous effectuons ce changement car nous souhaitons éloigner le second jalon fluorescent pour ces nouvelles expériences. Il est cette fois 16 codons après le premier jalon. Nous éloignons le second jalon dans la perspective d'ajouter dans de futures expériences des obstacles entre les deux jalons. Nous cherchons à augmenter cette distance progressivement pour vérifier que l'on est toujours capable de mesurer une cinétique de traduction. L'oligonucléotide DOWN est couplé à l'ATTO rouge car c'est celui des deux qui a la durée de vie avant photoblanchiment la plus longue. Il est donc moins probable que ce marqueur blanchisse avant que le ribosome n'ait eu le temps de le détacher de l'ARNm. L'ARNm possède toujours une structure IRES CrPV à son extrémité 5'.

4.3.2 Courbes cinétiques avec les ribosomes du RRL

On réalise les mesures cinétiques en faisant l'acquisition d'une séquence image toutes les 2,5 s. En effet les améliorations apportées au montage optique décrites dans le chapitre 3 nous ont permis de diminuer notablement le photoblanchiment de nos marqueurs.

Chapitre 4. Caractérisation de la traduction eucaryote initiée par une IRES : mise en lumière d'une cinétique à deux temps caractéristiques

Aussi, nous pouvons nous permettre d'éclairer plus régulièrement les marqueurs sans que le photoblanchiment ne soit limitant pour la mesure. Nous espérons de fait avoir une meilleure précision sur nos mesures cinétiques en augmentant la résolution temporelle.

En observant les cinétiques de départs cumulés acquises dans ces nouvelles conditions, c'est à dire sans pré-incuber de ribosomes, on constate que l'écart entre la traduction et le contrôle sans IRES est faible. En prenant en compte la variabilité des mesures, il nous a fallu accumuler un grand nombre d'expériences pour séparer les courbes moyennes de traduction et de contrôle. Le tableau 4.2 résume le nombre de systèmes cumulés dans chaque couleur pour construire les cinétiques de la figure 4.12.

	ATG-UP12(+5)	ATR-DN12(+21)	Colocalisés
Traduction	3146	2759	910
Contrôle	2871	2725	1067

TABLE 4.2 – Tableau indiquant la statistique pour chacune des expériences de traduction avec des ribosomes du RRL et de contrôle sans IRES discutées dans cette section.

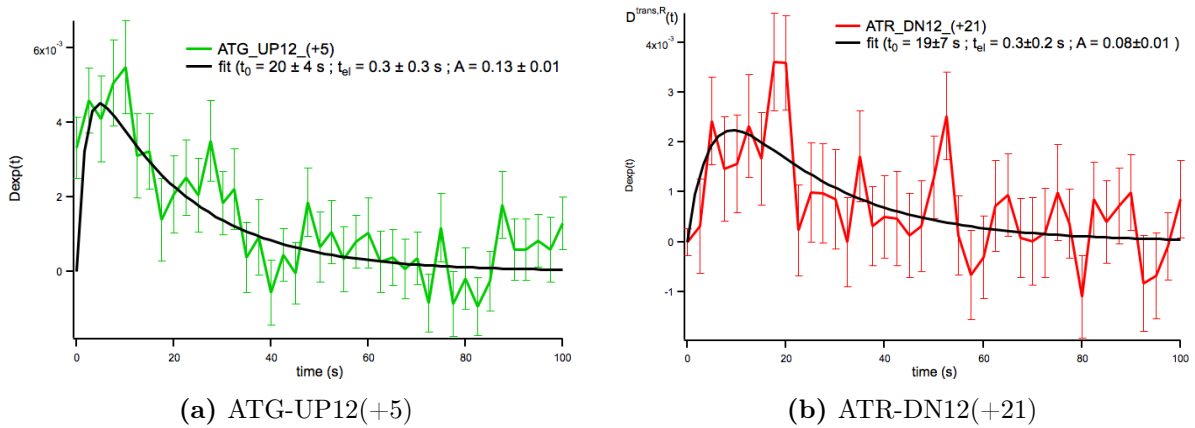


FIGURE 4.13 – Distribution du taux de départs instantanés $D^{trad}(t)$ des deux jalons ATG-UP12(+5) (a) et ATR-DN12(+21) (b) en fonction du temps. L'ajustement par $\mathcal{D}(t)$ et la détermination des barres d'erreur sont réalisés à l'aide de la procédure de bootstrap. On réitère la procédure 1000 fois.

On trace les courbes de départs instantanés dans les deux couleurs après avoir effectué une procédure de bootstrap sur les échantillons statistiques dénombrés dans le tableau 4.2. Le premier constat que l'on peut faire en observant ces distributions, c'est qu'elles sont très bruitées, ce qui est représentatif du faible écart entre traduction et contrôle sans IRES. Il est difficile dans ces conditions, même en effectuant une procédure de bootstrap d'évaluer les paramètres cinétiques avec une bonne précision. Les paramètres cinétiques sont résumés dans le tableau 4.3.

Nous discuterons les temps caractéristiques mesurés dans la section suivante. Le paramètre A qui caractérise l'efficacité globale ne dépasse pas 13% pour ces expériences.

4.3. Un second contrôle biologique : expériences avec les ribosomes du RRL

Jalon	$t_{el}(s/codon)$	$t_0(s)$	A(%)
ATR-DN12(+21)	$0,3 \pm 0,2$	19 ± 7	8 ± 1
ATG-UP12(+5)	$0,3 \pm 0,3$	20 ± 4	13 ± 1

TABLE 4.3 – Tableau récapitulatif des paramètres cinétiques mesurés lors des expériences de contrôle avec les ribosomes du RRL.

4.3.3 Comparaison des cinétiques des ribosomes endogènes et des ribosomes pré-incubés

Le premier critère de comparaison possible entre les deux populations de ribosomes est bien un critère cinétique. Nous avons constaté que la cinétique des ribosomes endogènes était différente de celle des ribosomes pré-incubés. La vitesse d'élongation est beaucoup plus rapide (environ un facteur 4 de différence). Mais il reste que la précision de notre mesure sur ce paramètre, en particulier pour l'expérience sans pré-incuber les ribosomes, demeure limitée. Il doit donc être interprété avec prudence. De même le temps long est divisé par deux, on passe de environ 40 s à 20 s (cf. table 4.4).

Ribosomes	$t_{el}(s/codon)$	$t_0(s)$
Pré-incubés	$1,1 \pm 0,2$	38 ± 3
Endogènes	$0,3 \pm 0,3$	20 ± 4

TABLE 4.4 – Tableau comparatif des temps longs et courts pour l'expérience avec les ribosomes pré-incubés et le contrôle avec les ribosomes du RRL. On choisit de comparer les temps caractéristiques longs et court correspondants au départ du premier jalon fluorescent UP pour les deux conditions considérées.

Plusieurs interprétations sont possibles pour expliquer cette différence de cinétique. Les ribosomes pré-incubés ont été centrifugés dans une ultra-centrifugeuse à près de 100 000 g. Il est possible que cette étape de centrifugation ait un effet sur l'activité traductionnelle de ces ribosomes qui seraient moins actifs biologiquement.

Cette hypothèse nous encourage à privilégier les ribosomes du RRL qui constituent d'autant plus un système physiologiquement représentatif car non modifié. De plus, les études in-vivo [Yan 2016, Wu 2016] avancent des vitesses de traduction intra-cellulaires qui sont proches de celles que nous avons mesurées in-vitro pour les ribosomes du RRL. Les ribosomes du RRL s'avèrent être un système biologique adapté dans la suite de nos études pour nous approcher au plus près des conditions de traduction in-vivo. Seulement un autre élément vient contraster ce constat positif : l'efficacité globale des ribosomes du RRL.

4.3.4 Efficacité de reconnaissance et de traduction

L'efficacité globale est sensiblement différente entre les expériences avec et sans ribosomes pré-incubés. Le paramètre donnant cette efficacité, A , est évalué à 50% avec les ribosomes pré-incubés et seulement à 13% pour les ribosomes du RRL. La faible valeur de A est particulièrement flagrante sur la figure 4.14.

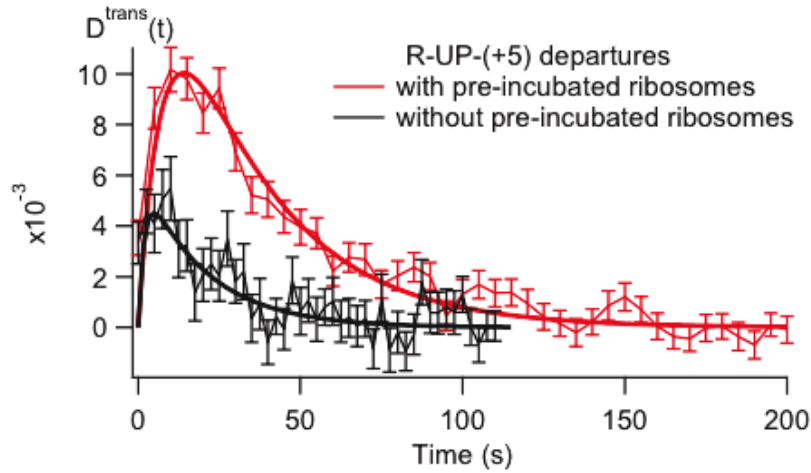


FIGURE 4.14 – Distribution du taux de départs instantanés $D^{trad}(t)$ en fonction du temps pour le premier jalon. La courbe noire correspond aux expériences avec les ribosomes du RRL et la courbe rouge correspond à l'expérience avec les ribosomes pré-incubés.

Cette observation indique qu'en molécule unique contrairement aux expériences réalisées en biologie moléculaire, les ribosomes du RRL ont des difficultés à s'initier sur les ARN messagers, même s'ils sont tous disponibles. Il s'agit plutôt d'une bonne nouvelle vis à vis de nos premières expériences. Elle valide que les cinétiques étudiées avec des ribosomes pré-incubés étaient bien spécifiques à ces ribosomes. Les 10% évalués dans des expériences avec seulement les ribosomes du RRL sont forcément surévalués par apport à une expérience où une majorité des sites d'initiation sont occupés par des ribosomes pré-incubés. On peut donc considérer que les ribosomes du RRL ont un impact négligeable dans les expériences où sont présents des ribosomes pré-incubés.

La faible efficacité globale des ribosomes du RRL vis à vis de l'IRES CrPV constitue un véritable obstacle à leur utilisation pour nos expériences futures. Il y a très peu d'événements de traduction parmi l'ensemble des événements de départ ce qui explique qu'il soit difficile de construire une cinétique peu bruitée. Une conséquence importante de cette faible efficacité de traduction est que si les départs dans une couleur liés à la traduction sont faibles, les co-départs qui correspondent à un départ dans les deux couleurs pour un même ARN messager sont encore plus rares. On peut faire un simple raisonnement pour illustrer ce fait. Si 10% des jalons fluorescents partent par traduction dans chaque couleur alors la proportion de co-départs dus à la traduction sur l'ensemble de la population des particules colocalisées est :

$$P = 0,1 \times 0,1 = 0,01 = 1\%$$

soit à peine 1% de co-départs dus à la traduction. Dans ces conditions, nous ne sommes pas parvenus à établir un histogramme des co-départs, c'est pourquoi nous étudions uniquement les cinétiques de départs instantanés dans chaque couleur.

Puisque l'on envisage d'insérer des obstacles entre les deux marqueurs qui viendront probablement modifier la cinétique du ribosome, l'histogramme est l'outil le plus adapté pour mesurer ces variations de cinétique selon la séquence étudiée. Une autre difficulté s'ajoute lorsque l'on

4.4. Bilan : quelles conditions d'études choisir pour la suite du projet ?

veut intégrer des obstacles liés aux erreurs programmées dans la séquence étudiée. En effet les erreurs programmées de la traduction sont des événements rares, avec une faible probabilité d'occurrence. Si l'efficacité de traduction est très faible, alors la probabilité que l'on puisse mesurer un événement du type erreur programmée sera quasi-nulle. Par exemple si la probabilité d'occurrence d'une erreur programmée est de 10% et l'efficacité de traduction de 10% également, alors la probabilité de mesurer un événement rare sera : $P_{rare} = 0,1 \times 0,1 = 1\%$. On a donc tout intérêt à maximiser l'efficacité de traduction dans la perspective d'étudier les erreurs programmées.

4.4 Bilan : quelles conditions d'études choisir pour la suite du projet ?

Nos expériences sur les ribosomes non pré-incubés ont donné des résultats contrastés. Après ces tests, l'objectif était de déterminer si nous continuions le projet sans pré-incuber les ribosomes ou si cette pré-incubation était nécessaire. En effet, ne pas pré-incuber les ribosomes présente un double avantage. Les ribosomes du RRL ne sont pas modifiés, leur intégrité biologique est donc préservée, et utiliser ces ribosomes pour traduire c'est se rapprocher des conditions de traduction in-vivo, c'est à dire plus physiologiques.

Cette méthode permet aussi de s'affranchir de la purification et de l'accroche des ribosomes, donc de simplifier nos expériences puisque chaque étape supplémentaire peut introduire de nouveaux biais. Aussi nous comparons les paramètres cinétiques et l'efficacité de traduction de ces deux types d'expériences afin de choisir un protocole pour la suite.

Nous avons présenté dans les paragraphes précédents les principales caractéristiques, dans les conditions actuelles de l'expérience, de chaque population de ribosomes étudiés, caractéristiques qui sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Ribosomes	cinétique	modification bio	A	histogramme	erreurs programmées
Pré-incubés	lente	modifiés	50%	oui	adapté
Endogènes	rapide	non modifiés	10%	non	non adapté

TABLE 4.5 – Tableau récapitulatif des caractéristiques des deux populations de ribosomes étudiées.

La conclusion de nos observations est que dans les conditions actuelles de l'expérience, nous ne pouvons pas envisager des expériences d'erreurs programmées de la traduction eucaryote avec les ribosomes du RRL. En effet l'efficacité de traduction est un facteur primordial pour ces expériences. Seulement notre démarche s'inscrit dans la recherche des conditions les plus physiologiques et représentatives d'un système mammifère in-vivo que possible. Face à ce dilemme, nous décidons donc de poursuivre malgré tout avec les ribosomes endogènes non modifiés mais en faisant évoluer nos systèmes biologiques et nos conditions expérimentales dans le but d'augmenter l'efficacité de traduction de ces ribosomes. Nous verrons dans le prochain chapitre que cette nouvelle problématique nous a amenés à explorer plus loin l'initiation IRES dépendante.

4.5 Conclusion

Nous avons exposé dans ce chapitre les premiers résultats obtenus avec notre dispositif d'étude de la cinétique de traduction en molécule unique. En perfectionnant notre protocole expérimental et notre dispositif, nous sommes parvenus à réaliser des mesures cinétiques fiables et reproductibles.

L'étude de la cinétique de ribosomes préalablement pré-incubés sur un ARN messager rapporteur qui possède une IRES CrPV nous indique que la cinétique est nécessairement décrite par deux temps caractéristiques : un temps long et un temps court correspondant au temps d'élongation. Le temps d'élongation mesuré est cohérent avec la littérature et en particulier avec les résultats de récents articles sur la traduction eucaryote in-vivo. Le temps long est quand à lui évalué à 40 secondes. En s'appuyant sur des études structurales et cinétiques de l'IRES CrPV, on émet l'hypothèse que ce temps long correspond au temps nécessaire au ribosome pour s'extraire de l'IRES durant le premier ou les deux premiers cycles d'élongation. Ce temps caractérise donc l'interaction entre le ribosome mammifère et la structure virale de l'IRES CrPV.

Pour s'assurer que la cinétique mesurée est bien spécifique aux ribosomes pré-incubés sur les ARN messagers et ne résulte pas d'un mélange de deux populations, on réalise des expériences de contrôle avec uniquement les ribosomes du RRL non pré-incubés. On constate que dans ces conditions, le recrutement des ribosomes n'est pas efficace mais les cinétiques que nous parvenons à mesurer sont deux fois plus rapides que pour les ribosomes pré-incubés. Les ribosomes du RRL ne participent que très peu à la cinétique de traduction lorsque l'on réalise les expériences en pré-incubant les ribosomes.

En revanche, ces ribosomes endogènes ne sont pas modifiés, leur intégrité biologique est préservée. De plus, en ne pré-incubant pas, nous simplifions la réalisation de nos expériences. Aussi, même si ce n'est pas adapté dans les conditions expérimentales actuelles, nous souhaitons continuer les expériences avec les ribosomes du RRL. Mais pour cela, il est primordial de parvenir à augmenter grandement leur efficacité globale. Ce défi et les stratégies mises en place pour le relever feront l'objet du chapitre 5.

Efficacité de traduction et structures

IRES

Sommaire

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

5.1 Stratégies de maximisation de l'efficacité de traduction

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

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

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

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

- l'ARN messenger,

- les sondes fluorescentes,
- la structure IRES.

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

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

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

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

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

5.1. Stratégies de maximisation de l'efficacité de traduction

5.1.2 Test de différentes stratégies d'optimisation

5.1.2.1 Nouveau design de l'ARN messenger

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

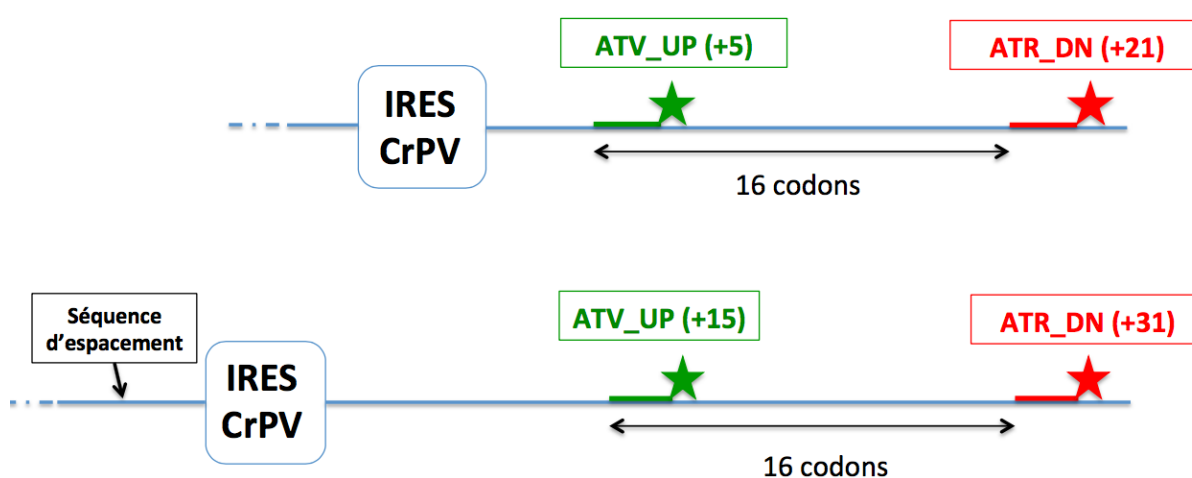


FIGURE 5.1 – Schéma représentatif des ARNm CrPV-UP(+2)-DN(+18) en haut et S-CrPV-UP(+12)-DN(+28) en bas. On a ajouté à ce second système rapporteur une séquence d'espacement en amont de l'IRES et la distance qui sépare l'IRES du premier jalon est allongée de 15 codons.

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

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

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

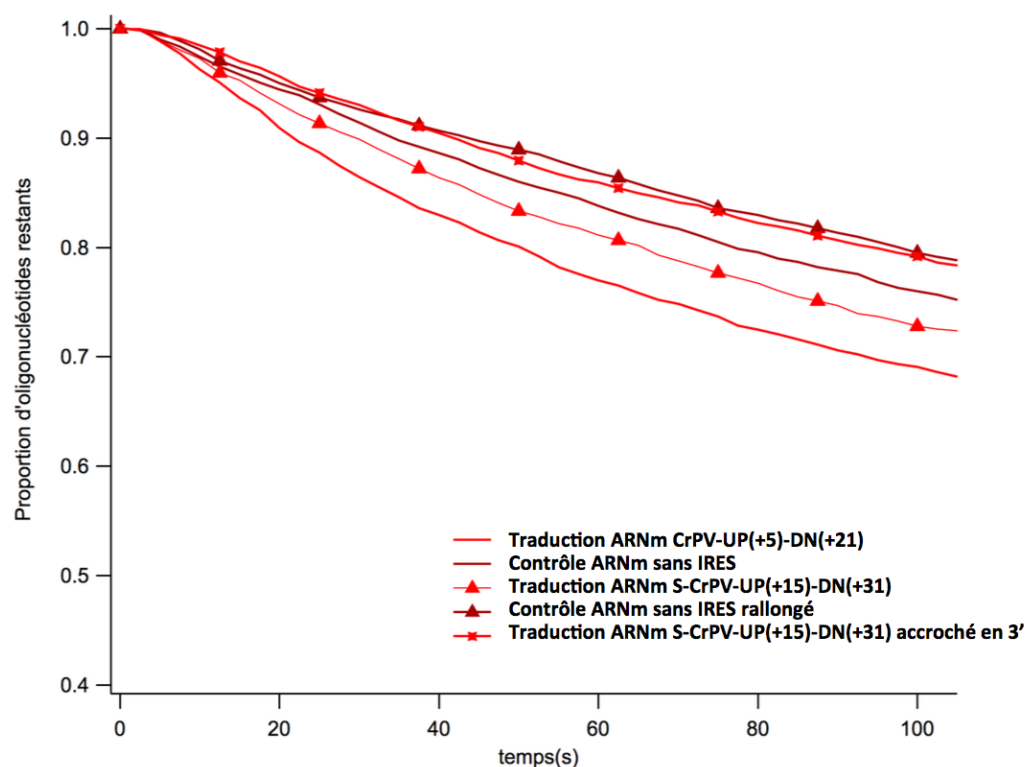


FIGURE 5.2 – Courbe représentant la proportion de la population initiale de jalons fluorescents DOWN restant au cours du temps pour les ARNm S-CrPV-UP(+12)-DOWN(+28) (courbe rouge, marqueurs triangulaires) et CrPV-UP(+2)-DOWN(+18) (courbe rouge sans marqueurs) et leurs contrôles respectifs (courbes rouge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

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

5.1.2.2 Test de l'accroche en 3'

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

5.1. Stratégies de maximisation de l'efficacité de traduction

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

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

5.1.2.3 Essais avec l'initiation par une IRES HCV

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

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

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

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

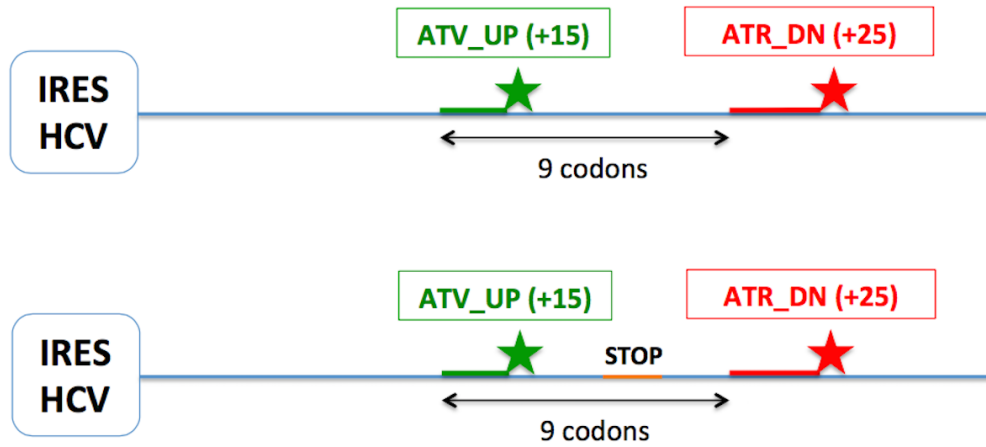


FIGURE 5.3 – Schéma représentatif des ARNm HCV-UP(+12)-DN(+21) en haut et HCV-UP(+12)-STOP-DN(+21) en bas. Ici le second jalon est un oligofluorophore ATR-DN15(+25) (séquence de 15 nucléotides) tandis que le premier jalon est un oligofluorophore ATV-UP12(+15) (séquence de 12 nucléotides).

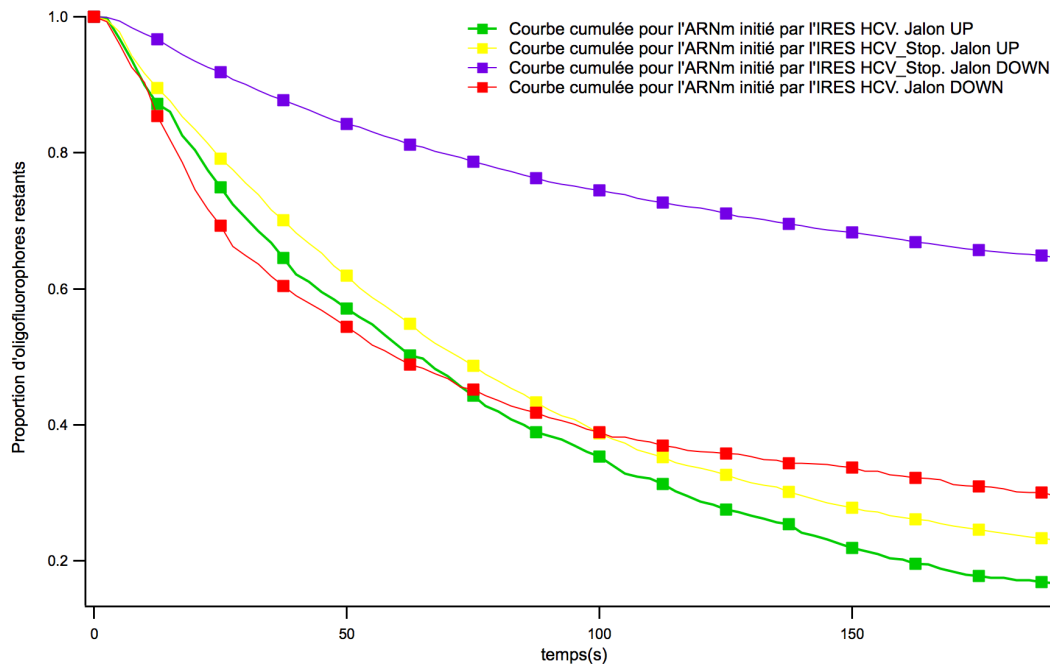


FIGURE 5.4 – Courbe représentant la proportion de la population initiale de jalons fluorescents (UP ou DOWN) restants au cours du temps pour l'ARNm HCV-UP(+12)-DN(+21) et l'ARNm de contrôle spécifique au jalon DOWN : HCV-UP(+12)-STOP-DN(+21)

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

5.1. Stratégies de maximisation de l'efficacité de traduction

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

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

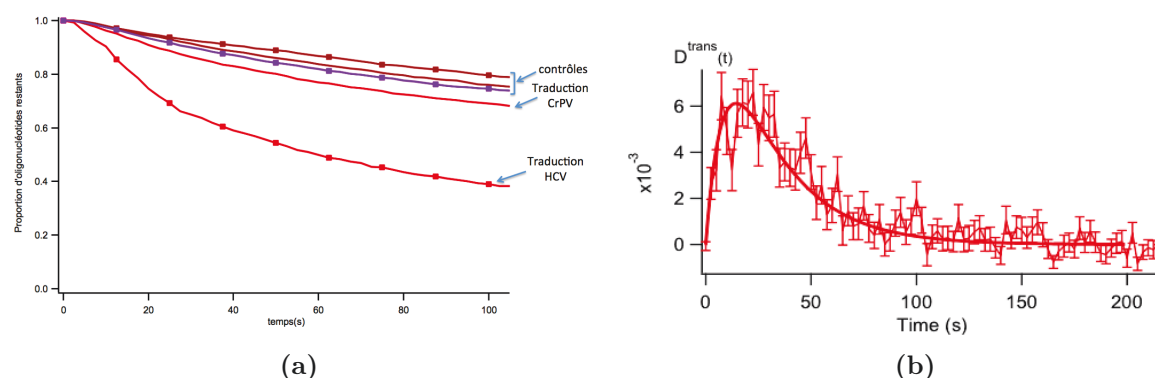


FIGURE 5.5 – Cinétiques de départ de l'oligonucléotide DOWN pour une initiation par une IRES HCV. (a) Courbes représentant la proportion de la population initiale de jalons fluorescents DOWN restants au cours du temps pour respectivement un ARNm CrPV (ainsi que son contrôle associé) et un ARNm HCV (ainsi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

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

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

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

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

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

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

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

5.2 Etude comparative de différentes IRES virales

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

5.2. Etude comparative de différentes IRES virales

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

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

5.2.1.1 Principe de la mesure

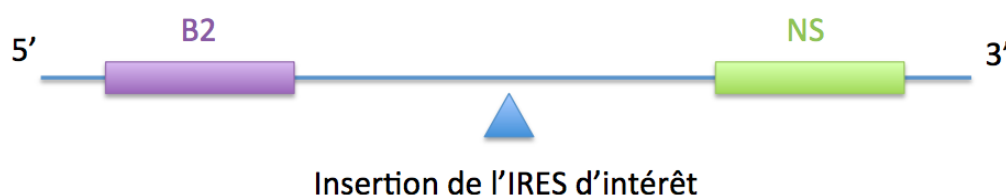


FIGURE 5.6 – ARNm utilisé dans [Borman 1995]. Il contient d'abord le cistron B2, avec initiation canonique, puis le cistron NS, pour lequel l'initiation canonique n'est pas possible. Entre les 2 gènes, les auteurs insèrent une IRES à tester.

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

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

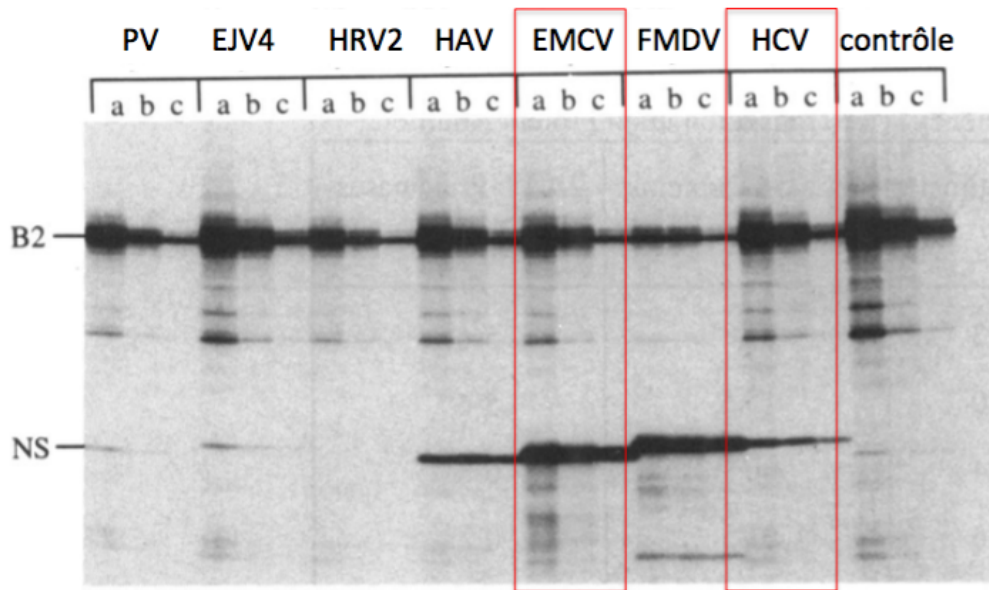


FIGURE 5.7 – Figure adaptée de [Borman 1997]. Gel d'électrophorèse représentant, via la production d'une protéine radioactive, l'efficacité de traduction des protéines B2 et NS pour différentes IRES, et à des concentrations initiales en ARNm différentes.

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

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

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

5.2.1.2 Efficacité d'initiation dans le RRL pur

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

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

5.2. Etude comparative de différentes IRES virales

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

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

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

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

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

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

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

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

5.2.1.4 Bilan global de l'étude

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

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

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

5.2.2.1 Systèmes rapporteurs pour l'étude comparative des IRES

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

5.2. Etude comparative de différentes IRES virales

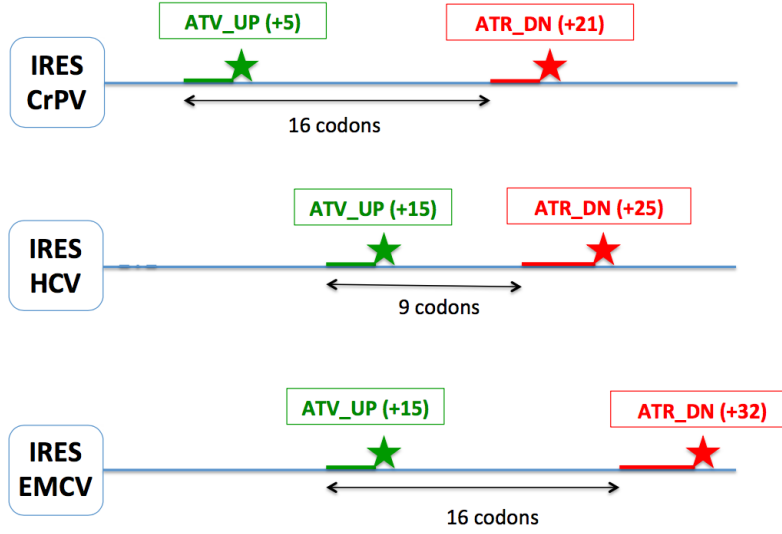


FIGURE 5.10 – Illustration des systèmes rapporteurs utilisés pour l'étude comparative de l'initiation par les IRES CrPV, HCV et EMCV.

5.2.2.2 Obtention des paramètres cinétiques

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

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

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

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

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

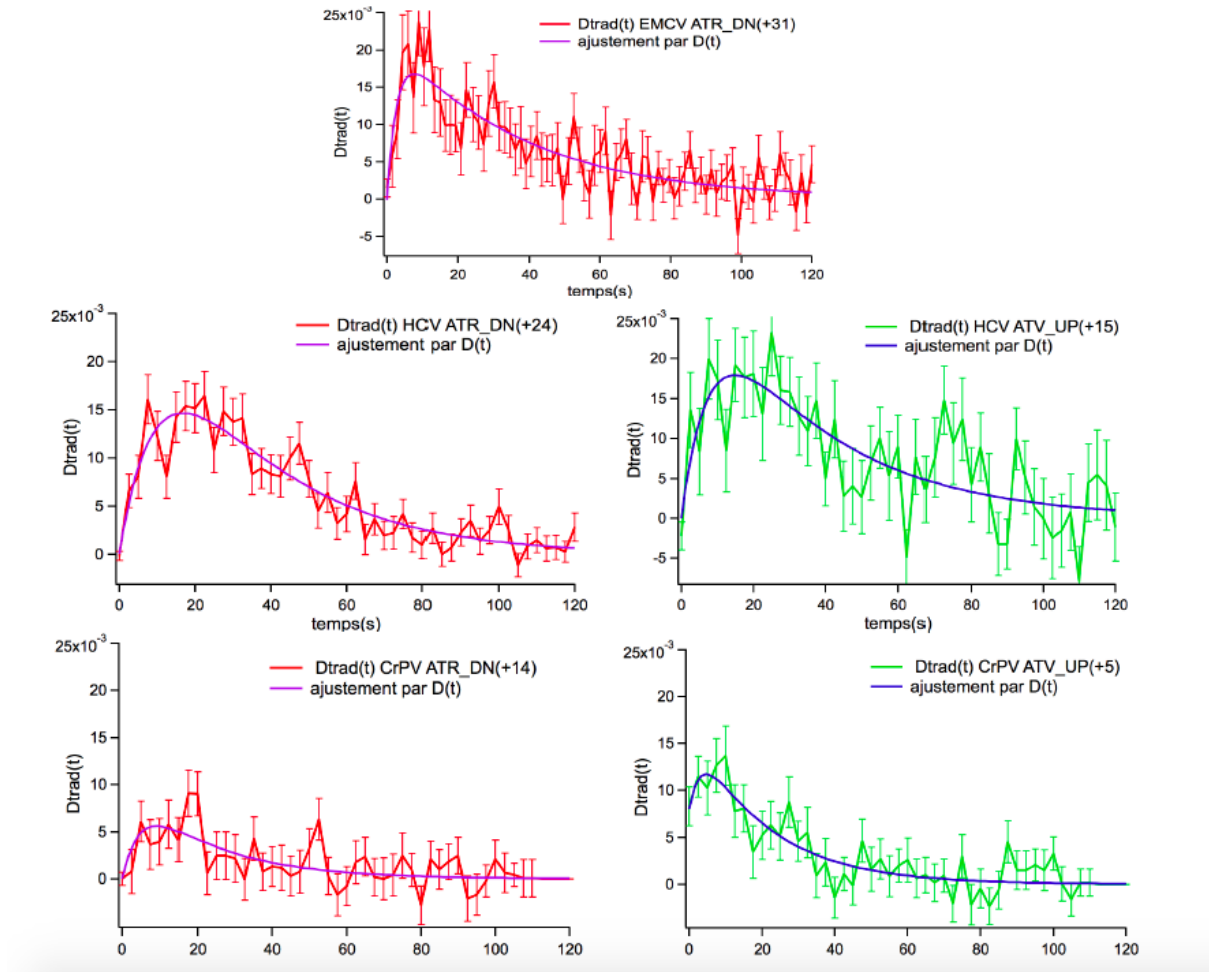


FIGURE 5.11 – Distribution des départs instantanés dans une couleur $D^{trad}(t)$ pour les différentes IRES étudiées. Les courbes rouges correspondent aux cinétiques de départ du jalon fluorescent ATTO rouge en position DOWN. Les courbes vertes correspondent aux cinétiques de départ du jalon fluorescent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

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

5.2.2.3 Comparaison des efficacités d’initiation

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

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

5.2. Etude comparative de différentes IRES virales

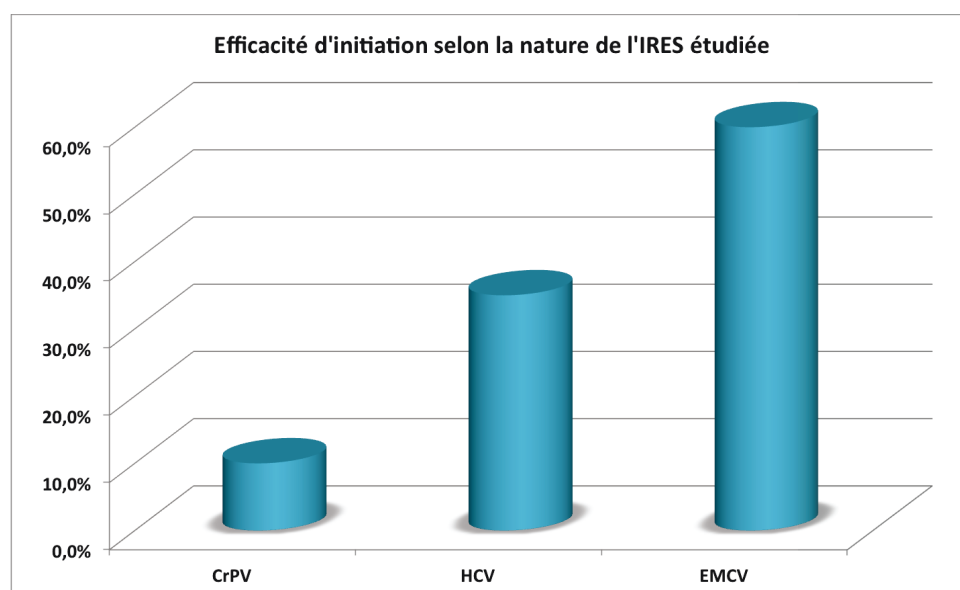


FIGURE 5.12 – Histogramme représentant l'efficacité d'initiation moyenne pour les trois IRES étudiées : CrPV, HCV et EMCV.

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

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

5.2.2.4 Comparaison des paramètres temporels

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.2. Etude comparative de différentes IRES virales

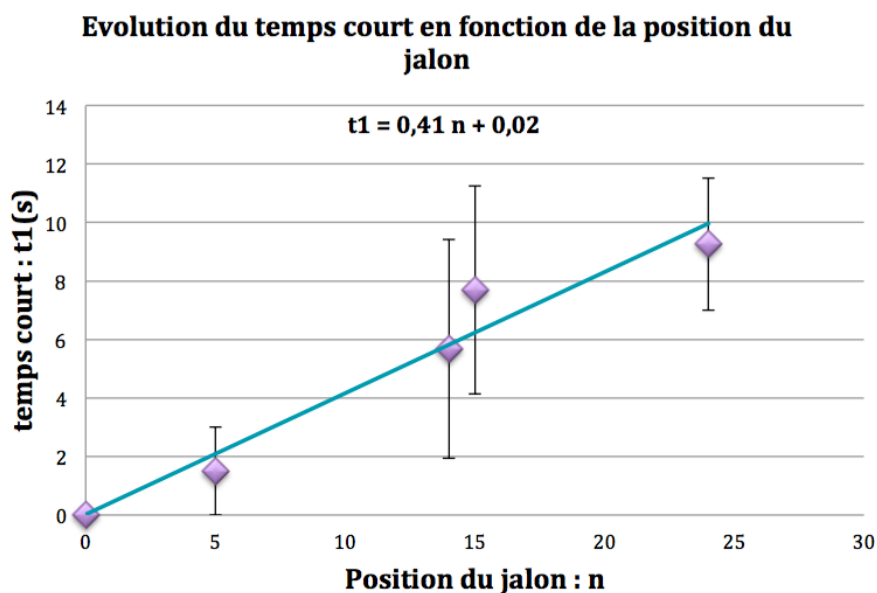


FIGURE 5.14 – Graphique illustrant l'évolution du temps court t_1 en fonction de la position du jalon fluorescent sur l'ARNm qui est détaché par le ribosome. Cette évolution est ajustée par une courbe de tendance linéaire de coefficient directeur $a=0,41$.

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

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

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

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

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

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

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

5.2.2.5 Perspective pour l'étude comparative des structures IRES

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

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

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

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

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

5.3. Conclusion

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

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

5.3 Conclusion

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

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

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

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

Conclusion générale

Nous avons exposé au cours de ce travail de thèse, les réalisations associées à une approche d'étude de la traduction eucaryote à l'échelle de la molécule unique, développée dans l'équipe molécule unique au sein du Laboratoire Charles Fabry. Notre approche pour étudier la traduction eucaryote consiste à hybrider deux oligos marqués sur l'ARNm de sorte que le départ de ces oligos témoigne du passage du ribosome à des endroits précis de l'ARNm et permette de calculer la vitesse moyenne d'élongation entre deux points. Pour observer les oligos marqués et détecter leurs départs de l'ARNm, nous avons utilisé un montage de microscopie de fluorescence par réflexion totale (TIRFM).

Sur la base de ce dispositif et d'un protocole expérimental développés et validés lors de précédents travaux de thèse, nous avons étendu les possibilités de la technique pour aller explorer différentes pistes biologiques et en particulier l'étude des événements non canoniques de la traduction eucaryote comme l'initiation par une structure virale IRES ou encore le décalage de la phase de lecture en -1.

C'est la problématique particulière des événements non canoniques qui a motivé l'ensemble des modifications et des améliorations apportées à l'approche expérimentale initiale, pensée dans l'idée de fournir une première preuve de principe. Le premier enjeu en ce sens était de pouvoir éloigner les jalons fluorescents l'un de l'autre sur l'ARN messager. Cette modification impliquait nécessairement une augmentation des sources de bruit de la mesure : le photoblanchiment et les départs spontanés. Partant de ce constat, nous avons travaillé sur le dispositif expérimental tant dans sa composante optique que sur ses autres aspects (thermique, fluide, électronique...) pour minimiser l'impact de ces phénomènes. Dans le même temps, les optimisations apportées avaient un second objectif tout aussi essentiel : apporter à notre système un maximum de stabilité et de confort expérimental lors des prises d'acquisition. Loin d'être un aspect périphérique, il s'agit d'un élément central puisque nous étudions un système biologique complexe qui implique un grand nombre de paramètres expérimentaux. Assurer la reproductibilité de nos mesures est absolument nécessaire et passe par l'optimisation fine de tous les éléments de l'expérience pour assurer une stabilité de nos paramètres expérimentaux au cours du temps.

Au terme de ce processus d'optimisation, nous sommes effectivement parvenus à un dispositif de TIRFM stable au point que nous pouvons interrompre nos expériences et les reprendre plusieurs mois après, en ayant seulement quelques réglages mineurs à apporter. Du point de vue de l'expérience elle-même, nous nous sommes approchés de ce que l'on peut considérer comme l'expérience idéale. Nous avons assuré une bonne stabilité des paramètres extérieurs à l'échantillon biologique, et avons optimisé cet échantillon lui-même de manière à assurer l'acquisition d'une statistique de mesure conséquente lors d'une expérience. Les sources de bruit principales de notre mesure ont été minimisées par différentes stratégies, conduisant à des acquisitions dont on extrait plus facilement la cinétique de traduction.

Grâce à l'ensemble des améliorations apportées, nous sommes parvenues à obtenir une cinétique de traduction pour un système rapporteur dont les jalons fluorescents ont été écartés. Bien sûr entre l'acquisition et l'interprétation des cinétiques, un important travail de traitement

des données brutes et d'ajustement des cinétiques extraites doit être réalisé. Ce processus de traitement des données a majoritairement été développé lors de la thèse de Nicolas Fiszman, et a montré sa robustesse tout au long de ma thèse. Je n'ai eu à y apporter que des modifications mineures.

Les premières conclusions biologiques de notre étude ont concerné l'initiation par l'IRES virale du Cricket Paralysis Virus utilisée pour initier notre système biologique. Les ribosomes sont initialement pré-attachés sur l'IRES. Les mesures cinétiques ont mis en lumière une cinétique d'initiation et d'élongation gouvernées par deux temps caractéristiques : un temps court et un temps long. Nous assimilons le temps court au temps caractéristique d'élongation du ribosome et le temps long au temps nécessaire pour que le ribosome puisse s'extraire de la structure IRES avec laquelle il interagit et aborder une phase d'élongation canonique. Cette conclusion va dans le sens des observations de la littérature, qui laissent penser que les interactions entre l'IRES CrPV et le ribosome eucaryote sont des interactions complexes qui justifient l'existence d'une étape cinétique lente lors de ces interactions.

En plus d'écarter la distance entre les deux jalons pour aller vers l'étude des erreurs programmées, nous avons initié une expérience de contrôle consistant à ne pas pré-attacher les ribosomes eucaryotes sur l'IRES, mais à étudier la population concurrente des ribosomes endogènes du RRL, qui sont en mesure de s'initier seuls sur l'IRES CrPV. Nous avons constaté que cette population jouait un rôle minoritaire lorsqu'ils sont en concurrence avec les ribosomes pré-incubés car leur efficacité d'initiation sur l'IRES CrPV est faible. Si on ne les pré-attache pas, seuls 10% des ribosomes présents dans le RRL parviennent à s'initier sur l'IRES. Cette expérience a ouvert pour nous une voie intéressante. Souhaitant travailler avec le système le plus physiologique possible, nous nous sommes demandés comment nous pouvions améliorer l'efficacité d'initiation des ribosomes du RRL sur l'IRES.

Cette problématique nous a amenés à une seconde problématique biologique. Nous avons montré que l'utilisation de l'IRES HCV nous permettait d'augmenter grandement l'efficacité d'initiation des ribosomes du RRL, et donc de réaliser des mesures cinétiques fiables, avec une bonne statistique sur cette IRES. Nous avons décidé de poursuivre dans cette voie en comparant les cinétiques d'initiation et d'élongation pour des ARNm initiés par trois IRES de types différentes : CrPV, HCV et EMCV, EMCV étant identifiée par des études biochimiques comme ayant une très bonne efficacité d'initiation dans le RRL. L'étude cinétique bien qu'encore à un stade préliminaire nous a permis dans un premier temps de mettre à jour l'existence d'une étape cinétiquement lente commune à l'ensemble des IRES étudiées, qui se traduit par l'existence d'une cinétique à deux temps caractéristiques long et court. Mais surtout cette étude nous a permis de confirmer que notre approche était valide dans différentes conditions biologiques et constituait en cela un outil modulable et parfaitement adapté pour aborder des problématiques telles que les erreurs programmées de la traduction eucaryote.

L'étude des erreurs programmées en particulier celle du décalage de la phase de lecture en -1 constitue naturellement la principale perspective sur le long terme de ce travail de thèse. Elle est restée dans notre esprit pendant ces trois années et nous a guidés dans l'établissement de nos objectifs. Nous avons d'ailleurs eu l'occasion d'étudier des systèmes rapporteurs pour lesquels on avait insérés des éléments inductifs de FS-1 entre les deux jalons fluorescents comme illustré

5.3. Conclusion

sur la figure 5.15.

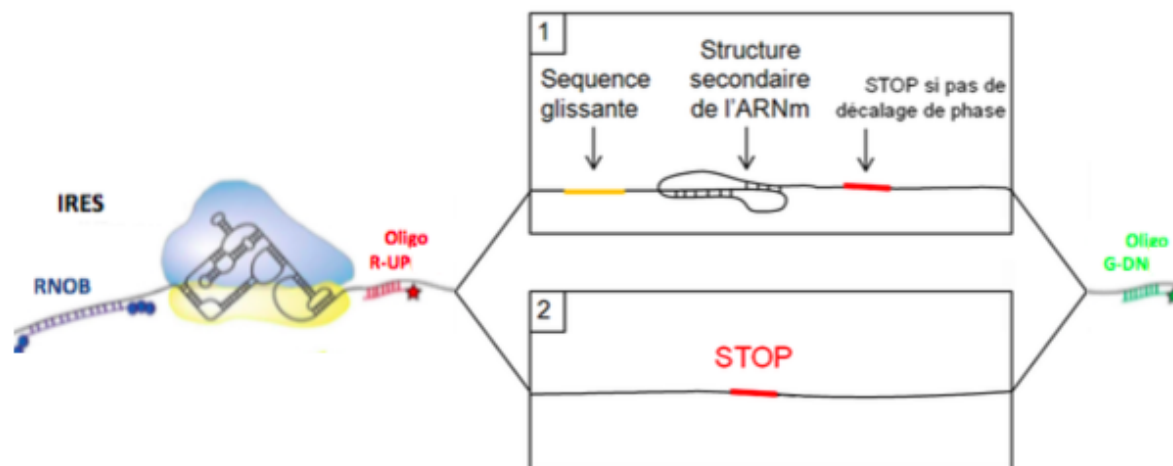


FIGURE 5.15 – Illustration de l’expérience envisagée pour étudier la cinétique du FS-1 avec les éléments inducteurs de la séquence du gène eucaryote IBV. Sur un premier ARNm (en haut), on insère entre les deux jalons fluorescents les éléments inducteurs du FS-1 : la séquence glissante et le pseudonœud. Un codon stop est inséré dans la phase 0, si bien que les ribosomes non affectés par le FS-1 vont s’arrêter de traduire et n’auront détaché que le premier jalon fluorescent tandis que ceux qui sont affectés par le FS-1 ne s’arrêteront pas et vont détacher le second jalon. On distingue de ce fait les deux populations de ribosomes. Un ARNm de contrôle (en bas) est utilisé en parallèle. Dans ce cas, un codon stop est simplement inséré entre les deux jalons, si bien que l’on peut acquérir la cinétique des départs non dus à la traduction pour le second jalon. On pourra renormaliser la cinétique de départ du second jalon pour l’expérience de traduction par celle pour l’expérience de contrôle pour obtenir la cinétique de départ propre aux ribosomes qui se décalent $D_{trad}^{FS}(t)$.

Seulement, du fait de la faible efficacité globale sur ces ARNm (l’initiation se faisait avec l’IRES CrPV), nous n’avons pas réussi à mesurer des cinétiques exploitables. Désormais, nous savons faire des systèmes rapporteurs pour lesquels nous avons une bonne efficacité globale, et nous avons confirmé que nous sommes en mesure de mesurer une cinétique pour des ARNm avec un grand espacement entre les deux jalons fluorescents. Nous pouvons donc à nouveau aborder cette problématique biologique. Le temps de pause du ribosome au niveau des éléments stimulateur de FS-1 a été évalué dans la littérature à plusieurs dizaines de secondes et est de fait mesurable par notre approche expérimentale. Nous pouvons ainsi espérer observer au niveau de l’histogramme un décalage du temps caractéristique d’élongation par rapport à un ARNm qui ne possède pas les séquences stimulatrices. On peut aussi réaliser des expériences à une seule couleur comme décrit dans la légende de la figure 5.15, pour évaluer la valeur du temps de pause au niveau de la séquence glissante.

Du point de vue du dispositif expérimental, on peut également identifier des perspectives à plus ou moins long terme qui permettraient d’améliorer encore les conditions expérimentales

de notre étude. Dans une perspective de moyen terme on peut citer par exemple l'amélioration de notre système microfluidique qui aujourd'hui est un système maison plutôt artisanal. Nous pourrions imaginer un système plus automatisé, qui permettrait d'injecter instantanément les différentes solutions au niveau de la zone observée. Ce serait en particulier une avancée importante pour estimer avec une meilleure précision le temps initial d'acquisition de nos films. Aujourd'hui il correspond à l'arrivée du RRL sur la zone d'analyse, mais nous savons que nous avons une erreur systématique sur l'évaluation de cet instant initial, en partie due à une injection pas parfaitement instantanée. De façon plus générale, nous allons vers une automatisation de plus en plus importante de l'ensemble du dispositif expérimental pour limiter les biais de mesure liés simplement au facteur humain, et aux différentes manipulations répétitives que nous multiplions. L'objectif n'est pas de réaliser un prototype commercial et compact mais plutôt d'assurer un confort d'utilisation pour l'expérimentateur. Cette dimension est particulièrement importante dans la mesure où cette technique expérimentale pourrait être à terme transférée totalement dans le laboratoire de biologie moléculaire. Elle devra alors être accessible dans son utilisation à un public de non spécialistes.

Pour ce qui concerne les perspectives techniques sur le long terme, nécessitant un investissement expérimental nettement plus conséquent, nous pourrions nous tourner vers la technique du Zero Mode Waveguide, qui nous permettrait de travailler dans des conditions beaucoup plus physiologiques, n'étant plus limités par la concentration en molécules marquées. Passer à cette technique de molécule unique constituerait un projet de thèse en soi, mais pourrait apporter de grands bénéfices sur le plan expérimental.

Quelles que soient les perspectives de ce travail de thèse, il constitue la démonstration des potentialités qui naissent de l'interaction interdisciplinaire. En mutualisant tout à la fois des connaissances, des techniques, mais aussi et surtout une approche scientifique propre à nos disciplines d'origines, nous sommes parvenus à développer une approche expérimentale originale et particulièrement adaptée pour aborder une problématique biologique complexe et riche comme la traduction eucaryote. Nous avons su retirer des interactions et des réflexions partagées entre nos deux équipes des solutions au quotidien face à toutes les difficultés qui se sont présentées, et ce projet ne cesse encore et encore de progresser dans la vision d'un objectif commun.

Protocoles de préparation des échantillons pour une expérience en molécule unique

A.1 Protocoles de nettoyage des échantillons en amont

Entre chaque journée d'expérience, nous devons démonter l'échantillon et nettoyer les éléments qui constituent la cellule microfluidique en vue d'une nouvelle utilisation. Nous nettoyons ces éléments grâce à deux protocoles distincts.

A.1.1 Nettoyage de la partie réutilisable de la cellule microfluidique

La partie réutilisable est constituée d'une lame de microscope en verre trouée en deux points. Les trous ont un diamètre de 1 mm et sont espacés de 50 mm. Au niveau d'un des trous, on trouve un réservoir en PDMS de volume interne 100 μ l typiquement. Dans le second trou un capillaire en PTFE de diamètre interne 0,3 mm et de diamètre externe 0,7 mm est inséré avec autour un second plot de PDMS pour le maintenir et assurer l'étanchéité. Pour nettoyer ces éléments, on réalise successivement deux étapes :

1. On laisse tremper l'ensemble du système plusieurs heures dans un bain de RNaseZAP (Sigma Aldrich), produit permettant de neutraliser les RNases (enzymes présentes notamment sur notre peau, qui détruisent les ARN) pour éliminer toute contamination potentielle. En effet, malgré nos précautions (gants, définition d'une zone sans RNase), il est toujours possible qu'un de nos échantillons soit contaminé par ces enzymes. Le produit est également injecté dans les tuyaux en PTFE.
2. Après avoir sorti les lames du bain RNase, nous éjectons le produit des tuyaux en injectant de l'air, et ce, plusieurs fois de suite. Nous nettoyons ensuite le réservoir et les tuyaux successivement avec de l'acide chlorhydrique concentré à 1M, de l'acétone et de l'eau ultrapure. Avant l'injection de chaque produit, on injecte de l'air dans les tuyaux en PTFE pour expulser le produit précédent. On laisse ensuite les lames sécher.

A.1.2 Nettoyage des lamelles de microscope

Les lamelles de microscope qui constituent la partie non réutilisable de la cellule microfluidique doivent aussi être préalablement nettoyées avant d'être utilisées pour nos expériences. Nous souhaitons éliminer les impuretés fluorescentes présentes sur le verre. Pour cela nous réalisons le protocole suivant :

Annexe A. Protocoles de préparation des échantillons pour une expérience en molécule unique

1. Les lamelles sont disposées dans un rack en verre pouvant en contenir une vingtaine, lui-même disposé dans un récipient en verre préalablement nettoyé à l'acétone. On remplit le récipient avec de l'acétone pure. Les lamelles doivent baigner intégralement dans l'acétone.
2. On ferme le récipient avec un couvercle en verre et on le dépose dans la cuve d'un nettoyeur à ultrasons. On remplit la cuve d'eau ultrapure presque à hauteur du couvercle du récipient. On lance un cycle de nettoyage par ultrasons pendant 25 min.
3. Après ce premier cycle, on vide le récipient et on le remplit à nouveau, mais cette fois avec de l'eau ultrapure. Le récipient est placé dans la cuve et on réitère un cycle de nettoyage de 25 min.
4. A la fin des 25 minutes, on vide le récipient et on le remplit à nouveau d'eau ultrapure. On lance un dernier cycle de 25 min.
5. Le rack et les lamelles sont extraites du récipient et mises à sécher dans une atmosphère protégée (au moins un nuit de séchage avant le montage de la cellule microfluidique).

A.2 Protocoles de préparation des échantillons

La préparation de l'échantillon commence la veille de l'expérience par le montage de la cellule microfluidique décrite dans le chapitre 2, section 2.3.1.1. Une fois cette cellule montée à partir de sa partie réutilisable et des lames de verre propres (soumises préalablement 10 min à un plasma d'oxygène. $P_{O_2} = 0,6$ mbar), on commence le protocole de chimie de surface.

A.2.1 Protocole de chimie de surface

Recette des Tampons TRIS salé (50 mM final en TRIS et 250 mM final en NaCl, pH=7,5) et Borate (100 mM final en acide borique, pH=8,8) Deux tampons sont utilisés dans notre protocole de chimie de surface : le tampon borate et le TRIS HCl. Les recettes de ces tampons sont données ci-dessous :

Préparation du tampon TRIS HCl salé 1x

- On dissout 303 mg de TRIS (trishydroxyméthylaminométhane) en poudre dans 30 ml d'eau ultrapure.
- On ajoute 730 mg de NaCl en poudre pour obtenir une solution de TRIS dite salée. On ajoute de l'eau ultrapure si la dissolution est difficile.
- On mesure le pH (à l'aide d'un pHmètre) et on ajuste ce pH à 7.5 grâce à l'adjonction d'une solution de HCl concentrée à 1 M¹. Une fois le bon pH atteint, on complète avec de l'eau ultrapure jusqu'à atteindre le volume final de 50 ml. Cette solution finale de TRIS HCl salé peut être conservée à température ambiante.

Préparation du tampon borate

- On dissout 310 mg d'acide borique H_3BO_3 en poudre dans 30 ml d'eau ultrapure.

1. Il faut ajouter généralement plusieurs ml de solution de HCl à 1 M.

A.2. Protocoles de préparation des échantillons

- On mesure le pH (à l'aide d'un pHmètre) et on ajuste ce pH à 8.8 grâce à l'adjonction d'une solution de soude NaOH concentrée à 10 M². Une fois le bon pH atteint, on complète avec de l'eau ultrapure jusqu'à atteindre le volume final de 50 ml. Cette solution finale de tampon borate peut être conservée à température ambiante.

Etapes de la chimie de surface

1. Pour la première étape de passivation, on dilue 20 mg de PEG-Silane en poudre (aliquoté et conservé à -80 °C) dans 400 µl de tampon borate jusqu'à dissolution totale. Cette solution est ensuite mélangée à 5 µl de solution de biotine-PEG-Silane (dilué à 200 g/l dans du méthanol et conservé à -80 °C sous la forme d'aliquots de 5 µl). On injecte le mélange dans les canaux des cellules microfluidiques (40 µl par échantillon).
2. Le mélange incube une heure à température ambiante.
3. Après une heure, on rince le canal avec du TRIS HCl. On prépare de suite une solution de BSA (Bovine Serum Albumine). La BSA se présente sous forme de cristaux que l'on dissout dans le TRIS à une concentration de 10 g/l. On prépare environ 1 ml de cette solution que l'on répartit dans l'ensemble des réservoirs. On injecte cette solution.
4. La solution de BSA incube environ 12h00 (toute la nuit) à température ambiante dans les échantillons
5. Le matin (jour de l'expérience), on rince la solution de BSA avec du TRIS HCl. On prépare alors une solution de neutravidine diluée à 0,1 g/l dans du TRIS HCl, que l'on injecte dans l'ensemble des canaux.
6. La neutravidine doit incuber au minimum 5 min. L'échantillon est alors prêt à recevoir les systèmes biologiques.

A.2.2 Préparation et injection des systèmes biologiques

Protocole de préparation de l'hybridation mère

5 µl d'ARN messenger (1 µM)
2 µl oligo-fluorophore rouge (10 µM)
2 µl oligo-fluorophore vert (10 µM)
0,5 µl oligonucléotide biotinylé (10 µM)
0,5 µl tampon T4DNA ligase

10 µl d'hybridation mère (0,5 µM en ARNm; 0,25 µM en oligo-biotine et 2 µM en oligo-fluorophores rouge et vert)

Cette solution est incubée 5 min à 68 °C, 5 min à 37 °C et enfin 5 min dans la glace à 4 °C.

Série de dilution On n'injecte pas l'hybridation mère telle quelle, on effectue d'abord deux dilutions successives dans un tampon appelé tampon B (recette dans le paragraphe suivant). On réalise systématiquement une première dilution au 1/100^e puis une seconde dilution environ au

2. Il faut ajouter généralement environ 50 µl de solution de NaOH à 10 M.

Annexe A. Protocoles de préparation des échantillons pour une expérience en molécule unique

1/25^e, qui peut varier selon les échantillons. La solution diluée est chauffée 10 min à 30 ° C avant d'être injectée dans l'échantillon.

Recette du Tampon B

333 µl de solution d'acétate de sodium (3 M)
1 ml de solution d'acétate de potassium (1 M)
8,421 ml d'eau ultrapure
200 µl de solution d'Hepes (1 M ; pH=7,8)
25 µl de solution d'acétate de magnésium (1 M)
20 µl de solution de DTT (1 M)
1 µl de solution de spermidine (2,5 M)

10 ml de solution finale de Tampon B (20mM Hepes pH = 7,8 ; 250mM acétate de sodium ; 100 mM acétate de potassium ; 2,5 mM acétate de magnésium ; 2 mM DTT et 0,25 mM spermidine)

A.2.3 Préparation et injection du RRL dans l'échantillon

Recette du Lysat de réticulocyte de lapin : RRL

17,5 µl de RRL pur (Promega)
6 µl eau ultrapure
1 µl SuperaIn
0,5 µl acides aminés-Met (Promega)

19 µl de solution de RRL

On injecte cette solution dans l'échantillon installé sur le microscope lorsque l'on veut commencer à acquérir la cinétique de traduction.

Protocole de fabrication des ARN messagers rapporteurs

B.1 Principe du protocole

La fabrication des ARN messagers part de la construction d'un plasmide d'ADN jusqu'à la production en quantité de l'ARN messenger correspondant. En fait, il existe deux parties à ce protocole de fabrication. La première partie consiste à insérer la séquence d'intérêt (commerciale et vérifiée par séquençage) dans un vecteur appelé pUC19. Les vecteurs plasmidiques sont de petites molécules d'ADN circulaire qui servent de véhicule pour la multiplication et la sélection de l'insert d'intérêt. Les vecteurs sont capables de se répliquer de manière autonome dans une cellule hôte donnée. Ils possèdent également un gène de sélection (gène de résistance à un antibiotique), de façon à ce que seules les cellules hôtes qui expriment le plasmide puissent survivre et proliférer.

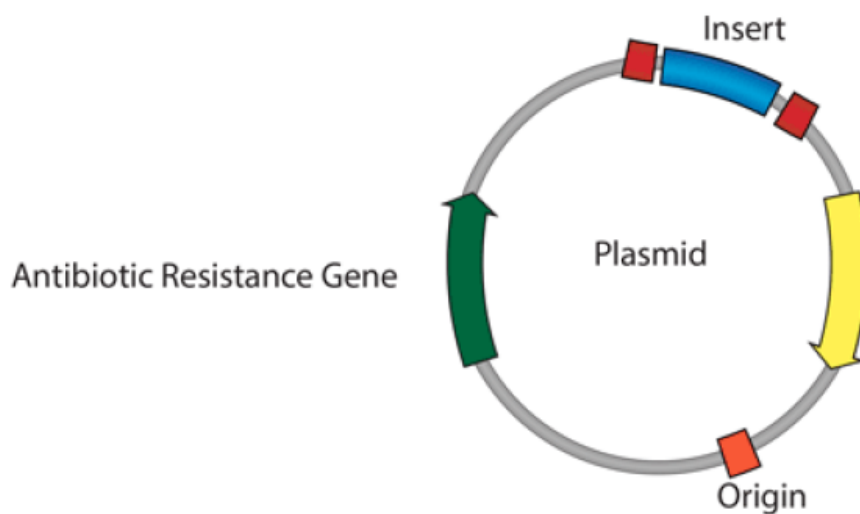


FIGURE B.1 – Plasmide correspondant à la combinaison d'un vecteur ADN plasmidique et de la séquence d'intérêt. En orange l'origine de répllication, en jaune le gène de résistance aux antibiotiques et en bleu la séquence d'intérêt.

On insère la séquence d'intérêt dans le vecteur pUC19; l'ensemble forme un plasmide dit recombiné (on parlera de plasmide par la suite). Je ne me suis jamais impliquée moi-même dans la construction du plasmide, réalisée par nos collaborateurs biologistes, je ne la décrirai donc pas en détail.

Une fois le plasmide construit et validé, il nous faut le produire en grande quantité et effectuer les étapes qui permettront de passer d'un ADN à de l'ARNm, forme utile pour nos expériences. Cette seconde partie correspond à un protocole de biologie moléculaire dont la plupart des étapes sont des protocoles classiques. J'ai réalisé moi même à plusieurs reprises les étapes du protocole permettant d'aboutir à des ARN messagers à partir d'une construction donnée. Il y a plusieurs raisons à cet investissement. C'était d'abord un passage nécessaire pour prendre conscience des contraintes associées à cette étape pour nos collègues biologistes. En effet, le protocole décrit ci-dessous se déroule au minimum sur une semaine et bien souvent, du fait d'aléas expérimentaux, sur deux à trois semaines. Prendre conscience de cette limitation est essentiel quand on travaille avec des échantillons biologiques de cette sorte, elle prend par exemple toute son importance quand nous devons considérer la nécessité de produire de nouveaux échantillons. De plus, il n'y avait pas un recouvrement complet entre ma thèse et celle d'Olivier Bugaud, doctorant biologiste sur le projet, il était donc important que j'acquière au maximum une autonomie sur la fabrication de nos échantillons. Je décrirai dans cette annexe l'ensemble du protocole qui permet de passer d'une construction sous la forme d'un ADN plasmidique à nos ARN messagers prêts à être étudiés en molécule unique.

B.2 Déroulement du protocole

B.2.1 Description des différentes étapes

B.2.1.1 Étapes de vérification

Tout au long du protocole, nous sommes amenés à vérifier les produits de chaque étape et leurs concentrations respectives. Nous utilisons pour ça deux outils : le passage sur gel d'électrophorèse et la mesure avec un spectromètre par absorption (nanodrop).

Mesure au nanodrop Pour mesurer la concentration en ADN ou en ARNm d'une solution on utilise un spectromètre par absorption ou nanodrop. On dépose d'abord une goutte d'eau sur le capteur pour faire le blanc puis on dépose 1 μ l de la solution d'intérêt. L'appareil mesure la densité optique de la solution à 260 et à 280 nm pour en déduire la concentration en ADN ou en ARNm ainsi que la pureté de la solution en espèce cible. Les mesures effectuées sont informatives mais doivent être considérées avec un regard critique car elles sont peu précises.

Vérification sur gel d'électrophorèse Le principe du gel d'électrophorèse est le suivant : on coule un gel d'agarose avec à une de ses extrémités des puits dans lesquels on dépose les solutions à analyser. Ces solutions sont mélangées à un tampon de charge qui permet de visualiser la migration mais aussi de faciliter le dépôt des échantillons dans les puits car le tampon de charge contient du glycérol. Le gel est déposé dans une cuve remplie d'un tampon spécifique (Tampon TAE). Une fois les produits déposés dans les puits, on ferme la cuve et on applique un champ électrique. Sous l'effet de ce champ les molécules d'intérêt (naturellement chargées négativement) migrent dans la matrice de gel, et vont migrer plus ou moins loin selon leur taille spécifique. On utilise dans un puit une échelle de marqueur de poids moléculaire (solution d'ADN ou d'ARN appelée "ladder") qui nous permet d'identifier la taille des molécules qui ont migré.

B.2. Déroulement du protocole

Pratiquement à chaque étape du protocole, on réalise un gel d'électrophorèse pour vérifier que l'on a bien les produits souhaités dans notre solution.

Protocole de réalisation d'un gel d'électrophorèse à 0,8% en agarose (on utilise parfois des gels à 2%, en particulier pour les ARNm)

- Pour réaliser le gel d'agarose à 0,8%, mélanger 0,8 g de poudre d'agarose avec 100 ml de tampon TAE. Chauffer au micro onde pour dissoudre totalement l'agarose.
- Refroidir tout en mélangeant jusqu'à ce qu'il soit facile de le prendre en main.
- Couler le gel dans un moule spécial et ajouter la grille qui moule les puits (cf. figure B.2).
- Laisser polymériser 10 min.
- Immerger le gel sec dans la cuve. Le tampon TAE¹ doit juste recouvrir le gel.
- Mélanger le bleu de méthylène avec la solution d'intérêt (En général on s'arrange pour que l'échantillon de solution contienne environ 1 µg de molécules cibles : ADN ou ARNm)
- Injecter dans un puit à part 5 µl de ladder (point de repère pour le poids des molécules).
- Fermer la cuve et régler sur 135 V pendant 10 min puis 50 V pendant 40 min.

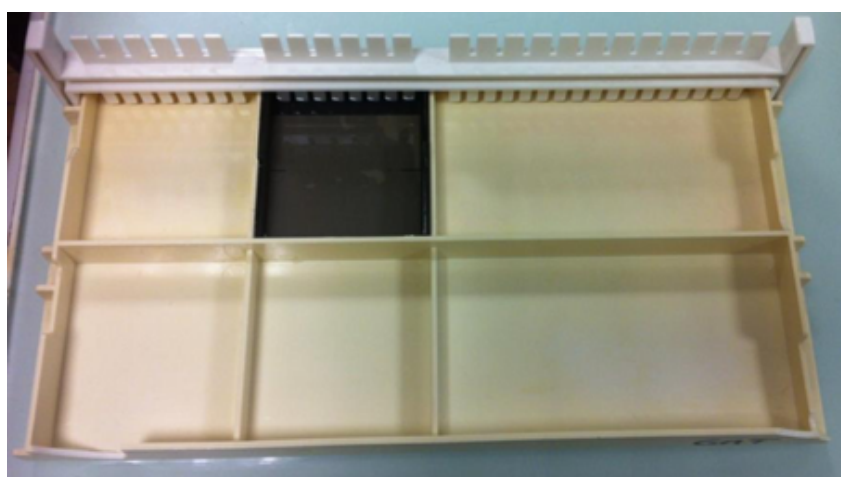


FIGURE B.2 – Photographie de l'étape de coulage d'un gel d'agarose avec 8 puits millimétriques à une de ses extrémités (en haut).

B.2.1.2 Transfection et transformation : Etape 1 de la figure B.4

La première étape du protocole consiste à passer d'une solution qui contient très peu d'ADN à plusieurs solutions en contenant une grande quantité. En effet nous avons besoin d'une grande quantité initiale d'ADN pour réaliser sereinement les étapes suivantes du protocole. La solution initiale de construction n'excède parfois pas 5 µl, nous devons constituer une réserve d'ADN pour nous assurer de pouvoir produire nos échantillons quand nous en avons besoin sans repasser

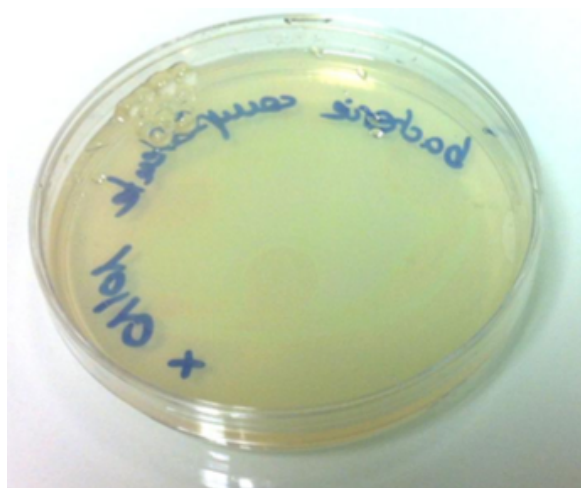
1. Tris/Acétate 40 mM - EDTA 1 mM - pH 8

Annexe B. Protocole de fabrication des ARN messagers rapporteurs

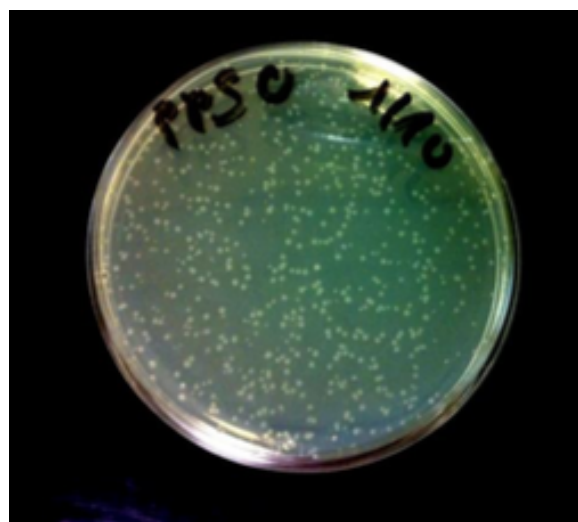
par l'étape de construction (elle aussi très chronophage). Aussi les deux premières étapes du protocole consistent à produire une grande quantité d'ADN à partir d'à peine 1 μl de la solution initiale. On parle d'amplification. Pour cela on va intégrer l'ADN dans le génome de bactéries dites compétentes. En se multipliant de façon exponentielle, elles amplifieront l'ADN d'intérêt avec elles. On appelle ce processus : la transformation.

Protocole de transfection et de transformation

1. D'abord on mélange une toute petite quantité de la solution d'ADN initiale avec les bactéries selon la recette suivante : 1 μl solution ADN + 100 μl bactéries compétentes.
2. Incubation 20 min dans la glace.
3. On trempe le mélange 45 s à 42 ° C. Cette étape est appelée transfection. Le choc thermique rend la membrane des bactéries perméable, ce qui leur permet d'intégrer le plasmide.
4. On ajoute 900 μl de milieu de culture LB et on laisse reposer l'ensemble 45 min à 37 ° C. En effet l'ADN contient un gène de résistance à l'ampiciline (antibiotique). Pendant ces 45 min, les bactéries vont exprimer ce gène et donc la résistance.
5. Sous hotte stérile, on étale le mélange sur des boîtes de Pétri dans lesquelles on a coulé au préalable un milieu de culture contenant de l'ampiciline (cf. figure B.3a). Seules les bactéries résistantes à l'antibiotique peuvent se développer dans ce milieu. On étale seulement 10 μl du mélange sur certaines boîtes et 50 μl sur d'autres.
6. Les boîtes de Pétri sont placées dans une étuve à 37 ° C toute la nuit pour laisser le temps aux bactéries de proliférer.



(a)



(b)

FIGURE B.3 – Photographies des boîtes de Pétri utilisées pour l'étape de transformation. (a) Boîte de Pétri au moment de l'épandage de la solution de bactéries compétentes ayant incorporé le plasmide. Le fond de la boîte de Pétri est constitué par un milieu de culture LB avec de l'ampiciline. (b) Boîte de Pétri après une nuit passée en étuve à 37 ° C. On observe des points blancs qui correspondent à des colonies de bactéries s'étant développées pendant la nuit.

B.2. Déroulement du protocole

B.2.1.3 Mise en culture : Etape 2 de la figure B.4

Le lendemain, on récupère les boîtes de Pétri qui contiennent maintenant des colonies de bactéries (points blancs sur l'image B.3b). On va réaliser l'étape de mise en culture :

1. Sous hotte stérile on prélève avec un cure-dent une colonie de bactéries que l'on dépose dans un tube en verre contenant 6 ml de milieu de culture LB avec ampicilline.
2. Les tubes sont placés dans des étuves à 37 ° C, sur des supports qui assurent une rotation régulière des tubes à l'horizontale afin d'assurer un mélange permanent du milieu.
3. On laisse la culture se développer au minimum 16 heures (en général toute la nuit).

Le lendemain, on récupère les tubes contenant les cultures de bactéries qui se sont multipliées pendant la nuit. Si les étapes précédentes ont bien fonctionné, le liquide est trouble et blanchâtre, signe de la présence d'une grande quantité de bactéries. La transformation et l'amplification sont terminées, nous devons maintenant extraire et purifier l'ADN produit par les bactéries.

B.2.1.4 Extraction et purification de l'ADN : Etape 3 de la figure B.4

On transfère les 6 ml de mélange bactéries+milieu de culture dans des tubes de 2 ml. Pour cela on commence par prélever 2 ml dans un tube. On passe le tube à la centrifugeuse pendant 20 s (vitesse : 11 000 g). Un culot de bactéries se forme au fond du tube. On aspire le liquide surnageant (qui ne contient presque plus de bactéries) et on réitère l'opération deux fois pour récupérer l'ensemble des bactéries au fond du tube. On suit ensuite le protocole d'un kit de minipréparation. Ce kit contient l'ensemble des produits et le matériel utilisé pour extraire et purifier des ADN plasmidiques. On suit la procédure suivante :

1. On resuspend les bactéries avec un tampon spécial. Le culot doit entièrement se dissocier dans le tampon. Pour cela on passe le tube au moins une minute dans un agitateur vortex.
2. On ajoute alors un tampon de lyse. Ce tampon va venir détruire la membrane des bactéries pour en extraire l'ADN. On laisse agir 1 min.
3. On interrompt la lyse avec un tampon dédié. A ce moment là, on peut observer dans le tube les restes des bactéries lysées qui forment un amas blanchâtre.
4. Après l'action de ce tampon, on centrifuge les tubes. Les restes de bactéries forment un culot tandis que la solution contenant l'ADN surnage au dessus. On récupère cette solution pour la purifier
5. La purification se fait par dépôt sur une petite colonne que l'on dispose dans un tube. La phase solide de la colonne retient l'ADN tandis que le reste de la solution tombe au fond du tube. On dépose les solutions d'ADN à purifier dans la colonne et on passe à la centrifugeuse (11 000 g). Le fond du tube est aspiré.
6. On rince trois fois la colonne avec un tampon de rinçage adapté de façon à éliminer des résidus qui se seraient accrochés en même temps que les ADN. A chaque fois on dépose le tampon de rinçage, on centrifuge l'ensemble à 11 000 g puis on aspire le fond du tube.
7. On transfère la colonne dans un tube 1,5 ml qui contiendra la solution finale. On dépose alors 30 µl d'un tampon d'élution pour récupérer les molécules d'ADN déposées sur la phase solide de la colonne. On laisse agir 1 min puis on passe 1 min à la centrifugeuse (11 000 g).

Annexe B. Protocole de fabrication des ARN messagers rapporteurs

8. On récupère alors 30 μl de solution purifiée d'ADN que l'on vérifie sur gel. On mesure également la concentration finale au nanodrop.

In fine si tout s'est bien passé on a en notre possession une dizaine de solutions d'ADN plasmidique concentrées à 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ environ que l'on peut conserver à -80°C . Cela nous fait une quantité d'ADN totale autour de 300 μg soit plus de cent fois supérieure à la quantité contenue dans la solution initiale. On peut maintenant réaliser les étapes qui conduiront d'un ADN plasmidique vers l'ARN messager souhaité.

B.2. Déroulement du protocole

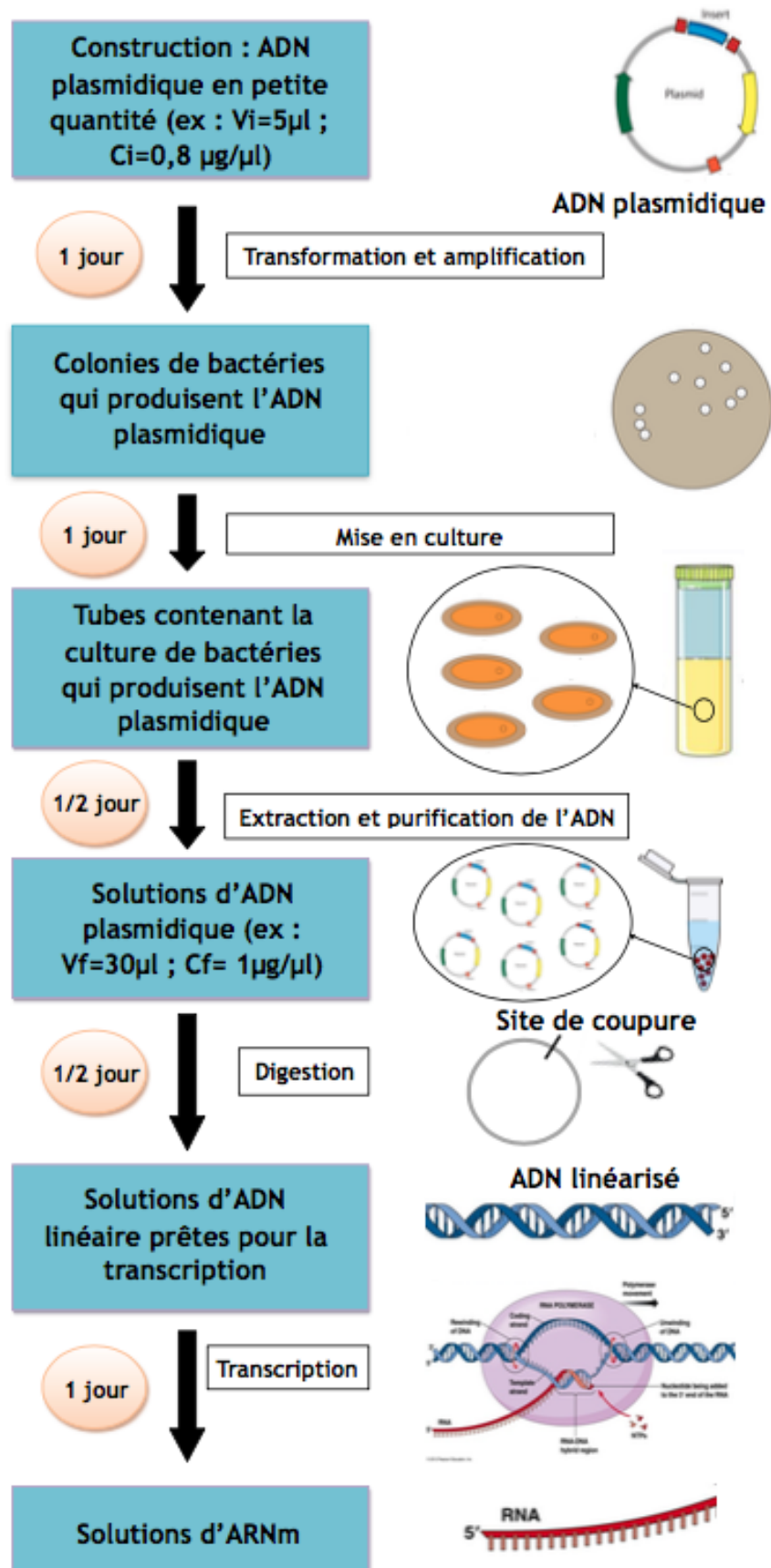


FIGURE B.4 – Schéma explicatif du déroulement du protocole de biologie moléculaire permettant d'aboutir à un ARN messager à partir d'un ADN plasmidique.

B.2.1.5 Digestion de l'ADN : Etape 4 de la figure B.4

La première de ces étapes de transformation est appelée digestion. Elle consiste à utiliser une enzyme spécifique qui va couper l'ADN plasmidique (ADN circulaire) à une position définie, ce qui est nécessaire pour pouvoir le transcrire par la suite. Cette enzyme varie selon les constructions et les ARN messagers que l'on veut produire. Le protocole de digestion peut varier. Il faut prendre en compte les particularités de l'enzyme de restriction (notamment son rendement) mais aussi la concentration de la solution en ADN qui varie selon le déroulement des étapes précédentes. J'en donne ci-dessous un exemple représentatif, pour l'enzyme considérée, 1 µl d'enzyme est adapté pour digérer 1 µg d'ADN plasmidique :

6 µl de solution d'ADN plasmidique (6 µg d'ADN environ dans le cas présent)
258 µl d'eau DEPC²
30 µl de Tampon adapté
6 µl enzyme de restriction

300 µl de solution finale

La solution est placée au bain marie 1 heure à 37 ° C. Après une heure on ajoute 3 µl supplémentaires d'enzymes puis de nouveau 1 heure à 37 ° C. A la fin de la digestion, on prélève quelques µl pour la vérification sur gel. La solution digérée d'ADN linéaires doit également être purifiée. On utilise exactement le même protocole de purification que précédemment lors de la minipréparation (dépôt sur colonne). On aboutit à une solution purifiée avec un volume de 35 µl dont on mesure la concentration au nanodrop. C'est à partir de la solution d'ADN digérée que sera effectuée l'étape cruciale et souvent la plus critique du protocole : la transcription.

B.2.1.6 Étape de transcription : Ultime étape de la figure B.4

La transcription correspond au passage de l'ADN à l'ARN messenger. C'est l'étape finale de notre protocole. Comme le ribosome orchestre la traduction, une enzyme appelée ARN polymérase joue ce rôle pour la transcription. Son action est décrite sur la figure B.5. Dans le cadre de ce protocole il s'agit de l'enzyme polymérase SP6. Comme pour la digestion c'est un protocole qui peut être adapté finement. C'est l'étape la plus complexe et la plus difficile à optimiser du protocole. Ci-dessous est indiqué un exemple de protocole pour la réaction de transcription :

10 µl de solution d'ADN digéré (1 µg d'ADN digéré environ dans le cas présent)
17 µl d'eau DEPC
10 µl de mix rNTP (ATP,GTP,CTP,UTP)
5 µl DTT (0,1 M)
5 µl de tampon adapté
2 µl d'enzyme SP6

50 µl de solution finale

2. Eau traitée avec du Pyrocarbonate d'éthyle. Ce composé chimique est utilisé pour inactiver certaines protéines comme les RNases, responsables de la dégradation des ARN.

B.2. Déroulement du protocole

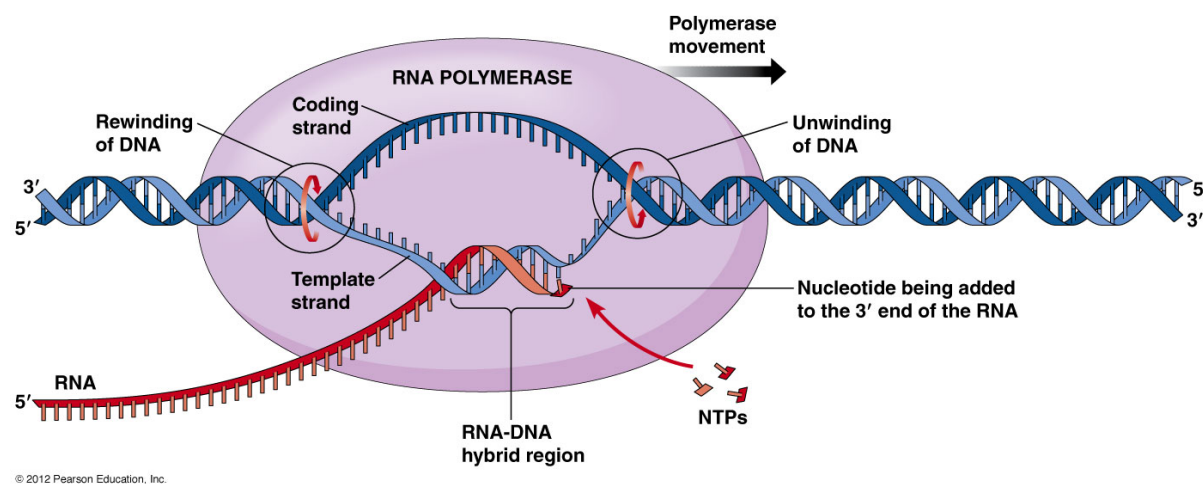


FIGURE B.5 – Schéma descriptif de l'action de l'ARN polymérase qui orchestre la transcription. L'enzyme, au fur et à mesure de son mouvement, va ouvrir le double brin de l'ADN, réaliser une copie qui constituera l'ARN messager puis refermer le double brin. La transcription requiert la présence de ribonucleosides triphosphates ou rNTP qui constituent les briques élémentaires de l'ARN messager.

La solution finale incube 3 heures 30 à 40 ° C. Une fois la réaction de transcription terminée, on prélève quelques µl pour vérification sur gel. On ajoute ensuite dans la solution une enzyme appelée DNase qui détruit les ADN encore présents dans le milieu.

45 µl solution transcrite
3 µl DNase
5 µl tampon adapté

53 µl

On incube 1 heure à 37 ° C, puis on ajoute à nouveau 2 µl de DNase et 30 min à 37 ° C. A la fin de ce traitement DNase on prélève à nouveau 5 µl de la solution pour vérifier sur gel qu'il n'y a plus d'ADN dans la solution. Enfin on purifie notre solution finale d'ARNm sur une colonne spéciale. La colonne est positionnée dans un tube 1,5 ml. Il suffit de déposer le liquide sur la colonne et de passer l'ensemble 8 min dans la centrifugeuse (vitesse : 1 000 g). On récupère dans le tube notre solution d'ARN purifiée. Si le gel précédent indique que l'on a bien produit des ARNm non dégradés et en quantité détectable, on mesure la concentration au nanodrop et on en déduit, en fonction des caractéristiques de l'ARNm, la concentration molaire finale de la solution. On obtient généralement une concentration entre 0.5 µM et 2 µM (selon les ARNm et le rendement de la réaction de transcription). On aliquote les 50 µl de solution par tubes de 5 µl qui seront conservés à -80 ° C pour être utilisés directement lorsque l'on réalise nos expériences en molécule unique.

Article :Kinetics of CrPV and HCV
IRES-mediated eukaryotic translation
using single-molecule fluorescence
microscopy

Kinetics of CrPV and HCV IRES-mediated eukaryotic translation using single-molecule fluorescence microscopy

OLIVIER BUGAUD,^{1,3} NATHALIE BARBIER,^{2,3} HÉLÈNE CHOMMY,^{1,2} NICOLAS FISZMAN,² ANTOINE LE GALL,^{2,4} DAVID DULIN,^{2,5} MATTHIEU SAGUY,¹ NATHALIE WESTBROOK,² KAREN PERRONET,² and OLIVIER NAMY¹

¹Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91190 Gif sur Yvette, France

²Laboratoire Charles Fabry, Institut d'Optique, CNRS, Université Paris-Saclay, 91127 Palaiseau, France

ABSTRACT

Protein synthesis is a complex multistep process involving many factors that need to interact in a coordinated manner to properly translate the messenger RNA. As translating ribosomes cannot be synchronized over many elongation cycles, single-molecule studies have been introduced to bring a deeper understanding of prokaryotic translation dynamics. Extending this approach to eukaryotic translation is very appealing, but initiation and specific labeling of the ribosomes are much more complicated. Here, we use a noncanonical translation initiation based on internal ribosome entry sites (IRES), and we monitor the passage of individual, unmodified mammalian ribosomes at specific fluorescent milestones along mRNA. We explore initiation by two types of IRES, the intergenic IRES of cricket paralysis virus (CrPV) and the hepatitis C (HCV) IRES, and show that they both strongly limit the rate of the first elongation steps compared to the following ones, suggesting that those first elongation cycles do not correspond to a canonical elongation. This new system opens the possibility of studying both IRES-mediated initiation and elongation kinetics of eukaryotic translation and will undoubtedly be a valuable tool to investigate the role of translation machinery modifications in human diseases.

Keywords: eukaryotic translation; IRES; RNA; single molecule

INTRODUCTION

During translation, the ribosome decodes the mRNA sequence in discrete codon steps; tRNAs move from the A- and P-sites to the P- and E-sites, which are universally conserved in all kingdoms of life (Valle et al. 2003). Although the ribosome inner structure is well conserved, eukaryotic translation remains more complicated. The structures of the 80S eukaryotic ribosome, and of its small (40S) and large (60S) subunits, have been elucidated only very recently and show extended rRNA segments together with several eukaryote-specific proteins (Ben-Shem et al. 2011). It is thought that these changes compared to prokaryotic ribosomes are for regulatory purposes to interconnect the ribosomes with several biological pathways (Klinge et al. 2012).

The dynamics of translation are difficult to study using traditional biochemical and biophysical tools, because it is a highly stochastic process, involving multiple steps and fac-

tors. Single-molecule techniques circumvent the need to synchronize the process and have become more and more popular over the last 10 years to study prokaryotic translation kinetics (Cornish et al. 2008; Marshall et al. 2008; Katranidis et al. 2009; Chen et al. 2013, 2014; Rosenblum et al. 2013). Many of them involve specific labeling of the prokaryotic ribosome, which has been achieved thanks to the knowledge of its atomic structure (Yusupov et al. 2001). Recently, Puglisi's group reported the labeling of eukaryotic ribosomes, either by the hybridization of labeled oligonucleotides (Petrov and Puglisi 2010; Fuchs et al. 2015) or by the labeling of eS25 protein (Petrov and Puglisi 2010; Fuchs et al. 2015), without affecting ribosome assembly capacity. However, by fluorescently labeling the ribosome, the tRNA substrates or the elongation factors may modify their behavior in an unpredictable way. Furthermore, most single-molecule fluorescence techniques are limited to a very low concentration of labels in a solution (a few 10 nM typ.), which can also dramatically modify the kinetics of the process (Uemura et al. 2010). Although several clever approaches have been developed to study eukaryotic translation by single-molecule FRET (Ferguson et al. 2015), all of them rely on modifying

³Joint first authors

⁴Present address: Centre de Biochimie Structurale, CNRS and INSERM, 34090 Montpellier, France

⁵Present address: IZKF–Interdisciplinary Center for Clinical Research, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nuremberg (FAU), 91054 Erlangen, Germany

Corresponding authors: olivier.namy@i2bc.paris-saclay.fr, karen.perronet@institutoptique.fr

Article is online at <http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.061523.117>. Freely available online through the RNA Open Access option.

© Bugaud et al. 2017 This article, published in *RNA*, is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial 4.0 International), as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

either the ribosome itself or translational factors like tRNA to attach a fluorescent dye. An approach with unmodified translational components is of great interest to analyze eukaryotic translation dynamics, as shown by the recent *in vivo* quantification of translational speed (Morisaki et al. 2016; Murray et al. 2016; Wang et al. 2016; Wu et al. 2016).

Here, we report on eukaryotic translation kinetics starting from an internal ribosome entry site (IRES)-mediated initiation and ongoing over several elongation cycles using a single-molecule total internal reflection fluorescence microscopy (sm-TIRFM) with unmodified mammalian translation machinery, ensuring that labeling will not denature translation. Only the mRNA is labeled through the annealing of short fluorescent RNA probes (see Fig. 1A), which can be detached by the ribosome because of its helicase activity, as shown previously (Takyar et al. 2005).

Translation initiation usually requires the correct positioning of the aminoacyl-tRNA in the ribosomal P-site. In eukaryotes, this is achieved by a large number of initiation factors, allowing the 40S together with the ternary complex (eIF2-tRNA-GTP) to scan the 5' part of the mRNA until

the initiator tRNA is correctly base-paired with the start codon in the P-site. Viruses have developed numerous translational strategies to express viral proteins or to divert host translation machinery for their own benefit (Firth and Brierley 2012). Among them, internal initiation is commonly used to bypass the requirement of the eIF4 complex (Thompson 2012; Wang et al. 2013). IRES are grouped into four categories that differ with respect to their secondary structure, the translation initiation factors they require, and whether or not they recruit the ribosome upstream of the initiation codon or directly at it.

To initiate translation, we first use the intergenic region cricket paralysis virus IRES (hereafter simply referred to as CrPV IRES). This is a type IV IRES, enabling the ribosome to translate its mRNA independently of any cellular initiation factors (Wilson et al. 2000). A large number of genetic, biochemical, and structural studies have contributed to characterize this IRES (Wilson et al. 2000; Deniz et al. 2009; Fernandez et al. 2014). Since the first description of the CrPV IRES, it has been thought that it would enable binding of the ribosome directly in an active state by mimicking

tRNA/mRNA interaction in the P-site, ready to accommodate tRNA^{Ala} in the A-site (Costantino et al. 2008; Au and Jan 2012). However, recent work has demonstrated that the first binding step occurs one codon upstream than previously anticipated (as represented in Fig. 1B). Accommodating the first alanine codon in the A-site requires a translocation step involving eEF2 (Fernandez et al. 2014; Muhs et al. 2015). A second unconventional translocation cycle may possibly occur before the IRES fully leaves the ribosome (Petrov et al. 2016). How the ribosome can accommodate a structure as large as an IRES is an intriguing question, especially in terms of translocation. In the presence of the IRES, eEF2 leads to the formation of an unstable intermediate state that is determined by the entry of tRNA in the A-site either in the 0 or +1 frame (Petrov et al. 2016).

Although the dynamics of the 40S and 80S subunits' recruitment to the CrPV-IRES has been recently described (Petrov et al. 2016), how the very first cycles of kinetics compare to the subsequent elongation cycles, especially in a homogeneous system, remains unknown. Using a single-molecule strategy, we were able to quantify the elongation rate of an unmodified single mammalian ribosome and calculate the kinetics of translation during several elongation steps. This

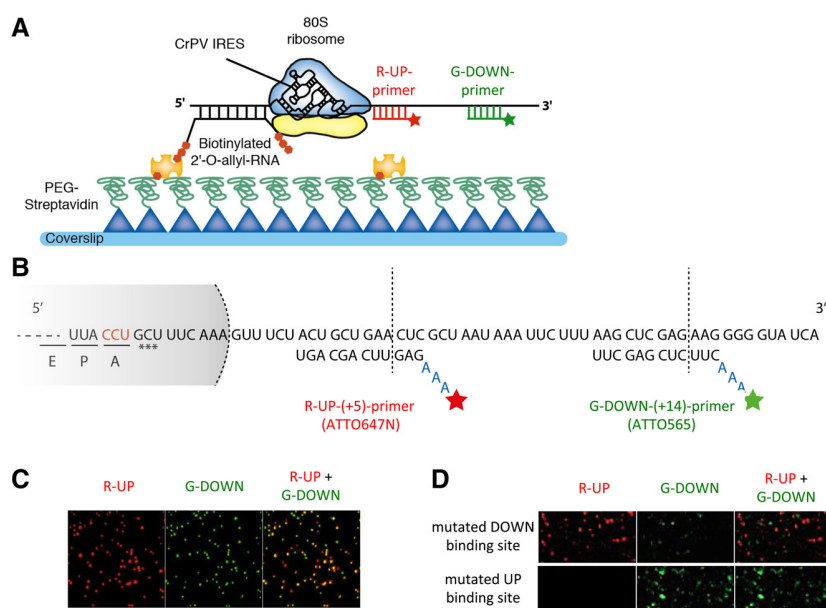


FIGURE 1. Single-ribosome translation assay: design, ribosome location on mRNA, and fluorescent labeling. (A) The mRNA/ribosome complex is attached to a PEG-neutravidin-coated coverslip through a biotinylated probe hybridized to the 5' part of the mRNA. mRNA is labeled with the fluorescent probes (UP- and DOWN-primers). (B) Initial locations of the ribosomal A, P, and E sites are indicated. The curved dashed line represents the extremity of the ribosome when bound to the IRES. The IRES initiator codon located at the A-site is indicated in red. To prevent any influence of the ATTO-dye on the probes' annealing efficiency, three noncomplementary nucleotides have been added to the probes (in blue). Dashed lines represent the position of the ribosome extremity for which 100% of each primer is detached. (***) The first codon read by a tRNA after the translocation of PKI of the IRES from A to P site. (C) Zoomed-in view of single-molecule TIRFM images of UP-(+5)-R primers (left), DOWN-(+14)-G-primers (center). Overlay (right) shows colocalization in yellow. Images are background-filtered using imageJ. (D) Same single-molecule TIRFM images as in C using a mRNA where the DOWN-primer (top line) or UP-primer (bottom line) binding site sequence is replaced by its complementary sequence. Signal scale is the same for the two images of each channel.

work confirms that the first one, or possibly two, translocation steps are unusual and inefficient in the presence of the CrPV-IRES, with a characteristic time almost 30 times longer than for a classical elongation cycle.

To investigate the applicability of this method to any mRNA with an IRES, we also performed experiments with the hepatitis C virus (HCV) IRES. We show that this IRES also slows down the first cycle. This methodology opens the possibility of studying the behavior of different IRES as well as the kinetics of eukaryotic translation in conditions where changes in translation are suspected to be responsible for genetic diseases or cancers (Stumpf and Ruggero 2011; Reschke et al. 2013).

RESULTS

An mRNA was labeled with two small RNA fluorescent probes along its coding sequence and to a biotinylated one at its 5' end. Depending on the experiments, a single 80S ribosome, purified from RRL, was bound to this mRNA or not. The mRNA was then attached to a coverslip through its 5' end (Fig. 1A). This coverslip formed the bottom part of a microfluidic chamber. Translation started when total rabbit reticulocyte lysate (RRL), which contains all the factors needed to perform translation, was injected into the chamber. Translation kinetics data were obtained by measuring the departure times out of the evanescent wave for each probe. The ribosomal mRNA entry channel can only admit a single-strand RNA (Yusupova et al. 2001), so the ribosome must unfold mRNA secondary structures (Takyar et al. 2005; Qu et al. 2011) to continue translation until it reaches the stop codon. Small RNA probes have been previously used to map this helicase activity (Takyar et al. 2005). We selected two probes linked to two spectrally distinct fluorophores (ATTO647N for R-probes and ATTO565 for G-probes, see an example in Fig. 1B). Based on the work by Takyar et al. (2005) and the fact that canonical ribosomal footprints from eukaryotes and prokaryotes are both 28 nt in length, we assume that eukaryotic helicase activity is located at the same position as for prokaryotic ribosomes (Martens et al. 2015). We conclude that five elongation cycles are needed to fully detach the UP-(+5)-primer, as shown in Figure 1B. This system allows us to synchronize the departure of the downstream probe (DOWN-primer) using the upstream probe (UP-primer) departure as a reference.

The mRNA labeling is sequence-specific

Both primers efficiently bind to the same mRNA, as shown in Figure 1C. We were able to dual label ~80% of the mRNA from pCH2 or pCH4 with R-UP-(+5) and G-DOWN-(+14) in our annealing conditions. To further demonstrate the absence of primers mispairing, we created mRNAs with mutations on either the UP or the DOWN primer binding sites, called MUTUP and MUTDOWN mRNAs hereafter, re-

spectively. The mRNAs should then not be able to attach to either the UP or the DOWN labeled primers. We then performed the hybridization with the UP and DOWN primers, with the rest of the experiment in the same conditions as with the nonmutated mRNAs. In our single-molecule experiment, as expected, we observed 0.1%–1% spots in the color of the primer corresponding to the mutated site compared to the number of spots in the other color, where the mRNA region was not mutated (Fig. 1D). These very few remaining spots correspond most likely to inhomogeneities in the background fluorescence from the coverslip or its surface chemistry used to attach the mRNAs. Furthermore, we observe almost no colocalized spots: 0% green spots when the red primer site is mutated, and 2% when the green primer site is mutated, due to more background noise in the green channel. This demonstrates that primers specifically bind their targets without mispairing.

The CrPV-IRES supports ribosome binding in the presence of the labeled primers

One major difficulty to set up such a system was the reconstitution of the translation initiation step *in vitro*. This step involves more than 40 factors in eukaryotes, several of them being modified post-translationally (Aitken and Lorsch 2012). To circumvent this difficulty, we first used the CrPV IRES intergenic region to initiate translation. This IRES, which enables binding of the 80S ribosome in the absence of initiation factors and initiator tRNA, has been very well characterized, both functionally and structurally (Jan and Sarnow 2002; Pestova et al. 2004; Spahn et al. 2004; Petrov et al. 2016). We first demonstrated that despite the binding of the UP-(+5)-primer close to the ribosome assembly region on the mRNA, CrPV IRES was still able to specifically recruit the 40S subunit (or possibly directly the 80S ribosome) from purified ribosomes (Fig. 2; Petrov et al. 2016). This demonstrated that CrPV-IRES supports ribosome binding in the presence of primers positioned as in our single-molecule experiments.

The ribosome efficiently translates mRNAs with CrPV IRES in the microfluidic chamber

We first used mRNAs with CrPV-IRES, preincubated with 80S ribosomes. We observed the individual initiation complexes using a home-built, objective-based, two-color total-internal reflection fluorescence microscope, allowing localization of dual labeled mRNAs in real time during translation. We first plotted the total number N of remaining R-UP-(+5)-primers versus time, normalized by the initial number of R-UP-(+5)-primers N_0 (see Fig. 3A) [same for G-DOWN-(+14)-primer, data not shown]. The total number of analyzed data points is given in Table 1. In order to check that the observed departure phenomenon was not a pure photobleaching effect, well known for organic dyes, we recorded the same movie on a different area of the sample, 30 min after

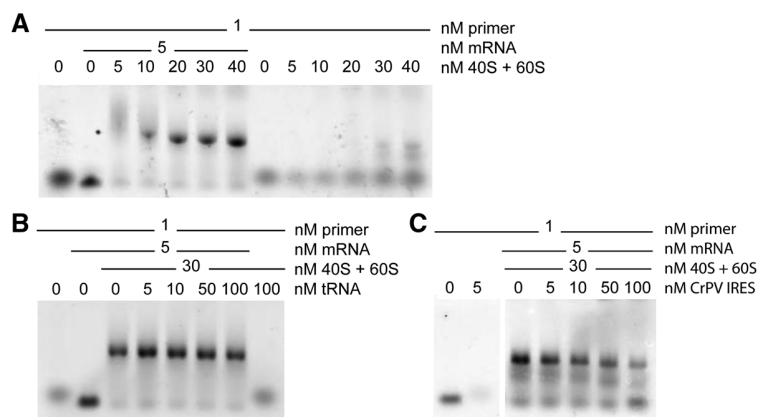


FIGURE 2. Specific binding of the ribosome to the IRES. For each gel shift assay, concentrations of R-(UP)+5-primers, mRNA, and ribosomal subunits (40S and 60S) are indicated. Mobility shifts were visualized using the primer fluorescence, as indicated in Materials and Methods. (A) Increasing the concentration of ribosomal subunits induces a gel shift only in the presence of mRNA. The 30 nM concentration of ribosomal subunits is selected for further experiments. (B) Increasing the concentration of a nonspecific RNA competitor (tRNA) does not change the gel shift. (C) Increasing the concentration of a specific but nonfluorescent RNA competitor (CrPV IRES) reduces the binding of the ribosomal subunits to the mRNA. Images have been obtained by fluorescence scanning with a 633 nm laser and a 670BP30 filter (Typhoon, GE Healthcare). Contrast and brightness have been modified if necessary using Photoshop CS6. These changes have been applied equally across the entire images.

RRL injection, i.e., long after translation was over. The photobleaching curve $N^{\text{pbl}}(t)$ (Fig. 3A, gray curve) decreases to only $79 \pm 6\%$ after 50 sec, which is much higher than the $49 \pm 7\%$ observed in the translation test, $N^{\text{exp}}(t)$ (Fig. 3A, red curve). This indicates that most departures in the first 50 sec after the RRL injection cannot be attributed to photobleaching.

Other biological activities, such as RNase, could also explain fluorophore departures. However, the fact that there is no mRNA degradation is demonstrated by the observation of a nonilluminated area after RRL injection in the presence of an mRNA with no IRES. As there was no laser excitation, photobleaching cannot account for fluorophore departure in this area and the absence of IRES prevents initiation from occurring. We observed many spots in the nonilluminated area, the same as before the injection of the RRL. This indicates that there was no mRNA degradation during the experiment.

To identify the departures due to translation, we performed two additional control experiments. First, we preincubated RRL with cycloheximide. This antibiotic binds to the ribosomal E-site and blocks translation after two cycles (Pestova and Hellen 2003). Adding cycloheximide clearly slowed down fluorophore departures but did not prevent them completely (Fig. 3A, blue curve). In a second control experiment, we used an mRNA without the IRES sequence (ΔIRES mRNA) to prevent translation initiation. The corresponding curve $N^{\Delta\text{IRES}}(t)$ (Fig. 3A, purple curve) is very close to the cycloheximide control, indicating that indeed in both situations translation is inhibited. We believe that the few remaining departures in both controls were due to the flow during injection and to the salinity difference when injecting

the RRL, although we reduced it by optimizing the salt concentration of the initial buffer. In any case, the departure rate of the R-UP-(+5)-primer is clearly significantly higher with IRES and no cycloheximide (Fig. 3A, red curve), and we conclude that this increase in the departure rate is due to translating ribosomes.

mRNAs with HCV IRES are also efficiently translated

To further confirm these results, we performed the same experiment using an mRNA carrying the HCV IRES with and without a stop codon before the R-DOWN fluorescent primer (Fig. 3D). The presence of the stop codon prevents the departure of R-DOWN primers, to the same extent as the absence of the IRES. These tests performed with a different mRNA demonstrate that translation is responsible for primer departure.

Determination of the ribosome speed during elongation

We then focused on the R-UP-(+5) and G-DOWN-(+14)-primers, hybridized on a CrPV-IRES mRNA, that were colocalized on the first red and green images. We calculated the histograms H^{exp} and $H^{\Delta\text{IRES}}$ of the departures of both primers as a function of the difference $t_{\text{DOWN}} - t_{\text{UP}}$, with and without the IRES sequence. The times t_{UP} and t_{DOWN} correspond to the departures of R-UP-(+5) and G-DOWN-(+14) from a given mRNA strand. The histograms H^{exp} and $H^{\Delta\text{IRES}}$ were normalized by the initial number of colocalized spots. The difference $H^{\text{trans}} = H^{\text{exp}} - H^{\Delta\text{IRES}}$ is plotted in Figure 3B, and a Gaussian fit shows a maximum at 12.5 ± 2.1 sec. Thus, on average, G-DOWN-(+14) departs from a given mRNA strand 12.5 sec after R-UP-(+5). Because the lifetime before photobleaching of the red fluorophore is three times larger than that of the green one, departures due to photobleaching would, on average, occur in the inverse order. Thus, the fact that this histogram is centered at $t_{\text{DOWN}} > t_{\text{UP}}$ is yet another confirmation that we observed translation. As nine elongation cycles are needed between the two fluorophore departures, we conclude that one elongation cycle takes an average of 1.4 ± 0.2 sec.

CrPV IRES-bound ribosomes are responsible for the translation events observed in single-molecule experiments

Because the cell extract used for the single-molecule experiments contains ribosomes, we performed control

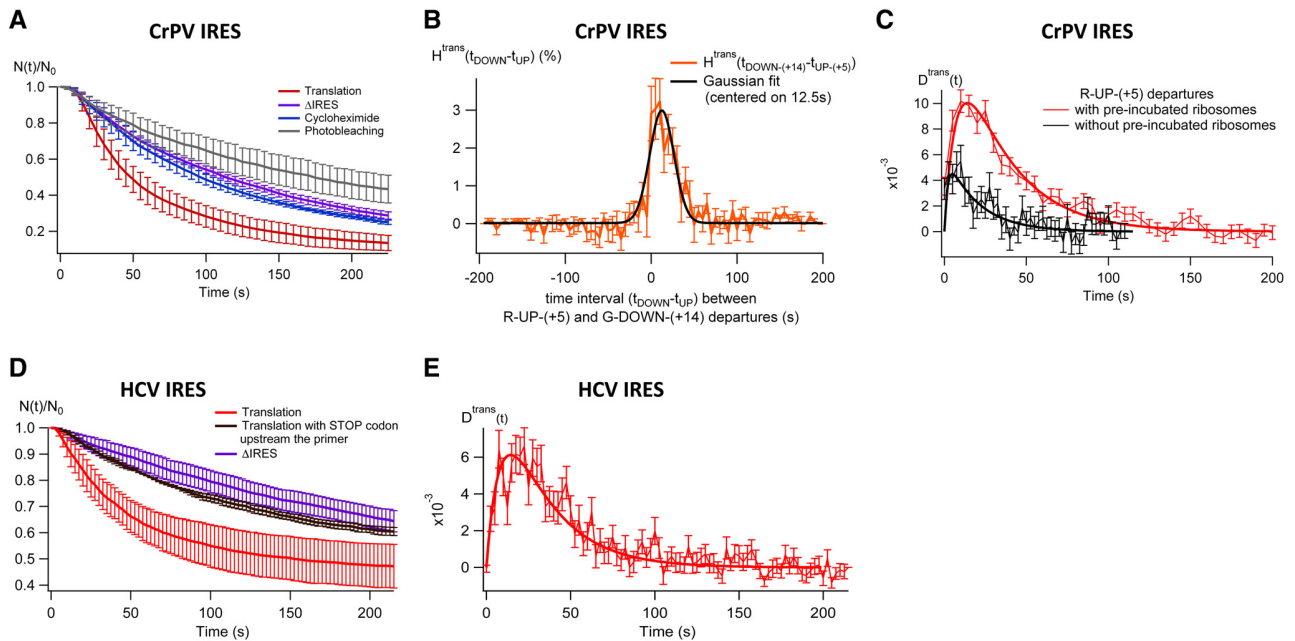


FIGURE 3. Analysis of the UP- and DOWN-primers' departure times on CrPV and HCV IRES mRNAs. (A) Fraction of remaining R-UP-(+5) primers versus time for the CrPV IRES-mediated translation experiment (red), controls using cycloheximide (blue), an mRNA without IRES (purple), and photobleaching (gray). $t = 0$ is the RRL arrival time at the imaged area. Errors bars are the standard deviation of all the curves obtained for each image sequence (seven sequences for translation, six for Δ IRES control, three for cycloheximide control, 12 for photobleaching). (B) Orange curve: histogram showing the fraction of colocated spots (in %, y-axis) from which G-DOWN-(+14) and R-UP-(+5) primers depart with a given time interval (in sec, x-axis). Black curve: Gaussian fit of this histogram. (C) Fraction of R-UP-(+5) primers disappearing at a given time (red markers) and fit using a two-parameter model (red solid line). Comparison with G-UP-(+5) primers disappearing at a given time (black markers) in a control experiment without 80S preincubation, with the corresponding fitting curve (black solid line). All experiments were performed with preincubated ribosomes, except for the control in panel C. (D) Fraction of remaining R-DOWN-(+24) primers versus time for the HCV IRES-mediated translation experiment (red), controls using HCV-IRES mRNA with a STOP codon before the DOWN binding site (brown), and an mRNA without IRES (purple). $t = 0$ is the RRL arrival time at the imaged area, time between two images is 2.5 sec. Errors bars are the standard deviation of all the curves obtained for each image sequence (five sequences for translation, nine for mRNA with STOP control, five for Δ IRES control). (E) Fraction of R-UP-(+24) primers disappearing at a given time (red markers) and fit using a two-parameter model (red solid line). In panels B, C, and E, correction was performed using mRNA without IRES and the plotted curves represent the average curves of the bootstrapping procedure described in Materials and Methods, with error bars given by the standard deviation of the bootstrapped samples.

experiments without preincubating purified 80S ribosomes on CrPV IRES mRNAs to quantify the contribution of free RRL ribosomes to the signal observed in the experiments. In both cases, the same mRNA was used. We analyzed the departure times for each primer. Figure 3C shows the derivatives $D^{\text{trans}}(t) = d[N^{\text{exp}}(t)/N^{\Delta\text{IRES}}(t)]$, which represent the probability for the UP-(+5) probe to disappear at time t in two cases: with preincubated purified ribosomes (red curve) or without (black curve). The area under each curve in Figure 3C corresponds to the fraction of the probe carrying mRNAs that were translated. This translation efficiency is much larger (50%) in the experiment with preincubation of the 80S than without (10%). This indicates that hardly 10% of the mRNAs were translated without preincubation of the ribosomes. So free ribosomes are not efficient to initiate translation at the CrPV IRES in the RRL. Actually, this is in agreement with a previous paper from Pestova's group (Pestova et al. 2004). These experiments showed that the presence of initiation factors inhibits subunit joining at the CrPV IRES.

Ribosomes present in RRL efficiently translate HCV-IRES mRNAs

To confirm that the type of CrPV-IRES prevents efficient initiation of the ribosome in RRL, we used HCV-IRES. This IRES is a type III IRES that only requires eIF3 and eIF2 as initiation factors and has been shown to be very efficient in RRL (Borman et al. 1995). Using this IRES, we show that translation efficiency is 30% without ribosome preincubation (Fig. 3E).

Both HCV and CrPV IRES poise the first translational steps

The primer departure due to translation occurs when the ribosome has performed n elongation cycles [$n = 5$ for R-UP-(+5)]. If all the elongation cycles were identical, the fitting function for $D^{\text{trans}}(t)$ would be a γ law $p(t) = (t^{n-1} \exp(-(t/t_{\text{el}})))/(t_{\text{el}}^n (n-1)!)$ with t_{el} the characteristic time for one elongation cycle. However, this function,

TABLE 1. Values of the initial number N_0 of primers for each experiment

Experiment	CrPV IRES			
	Initial number of/(total number of departures after 50 sec)			
	R-UP-(+5)	G-DOWN-(+14)	Colocalized primers	R-UP-(+8)
Translation	7112/(3627)	1754/(930)	1494/(651*)	5756/(3511)
Δ IRES mRNA control	6991/(1888)	1176/(396)	646/(140*)	2905/(813)
Cycloheximide control	2924/(877)			
Photobleaching	1486/(312)			
Experiment	HCV IRES			
	Initial number of/(total number of departures after 50 sec)			
	R-DOWN-(+24)			
Translation	4111/(1398)			
Δ IRES mRNA control	4303/(473)			
mRNA with STOP control	8182/(1309)			

The value indicated in italics is the total number of departures after 50 sec, except for the colocalized primers (*) where it is given at the end of the experiment (after 250 sec).

for $n = 5$, does not fit our experimental data, indicating that a one time parameter is not sufficient to describe the dynamics observed. We considered that the ribosome translation is well described by a rapid phase corresponding to the first part of the $D^{\text{trans}}(t)$ curve, and a slow one, corresponding to the tail of $D^{\text{trans}}(t)$. The simplest fitting function with two time parameters that could describe these data is the convolution of one slow event happening with an exponential probability of characteristic duration t_0 , and a rapid phase described by an exponential probability of characteristic duration t_1 :

$$D^{\text{fit}}(t) = \frac{A}{t_0 - t_1} (e^{-(t/t_0)} - e^{-(t/t_1)}),$$

where A corresponds to the fraction of translated mRNAs.

For CrPV IRES, we performed the same fitting procedure to the $D^{\text{trans}}(t)$ curves for different primers, hybridized at different locations on the mRNA, and included a bootstrapping process to evaluate the mean value and the error bars on the fitting parameters A , t_0 and t_1 . In addition to the R-UP-(+5) and G-DOWN-(+14) primers, we tested an mRNA from pCH5 with nine additional nucleotides upstream of the R-

UP-primer hybridization site. In this situation, the ribosome must translate eight codons (instead of five previously) before the R-UP-(+8)-primer departure (same R-UP-primer). The results of all the fits are summarized in Table 2. t_0 describes a slow phase lasting typically 40 sec, independently of the primer. t_1 corresponds to the fast phase. Within the error bars, its value is proportional to $n - 1$ or $n - 2$. Furthermore, the elongation time t_{el} obtained by dividing t_1 by $n - 1$ or $n - 2$ is consistent with the elongation time of 1.4 ± 0.2 sec previously measured between the R-UP-(+5) and G-DOWN-(+14)-primer departures. To test whether melting the double strand formed by the primer and the mRNA slowed down the ribosome, we added a third fitting time parameter and found it to be consistent with zero within our error bars. We conclude that unzipping the primer has a negligible effect on our measured elongation time. The fact that the time t_0 for the slow phase is independent of the primer location, and that it is longer than the time interval between the two primer departures, proves that it is not due to the unzipping of the RNA probes but corresponds to an event that occurs only between the translation starting

TABLE 2. Summary of the results obtained from the fits

	CrPV IRES		
	R-UP-(+5)	G-DOWN-(+14)	R-UP-(+8)
A (%)	51 ± 1	46 ± 2	72 ± 2
t_0 (sec)	38 ± 3	36 ± 10	47 ± 3
t_1 (sec)	4.2 ± 0.8	10.4 ± 6.5	7.7 ± 1.0
Hyp. 1 : $t_{\text{el}} = t_1/(n - 1)$ (sec)	1.1 ± 0.2	0.8 ± 0.5	1.1 ± 0.1
Hyp. 2 : $t_{\text{el}} = t_1/(n - 2)$ (sec)	1.4 ± 0.3	0.9 ± 0.5	1.3 ± 0.1
t_{el} (sec) from histogram	1.4 ± 0.2		
	HCV IRES		
	R-DOWN-(+24)		
A (%)	30 ± 1		
t_0 (sec)	29 ± 4		
t_1 (sec)	11.6 ± 4.6		
$t_{\text{el}} = t_1/(n - 1)$ (sec)	0.5 ± 0.2		

point and the UP-primer departure. Using the same fitting procedure for HCV IRES, we obtained $t_0 = 29 \pm 4$ sec, indicating that both IRES-mediated translations display the same kinetics scheme (compare Fig. 3C,E).

DISCUSSION

Our approach allows quantification of elongation speed in two ways. Purified and preincubated ribosomes translate at a rate of 1.4 ± 0.2 sec per codon. This value is slightly slower than the one obtained by the ribosome profiling approach (0.2 sec per codon) (Ingolia et al. 2012). However, with non-purified ribosomes, the translation rate increases threefold (0.5 ± 0.2 sec per codon), which is in good agreement with the kinetics already obtained in vivo (Morisaki et al. 2016; Wang et al. 2016; Wu et al. 2016; Yan et al. 2016). Although the kinetics of initiation has recently been addressed in a heterogeneous cell-free system (Zhang et al. 2016), the consequences of the IRES-dependent initiation for the elongation cycles have never been evaluated in an unmodified translation system. Interestingly, comparison between both systems gives different results. Zhang and coworkers observed four slow translocation cycles, whereas our data fit with only two slow translocations that could correspond to the slowest cycles described by Zhang and coworkers. (see Table 2). One may suspect that heterogeneity in the translation system leads to kinetics issues. Indeed, they describe four very slow steps (between 80 and 200 sec for one translocation) and even the faster cycles are at least 30-fold slower than the translocation speed obtained in vivo (0.1 translocation/sec versus three translocations/sec, respectively). Such values cannot represent physiological speed of translation and reflect problems due to the heterogeneity of their system (shrimp ribosomes with yeast elongation factors in the presence of *E. coli* tRNA). Actually, it is true that CrPV IRES is well known to support translation initiation using various ribosomes (yeast, human, shrimp) (Thompson et al. 2001; Spahn et al. 2004); however, this does not imply that initiation kinetics is conserved in all these artificial systems. Using the CrPV IRES, we measured the speed of eukaryotic ribosomes and were able to identify two characteristic times: a very long time (40 sec) that corresponds to the first (or the first plus the sec) translocation step, and a short time (1.4 sec) for all remaining translocations. This translocation time is in good agreement with recent in vivo experiments that indicated a ribosome translocation rate around 3 ± 1 amino acids per second (Morisaki et al. 2016; Wang et al. 2016; Wu et al. 2016; Yan et al. 2016).

Our data support the model proposed by Ramakrishnan's team (Fernandez et al. 2014; Murray et al. 2016). They observed, by high-resolution cryoEM, the exact position of the intergenic CrPV IRES in interaction with the ribosome and showed that this IRES enables the ribosome to assemble one codon upstream than what was previously anticipated. Moreover, they showed that eEF2 is able to translocate the PKI part of the IRES (mimicking the tRNA in the A-site)

from the A- to the P-site, allowing the A-site to accept the next cognate tRNA. Our results indicate that the translocation of PKI from the A- to the P-site is a rate-limiting event (almost 30 times longer than a canonical elongation cycle). One may anticipate that this translocation is very unusual, because the ribosome has to deal with a very large secondary structure. Once this first step has occurred, the second elongation cycle takes place with a tRNA in the A-site and the IRES bound between P- and E-sites. This second elongation cycle is probably also kinetically slow (see Table 2); however, our data indicate that once these translocations are over, all further translocations occur at the same speed. This suggests that during the next translocation step, IRES is no longer a limiting factor. Owing to time resolution limits, we cannot exclude that with PKI in the P-site and a cognate tRNA in the A-site, the translocation occurs at a normal speed due to a quick release of the PKI from the ribosome (Fig. 4).

It has been shown that HCV IRES assembles an 80S ribosome that is poised at the initiator codon (Filbin et al. 2013). This takes place through the interaction of part of the IRES with the β -hairpin of the ribosomal protein uS7 and with the N-terminal helix–turn–helix motif of eS25 (Quade et al. 2015). Both IRES share common features; in particular, they both interact with uS7 as described by cryo-EM studies (Spahn et al. 2004; Boehringer et al. 2005; Filbin et al. 2013). However, unlike CrPV, the HCV IRES requires several initiation factors (Lukavsky 2009). A recent cryoEM study revealed that the swine fever virus IRES (similar to HCV IRES) displaces the core of eIF3 from its position on the 40S subunit (Hashem et al. 2013). This binding would reduce eIF3 availability to form a canonical 43S preinitiation complex. From these data, it seems clear that both IRESs induce similar conformational changes in the ribosome despite utilizing distinct mechanisms for translation initiation. In both cases, IRES represent a hindrance to ribosome movement and explain our observation that both CrPV and HCV IRES strongly slow down ribosome translocation during the first elongation cycles. One may postulate this is a general feature of IRES initiation.

More generally, our results demonstrate that the system we have developed is well suited to study translation kinetics at the single-molecule level during multiple elongation cycles. It can be applied to numerous translational questions. For example, it is now well established that the translation machinery is a target for deregulation in diseases such as cancer (Stumpf and Ruggero 2011; Marcel et al. 2013). The ability to quantify translation kinetics in such environments will provide great improvements in the understanding of how the translational machinery is involved in these pathologies.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids and oligonucleotides

pCH1 contains the CrPV IGR IRES (coordinates 6028–6219 from the viral mRNA) downstream from the SP6 promoter as well as a

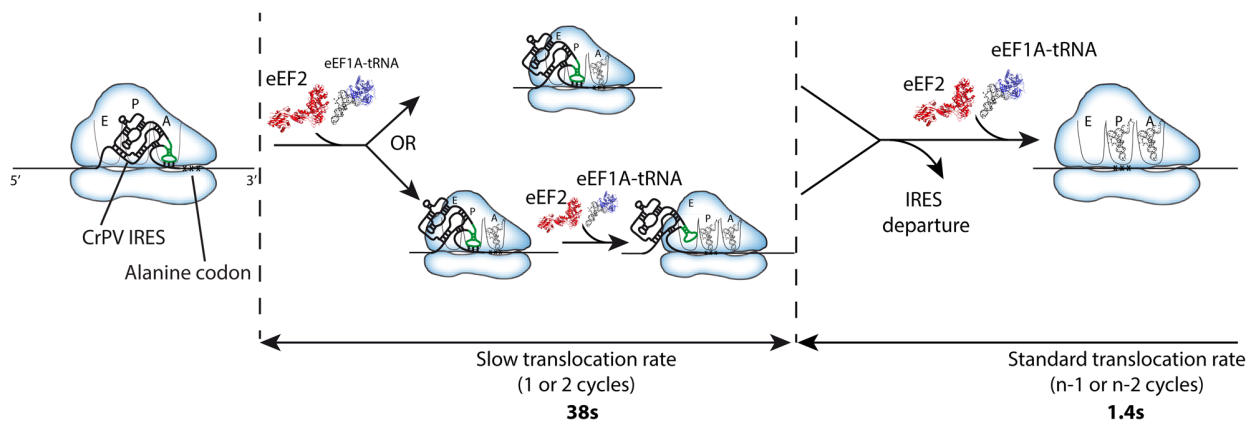


FIGURE 4. Model for first translocation cycles from the CrPV IRES. Translocation of the PKI of the IRES (green part) from A- to P-sites is a very slow step catalyzed by eEF2. The free A-site is mostly filled by a cognate tRNA^{Ala} at the alanine codon (***) (when translation initiates in the 0 frame). From our data, we cannot exclude that the next elongation cycle also occurs slowly, due to the presence of the IRES in P- and E-sites (down panel). Elongation then resumes at high speed (1.4 sec). All subsequent steps occur at the same speed, indicating that IRES no longer impacts the functioning of the ribosome.

region where the chimeric biotinylated DNA/2' O-allyl-modified RNA oligonucleotide (Namy et al. 2006) binds upstream of an HpaI site. The plasmid pCH2 is identical to pCH1 except that in pCH2, the coding sequence of the PB1 gene (from pPS0 plasmid) (Somogyi et al. 1993) without stop codon was inserted into the HpaI site. This allowed us to extend the initial coding sequence to make the polypeptide visible in gel during in vitro translation assay. The pCH3 plasmid also is derived from pCH1 with the insertion of the sequence TCTACTGCTGAACCTCGCT at the HpaI site to insert the UP-primer binding site. The DOWN-primer site has been chosen to have a melting temperature compatible with the UP-primer. The plasmid pCH4 is derived from pCH3 with a deletion of the IRES named Δ IRES in the manuscript. The plasmid pCH5 is derived from pCH3 with three additional codons inserted upstream of the UP-primer to increase the distance between the IRES and the UP-primer. pHCV is a pUC19 derivative plasmid containing the HCV-type 1b IRES followed by the first six codons of the core protein coding sequence (NCBI accession number AJ238799 from nucleotide 1 to 360). All other features are identical to pCH1.

RNA oligonucleotides coupled to an ATTO fluorophore were synthesized by Eurogentec. The UP-primer (5'-AAAGAGUUCA GCAGU-3') is identical to the oligonucleotide H12 from Takyar et al. 2005, except for the 3 A at the 5' end used to space the fluorescent label from the hybridized region. The label is either ATTO647N or ATTO565, excited in the red and in the green part of the spectrum, respectively. The associated nomenclature is thus R-UP-primer and G-UP-primer, respectively. The DOWN-primer sequence is 5'-ATTO565-AAACUUCUCGAGCUU-3'. This primer binds downstream from the UP-primer. To create MUTUP and MUTDOWN, binding sites have been mutated by replacing the original sequence with its complementary sequence to prevent binding of the primers.

In vitro transcription

Plasmids were linearized with the appropriate restriction enzyme (KpnI or XhoI) and transcribed in vitro with SP6 RNA polymerase (Promega). RNA is purified using RNA-Spin columns (Roche).

Purification of ribosomal subunits

Ribosomal subunits were prepared from nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate (RRL; Promega). One milliliter of RRL was mixed with 3 mL buffer A [20 mM Hepes, pH 7.8, 150 mM K(OAc), 6 mM Mg(OAc)₂ and 2 mM dithiothreitol (DTT)] and incubated with 1mM puromycin (Sigma-Aldrich) for 10 min at 4°C and then for 10 min at 37°C. Ribosomal subunits were isolated by the centrifugation of this suspension through a 3 mL 20% sucrose cushion in buffer A for 4 h at 4°C and 44,000 rpm, using a Beckman TLA110 rotor. Pellets were resuspended in buffer A to a concentration of 12 A₂₆₀ U/mL.

Nondenaturing gel mobility shifts

Conditions for native gel shift assays are as follows: pCH2-derived mRNA (500 nM) was incubated with 100 nM R-UP-primer in a 10 μ L reaction in buffer B (20 mM Tris pH 7.8, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, and 0.25 mM ATP) for 5 min at 68°C, 5 min at 37°C, and 5 min in ice. mRNA/oligonucleotide complexes were diluted 20 times in buffer C [20 mM Hepes, pH 7.8, 100 mM K(OAc), 2.5 mM Mg(OAc)₂, 2 mM DTT, and 0.25 mM spermidine]. This complex (5 nM) is incubated in buffer C with an increasing concentration of ribosomal subunits, from 0 to 40 nM, at 37°C for 10 min. For controls, the mRNA/oligonucleotide complex (5 nM) was incubated with 30 nM ribosomal subunits and with an increasing concentration of either competitor or noncompetitor RNA from 0 to 100 nM. Competitor RNA only contains the CrPV IRES sequence. Yeast tRNA (Sigma-Aldrich) is used as a noncompetitor RNA. Gel shifts were performed in 0.8% (w/v) agarose gels in THM buffer (66 mM Hepes, 34 mM Tris, 2.5 mM MgCl₂, final pH 7.5) at room temperature. Gel-mobility shifts were analyzed by fluorescence scanning with a 633 nm laser and a 670BP30 filter (Typhoon, GE Healthcare).

Single-molecule experiments

A home-built objective-based TIRF microscope was used. ATTO-647N- and ATTO-565-labeled molecules were excited using a

640-nm laser diode or a 532-nm diode-pumped solid-state laser (both Oxxius). Fluorescence emission was collected by a 1.45 NA 60× oil-immersion objective (PlanApo, Olympus) and imaged onto an electron-multiplying charged coupled device (EMCCD) camera (iXon+897 Andor) at 100- or 200-msec exposure. The excitation and detection of ATTO-647N and ATTO-565 fluorescence were alternated using home-built electronics. The two lasers were reflected on the same dichroic mirror (Chroma z532/633rpc) and a motorized filter wheel was used to choose the appropriate emission filter (Chroma HQ665lp and Semrock FF01-580/60, respectively). A laboratory-built microscope-based focus drift correction was used to keep the focus during the whole experiment. Cellular extract delivery was achieved using a modified syringe pump (Harvard Apparatus) (dead time 2–3 sec). In RRL, for an exposure time of 200 msec every 5 sec, the lifetime before photobleaching of ATTO647N (resp. ATTO565) was $\tau_R = 85 \pm 16$ sec ($\tau_G = 38 \pm 6$ sec).

In vitro translation on a surface

The mRNA from pCH3, pCH4, pCH5, and pHCV plasmids (0.5 μ M) were annealed to the chimeric biotinylated DNA/2' O-allyl-modified RNA oligonucleotide (0.5 μ M) and 2 μ M fluorescent-labeled oligonucleotides in a 10 μ L reaction in 0.5× ligase buffer (NEB) for 5 min at 68°C, 5 min at 37°C, and 5 min at 4°C. The mRNA/oligonucleotide complexes were diluted 100 times in buffer E [20 mM Hepes, pH 7.8, 100 mM Na(OAc), 100 mM K(OAc), 2.5 mM Mg(OAc)₂, 2 mM DTT, and 0.25 mM spermidine]. The mRNA/primer complexes were further diluted in buffer E to 0.8 nM. For the experiments in which the 80S ribosomes were preassembled on CrPV IRES, 24 nM ribosomal subunits were added to this solution. The reaction was incubated at 37°C for 10 min prior to injection in the flow-cell and allowed to bind for 10 min to the biotin-PEG-derivatized glass coverslip. The chamber was flushed with buffer E before the injection of 25 μ L RRL mix (17.5 μ L RRL, 6 μ L H₂O, 20 U SUPERase In [Ambion], and 0.5 μ L of amino acid–Cys mix provided) previously incubated at 30°C for 10 min. Control experiments were carried out in the presence of 355 μ M cycloheximide (Euromedex) in each solution. When the RRL reached the excitation area, data acquisition was launched. Every 5 sec (unless otherwise stated), two images were acquired, first in the red channel and 500 msec later in the green one.

Data analysis

For each color, analysis was performed on individual spots, provided that they were diffraction limited and that they were present in the first two images and disappeared abruptly (after one frame) during the movie. Error bars on the primer departure probability curves $D(t)$ and on the fitting parameters were obtained by a bootstrapping procedure (Press et al. 1995). For each set of N_0 experimental data points, 1000 samples of N_0 bootstrapped points were computed. The same analysis procedure was performed on each bootstrapped sample: Each one was fitted, leading to the average fitting parameters and their standard deviations given in the text.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank D. Fourmy, S. Yoshizawa, J.D. Puglisi, and B. S. Cooperman for fruitful discussions. This work was supported by

Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) (Programme Interdisciplinaire du CNRS, Interface Physique-Chimie-Biologie, soutien à la prise de risque to K.P.), PRES Univer'Sud (2010-08 to O.N.), the Region Ile-de-France in the framework of C'Nano IdF, the nanoscience competence center of Paris Region (CINERIB to K.P.), Agence Nationale de la Recherche (ANR) (Ribodyn ANR-10-BLAN-1510 to K.P., Ribometh ANR-13-BSV8-0012-02 to O.N.), a Fondation pour la Recherche Médicale fellowship (to H. C. and O.B.), a CNRS PhD fellowship (to N.F.), an IDI 2014 fellowship funded by the IDEX Paris-Saclay ANR-11-IDEX-003-02 (to N. B.), and a ANR post-doctoral fellowship (to M.S.). Agence Nationale de la Recherche/ANR-13-BSV8-0012-02 provided funding for the open access charge.

Received March 28, 2017; accepted July 27, 2017.

REFERENCES

- Aitken CE, Lorsch JR. 2012. A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 568–576.
- Au HH, Jan E. 2012. Insights into factorless translational initiation by the tRNA-like pseudoknot domain of a viral IRES. *PLoS One* **7**: e51477.
- Ben-Shem A, Garreau de Loubresse N, Melnikov S, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M. 2011. The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* **334**: 1524–1529.
- Boehringer D, Thermann R, Ostareck-Lederer A, Lewis JD, Stark H. 2005. Structure of the hepatitis C virus IRES bound to the human 80S ribosome: remodeling of the HCV IRES. *Structure* **13**: 1695–1706.
- Borman AM, Bailly JL, Girard M, Kean KM. 1995. Picornavirus internal ribosome entry segments: comparison of translation efficiency and the requirements for optimal internal initiation of translation in vitro. *Nucleic Acids Res* **23**: 3656–3663.
- Chen C, Zhang H, Broitman SL, Reiche M, Farrell I, Cooperman BS, Goldman YE. 2013. Dynamics of translation by single ribosomes through mRNA secondary structures. *Nat Struct Mol Biol* **20**: 582–588.
- Chen J, Petrov A, Johansson M, Tsai A, O'Leary SE, Puglisi JD. 2014. Dynamic pathways of –1 translational frameshifting. *Nature* **512**: 328–332.
- Cornish PV, Ermolenko DN, Noller HF, Ha T. 2008. Spontaneous inter-subunit rotation in single ribosomes. *Mol Cell* **30**: 578–588.
- Costantino DA, Pfingsten JS, Rambo RP, Kieft JS. 2008. tRNA-mRNA mimicry drives translation initiation from a viral IRES. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 57–64.
- Deniz N, Lenarcic EM, Landry DM, Thompson SR. 2009. Translation initiation factors are not required for *Dicistroviridae* IRES function in vivo. *RNA* **15**: 932–946.
- Ferguson A, Wang L, Altman RB, Terry DS, Juette MF, Burnett BJ, Alejo JL, Dass RA, Parks MM, Vincent CT, et al. 2015. Functional dynamics within the human ribosome regulate the rate of active protein synthesis. *Mol Cell* **60**: 475–486.
- Fernandez IS, Bai XC, Murshudov G, Scheres SH, Ramakrishnan V. 2014. Initiation of translation by cricket paralysis virus IRES requires its translocation in the ribosome. *Cell* **157**: 823–831.
- Filbin ME, Vollmar BS, Shi D, Gonen T, Kieft JS. 2013. HCV IRES manipulates the ribosome to promote the switch from translation initiation to elongation. *Nat Struct Mol Biol* **20**: 150–158.
- Firth AE, Brierley I. 2012. Non-canonical translation in RNA viruses. *J Gen Virol* **93**: 1385–1409.
- Fuchs G, Petrov AN, Marceau CD, Popov LM, Chen J, O'Leary SE, Wang R, Carette JE, Sarnow P, Puglisi JD. 2015. Kinetic pathway of 40S ribosomal subunit recruitment to hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Proc Natl Acad Sci* **112**: 319–325.

- Hashem Y, des Georges A, Dhote V, Langlois R, Liao HY, Grassucci RA, Pestova TV, Hellen CU, Frank J. 2013. Hepatitis-C-virus-like internal ribosome entry sites displace eIF3 to gain access to the 40S subunit. *Nature* **503**: 539–543.
- Ingolia NT, Brar GA, Rouskin S, McGeachy AM, Weissman JS. 2012. The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat Protoc* **7**: 1534–1550.
- Jan E, Sarnow P. 2002. Factorless ribosome assembly on the internal ribosome entry site of cricket paralysis virus. *J Mol Biol* **324**: 889–902.
- Katranidis A, Atta D, Schlesinger R, Nierhaus KH, Choli-Papadopoulos T, Gregor I, Gerrits M, Buldt G, Fitter J. 2009. Fast biosynthesis of GFP molecules: a single-molecule fluorescence study. *Angewandte Chemie* **48**: 1758–1761.
- Klinge S, Voigts-Hoffmann F, Leibundgut M, Ban N. 2012. Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends Biochem Sci* **37**: 189–198.
- Lukavsky PJ. 2009. Structure and function of HCV IRES domains. *Virus Res* **139**: 166–171.
- Marcel V, Ghayad SE, Belin S, Therizols G, Morel AP, Solano-Gonzalez E, Vendrell JA, Hacot S, Mertani HC, Albaret MA, et al. 2013. p53 acts as a safeguard of translational control by regulating fibrillarin and rRNA methylation in cancer. *Cancer Cell* **24**: 318–330.
- Marshall RA, Aitken CE, Dorywalska M, Puglisi JD. 2008. Translation at the single-molecule level. *Annu Rev Biochem* **77**: 177–203.
- Martens AT, Taylor J, Hilser VJ. 2015. Ribosome A and P sites revealed by length analysis of ribosome profiling data. *Nucleic Acids Res* **43**: 3680–3687.
- Morisaki T, Lyon K, DeLuca KF, DeLuca JG, English BP, Zhang Z, Lavis LD, Grimm JB, Viswanathan S, Looger LL, et al. 2016. Real-time quantification of single RNA translation dynamics in living cells. *Science* **352**: 1425–1429.
- Muhs M, Hilal T, Mielke T, Skabkin MA, Sanbonmatsu KY, Pestova TV, Spahn CM. 2015. Cryo-EM of ribosomal 80S complexes with termination factors reveals the translocated cricket paralysis virus IRES. *Mol Cell* **57**: 422–432.
- Murray J, Savva CG, Shin BS, Dever TE, Ramakrishnan V, Fernandez IS. 2016. Structural characterization of ribosome recruitment and translocation by type IV IRES. *eLife* **5**: e13567.
- Namy O, Moran SJ, Stuart DI, Gilbert RJ, Brierley I. 2006. A mechanical explanation of RNA pseudoknot function in programmed ribosomal frameshifting. *Nature* **441**: 244–247.
- Pestova TV, Hellen CU. 2003. Translation elongation after assembly of ribosomes on the Cricket paralysis virus internal ribosomal entry site without initiation factors or initiator tRNA. *Genes Dev* **17**: 181–186.
- Pestova TV, Lomakin IB, Hellen CU. 2004. Position of the CrPV IRES on the 40S subunit and factor dependence of IRES/80S ribosome assembly. *EMBO Rep* **5**: 906–913.
- Petrov A, Puglisi JD. 2010. Site-specific labeling of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes for single-molecule manipulations. *Nucleic Acids Res* **38**: e143.
- Petrov A, Grosely R, Chen J, O'Leary SE, Puglisi JD. 2016. Multiple parallel pathways of translation initiation on the CrPV IRES. *Mol Cell* **62**: 92–103.
- Press WH, Teukolsky SA, Vetterling WT, Flannery BP. 1995. *Numerical Recipes in C*. Cambridge University Press, New York, NY.
- Qu X, Wen JD, Lancaster L, Noller HF, Bustamante C, Tinoco I Jr. 2011. The ribosome uses two active mechanisms to unwind messenger RNA during translation. *Nature* **475**: 118–121.
- Quade N, Boehringer D, Leibundgut M, van den Heuvel J, Ban N. 2015. Cryo-EM structure of Hepatitis C virus IRES bound to the human ribosome at 3.9-Å resolution. *Nat Commun* **6**: 7646.
- Reschke M, Clohessy JG, Seitzer N, Goldstein DP, Breitkopf SB, Schmolze DB, Ala U, Asara JM, Beck AH, Pandolfi PP. 2013. Characterization and analysis of the composition and dynamics of the Mammalian riboproteome. *Cell Rep* **4**: 1276–1287.
- Rosenblum G, Chen C, Kaur J, Cui X, Zhang H, Asahara H, Chong S, Smilansky Z, Goldman YE, Cooperman BS. 2013. Quantifying elongation rhythm during full-length protein synthesis. *J Am Chem Soc* **135**: 11322–11329.
- Somogyi P, Jenner AJ, Brierley I, Inglis SC. 1993. Ribosomal pausing during translation of an RNA pseudoknot. *Mol Cell Biol* **13**: 6931–6940.
- Spahn CM, Jan E, Mulder A, Grassucci RA, Sarnow P, 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**: 465–475.
- Stumpf CR, Ruggero D. 2011. The cancerous translation apparatus. *Curr Opin Genet Dev* **21**: 474–483.
- Takyar S, Hickerson RP, Noller HF. 2005. mRNA helicase activity of the ribosome. *Cell* **120**: 49–58.
- Thompson SR. 2012. Tricks an IRES uses to enslave ribosomes. *Trends Microbiol* **20**: 558–566.
- Thompson SR, Gulyas KD, Sarnow P. 2001. Internal initiation in *Saccharomyces cerevisiae* mediated by an initiator tRNA/eIF2-independent internal ribosome entry site element. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 12972–12977.
- Uemura S, Aitken CE, Korlach J, Flusberg BA, Turner SW, Puglisi JD. 2010. Real-time tRNA transit on single translating ribosomes at codon resolution. *Nature* **464**: 1012–1017.
- Valle M, Zavialov A, Sengupta J, Rawat U, Ehrenberg M, Frank J. 2003. Locking and unlocking of ribosomal motions. *Cell* **114**: 123–134.
- Wang QS, Au HH, Jan E. 2013. Methods for studying IRES-mediated translation of positive-strand RNA viruses. *Methods* **59**: 167–179.
- Wang C, Han B, Zhou R, Zhuang X. 2016. Real-time imaging of translation on single mRNA transcripts in live cells. *Cell* **165**: 990–1001.
- Wilson JE, Pestova TV, Hellen CU, Sarnow P. 2000. Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome. *Cell* **102**: 511–520.
- Wu B, Eliscovich C, Yoon YJ, Singer RH. 2016. Translation dynamics of single mRNAs in live cells and neurons. *Science* **352**: 1430–1435.
- Yan X, Hoek TA, Vale RD, Tanenbaum ME. 2016. Dynamics of translation of single mRNA molecules in vivo. *Cell* **165**: 976–989.
- Yusupov MM, Yusupova GZ, Baucom A, Lieberman K, Earnest TN, Cate JH, Noller HF. 2001. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* **292**: 883–896.
- Yusupova GZ, Yusupov MM, Cate JH, Noller HF. 2001. The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell* **106**: 233–241.
- Zhang H, Ng MY, Chen Y, Cooperman BS. 2016. Kinetics of initiating polypeptide elongation in an IRES-dependent system. *eLife* **5**: e13429.

Bibliographie

- [Adio 2015] Sarah Adio, Tamara Senyushkina, Frank Peske, Niels Fischer, Wolfgang Wintermeyer et Marina V Rodnina. Fluctuations between multiple EF-G-induced chimeric tRNA states during translocation on the ribosome. Nature communications, vol. 6, 2015. (Non cité.)
- [Agirrezabala 2008] Xabier Agirrezabala, Jianlin Lei, Julie L Brunelle, Rodrigo F Ortiz-Meoz, Rachel Green et Joachim Frank. Visualization of the hybrid state of tRNA binding promoted by spontaneous ratcheting of the ribosome. Molecular cell, vol. 32, no. 2, pages 190–197, 2008. (Cité en page 8.)
- [Altman 2012] Roger B Altman, Daniel S Terry, Zhou Zhou, Qinsi Zheng, Peter Geggier, Rachel A Kolster, Yongfang Zhao, Jonathan A Javitch, J David Warren et Scott C Blanchard. Cyanine fluorophore derivatives with enhanced photostability. Nature methods, vol. 9, no. 1, pages 68–71, 2012. (Cité en pages 92 et 93.)
- [Asashima 2011] Asashima, Ishiura Ikeuchi, Irimura Ide, Ohya, Kodama Kamimura, Komazaki, Sato Sasagawa, Shibasaki, Takahashi Shimada ans Sugiyama, Takei, Masaki ans Yanagimoto Fukada et Watanabe. A comprehensive approach to lifescience. University of Tokyo, 2011. (Cité en pages 5, 7, 8 et 10.)
- [Atkins 2010] John F Atkins et Raymond F Gesteland. Recoding. Springer, 2010. (Cité en page 13.)
- [Atkins 2016] John F Atkins, Gary Loughran, Pramod R Bhatt, Andrew E Firth et Pavel V Baranov. Ribosomal frameshifting and transcriptional slippage : From genetic steganography and cryptography to adventitious use. Nucleic acids research, page gkw530, 2016. (Cité en page 16.)
- [Ban 2000] Nenad Ban, Poul Nissen, Jeffrey Hansen, Peter B Moore et Thomas A Steitz. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. Science, vol. 289, no. 5481, pages 905–920, 2000. (Cité en page 4.)
- [Ben-Shem 2011] Adam Ben-Shem, Nicolas Garreau de Loubresse, Sergey Melnikov, Lasse Jenner, Gulnara Yusupova et Marat Yusupov. The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. Science, vol. 334, no. 6062, pages 1524–1529, 2011. (Cité en page 4.)
- [Bharill 2011] Shashank Bharill, Chunlai Chen, Benjamin Stevens, Jaskiran Kaur, Zeev Smilansky, Wlodek Mandecki, Ignacy Gryczynski, Zygmunt Gryczynski, Barry S Cooperman et Yale E Goldman. Enhancement of single molecule fluorescence signals by colloidal silver nanoparticles in studies of protein translation. ACS nano, vol. 5, no. 1, page 399, 2011. (Cité en page 14.)
- [Bidou 1997] LAURE Bidou, GUILLAUME Stahl, BRIGITTE Grima, HONGMEI Liu, MICHEL Cassan et JEAN-PIERRE Rousset. In vivo HIV-1 frameshifting efficiency is directly related to the stability of the stem-loop stimulatory signal. Rna, vol. 3, no. 10, page 1153, 1997. (Cité en page 14.)

- [Bidou 2010] Laure Bidou, Jean-Pierre Rousset et Olivier Namy. Translational errors : from yeast to new therapeutic targets. FEMS yeast research, vol. 10, no. 8, pages 1070–1082, 2010. (Non cité.)
- [Bock 2013] Lars V Bock, Christian Blau, Gunnar F Schröder, Iakov I Davydov, Niels Fischer, Holger Stark, Marina V Rodnina, Andrea C Vaiana et Helmut Grubmüller. Energy barriers and driving forces in tRNA translocation through the ribosome. Nature structural & molecular biology, vol. 20, no. 12, pages 1390–1396, 2013. (Non cité.)
- [Borman 1995] Andrew M Borman, Jean-Luc Bailly, Marc Girard et Katherine M Kean. Picornavirus internal ribosome entry segments : comparison of translation efficiency and the requirements for optimal internal initiation of translation in vitro. Nucleic acids research, vol. 23, no. 18, pages 3656–3663, 1995. (Cité en pages 141 et 144.)
- [Borman 1997] Andrew M Borman, Philippe Le Mercier, Marc Girard et Katherine M Kean. Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. Nucleic acids research, vol. 25, no. 5, pages 925–932, 1997. (Cité en pages 141, 142 et 143.)
- [Breslauer 1986] Kenneth J Breslauer, Ronald Frank, Helmut Blöcker et Luis A Marky. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 83, no. 11, pages 3746–3750, 1986. (Cité en page 102.)
- [Brierley 1989] Ian Brierley, Paul Digard et Stephen C Inglis. Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal : requirement for an RNA pseudoknot. Cell, vol. 57, no. 4, pages 537–547, 1989. (Cité en page 17.)
- [Brierley 1997] Ian Brierley, Michayla R Meredith, Alison J Bloys et Tord G Hagervall. Expression of a coronavirus ribosomal frameshift signal in Escherichia coli : influence of tRNA anticodon modification on frameshifting. Journal of molecular biology, vol. 270, no. 3, pages 360–373, 1997. (Cité en page 18.)
- [Brierley 2006] Ian Brierley et Francisco J Dos Ramos. Programmed ribosomal frameshifting in HIV-1 and the SARS-CoV. Virus research, vol. 119, no. 1, pages 29–42, 2006. (Cité en page 14.)
- [Bugaud 2016] Olivier Bugaud. Suppression traductionnelle des codons stop chez les mammifères. PhD thesis, Paris Saclay, 2016. (Cité en pages ii et 19.)
- [Caliskan 2014] Neva Caliskan, Vladimir I Katunin, Riccardo Belardinelli, Frank Peske et Marina V Rodnina. Programmed–1 frameshifting by kinetic partitioning during impeded translocation. Cell, vol. 157, no. 7, pages 1619–1631, 2014. (Cité en pages 17 et 18.)
- [Caliskan 2015] Neva Caliskan, Frank Peske et Marina V Rodnina. Changed in translation : mRNA recoding by- 1 programmed ribosomal frameshifting. Trends in biochemical sciences, vol. 40, no. 5, pages 265–274, 2015. (Non cité.)
- [Chen 2012] Jonathan L Chen, Abigael L Dishler, Scott D Kennedy, Ilyas Yildirim, Biao Liu, Douglas H Turner et Martin J Serra. Testing the nearest neighbor model for canonical RNA base pairs : revision of GU parameters. Biochemistry, vol. 51, no. 16, pages 3508–3522, 2012. (Cité en pages 99 et 102.)

Bibliographie

- [Chen 2013] Chunlai Chen, Haibo Zhang, Steven L Broitman, Michael Reiche, Ian Farrell, Barry S Cooperman et Yale E Goldman. Dynamics of translation by single ribosomes through mRNA secondary structures. *Nature structural & molecular biology*, vol. 20, no. 5, pages 582–588, 2013. (Cité en pages 104 et 105.)
- [Chen 2014] Jin Chen, Alexey Petrov, Magnus Johansson, Albert Tsai, Se n E O’Leary et Joseph D Puglisi. Dynamic pathways of -1 translational frameshifting. *Nature*, vol. 512, no. 7514, pages 328–332, 2014. (Cité en pages 16, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 36, 40, 42 et 47.)
- [Chen 2017] Yu-Ting Chen, Kai-Chun Chang, Hao-Teng Hu, Yi-Lan Chen, You-Hsin Lin, Chiung-Fang Hsu, Cheng-Fu Chang, Kung-Yao Chang et Jin-Der Wen. Coordination among tertiary base pairs results in an efficient frameshift-stimulating RNA pseudoknot. *Nucleic acids research*, 2017. (Cité en page 21.)
- [Chommy 2012] Hélène Chommy. Fidélité de la traduction chez les eucaryotes. De la molécule au génome. PhD thesis, Paris 11, 2012. (Cité en page 3.)
- [Colussi 2015] Timothy M Colussi, David A Costantino, Jianyu Zhu, John Paul Donohue, Andrei A Korostelev, Zane A Jaafar, Terra-Dawn M Plank, Harry F Noller et Jeffrey S Kieft. Initiation of translation in bacteria by a structured eukaryotic IRES RNA. *Nature*, vol. 519, no. 7541, pages 110–113, 2015. (Non cité.)
- [Dorywalska 2005] Magdalena Dorywalska, Scott C Blanchard, Ruben L Gonzalez, Harold D Kim, Steven Chu et Joseph D Puglisi. Site-specific labeling of the ribosome for single-molecule spectroscopy. *Nucleic acids research*, vol. 33, no. 1, pages 182–189, 2005. (Cité en pages 24, 26 et 27.)
- [Dulin 2009] David Dulin. Observation de l’activité traductionnelle d’un ribosome unique par microscopie de fluorescence couplée   un système microfluidique. PhD thesis, Université Paris Sud-Paris XI, 2009. (Cité en pages 61 et 63.)
- [Dulude 2005] Dominic Dulude.  tude du mécanisme de décalage de phase de lecture en-1 du virus de l’immunodéficiency humaine de type 1 et de son importance dans la réplication du virus. 2005. (Cité en page 16.)
- [Dulude 2006] Dominic Dulude, Yamina A Berchiche, Karine Gendron, L a Brakier-Gingras et Nikolaus Heveker. Decreasing the frameshift efficiency translates into an equivalent reduction of the replication of the human immunodeficiency virus type 1. *Virology*, vol. 345, no. 1, pages 127–136, 2006. (Non cité.)
- [Fayet 2010] Olivier Fayet et Marie-Françoise Pr re. Programmed ribosomal- 1 frameshifting as a tradition : the bacterial transposable elements of the IS3 family. In *Recoding : Expansion of Decoding Rules Enriches Gene Expression*, pages 259–280. Springer, 2010. (Cité en page 14.)
- [Fei 2008] Jingyi Fei, Pallav Kosuri, Daniel D MacDougall et Ruben L Gonzalez. Coupling of ribosomal L1 stalk and tRNA dynamics during translation elongation. *Molecular cell*, vol. 30, no. 3, pages 348–359, 2008. (Cité en page 24.)
- [Fei 2010] Jingyi Fei, Jiangning Wang, Samuel H Sternberg, Daniel D MacDougall, Margaret M Elvekrog, Dileep K Pulukkunat, Michael T Englander et Ruben L Gonzalez. A highly

- purified, fluorescently labeled in vitro translation system for single-molecule studies of protein synthesis. *Methods in enzymology*, vol. 472, pages 221–259, 2010. (Cité en pages 24 et 25.)
- [Fern andez 2014] Israel S Fern andez, Xiao-Chen Bai, Garib Murshudov, Sjors HW Scheres et V Ramakrishnan. Initiation of translation by cricket paralysis virus IRES requires its translocation in the ribosome. *Cell*, vol. 157, no. 4, pages 823–831, 2014. (Cité en pages 36, 37, 38, 40, 42, 125 et 126.)
- [Fischer 2010] Niels Fischer, Andrey L Konevega, Wolfgang Wintermeyer, Marina V Rodnina et Holger Stark. Ribosome dynamics and tRNA movement by time-resolved electron cryomicroscopy. *Nature*, vol. 466, no. 7304, pages 329–333, 2010. (Non cité.)
- [Fiszman 2013] Nicolas Fiszman. Etude de cinétique de la traduction eucaryote   l’échelle de la molécule unique. PhD thesis, Institut d’Optique Graduate School, 2013. (Cité en pages 70, 71, 92, 100, 101, 102 et 121.)
- [Frank 2000] Joachim Frank et Rajendra Kumar Agrawal. A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature*, vol. 406, no. 6793, pages 318–322, 2000. (Cité en page 8.)
- [Fuchs 2015] Gabriele Fuchs, Alexey N Petrov, Caleb D Marceau, Lauren M Popov, Jin Chen, Se n E O’Leary, Richard Wang, Jan E Carette, Peter Sarnow et Joseph D Puglisi. Kinetic pathway of 40S ribosomal subunit recruitment to hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, no. 2, pages 319–325, 2015. (Non cité.)
- [Furuichi 2001] Yasuhiro Furuichi. Caps on eukaryotic mRNAs. eLS, 2001. (Cité en page 4.)
- [Gesteland 1992] RF Gesteland, RB Weiss et John F Atkins. Recoding : reprogrammed genetic decoding. *Science*, vol. 257, no. 5077, pages 1640–1642, 1992. (Cité en page 9.)
- [Giedroc 2009] David P Giedroc et Peter V Cornish. Frameshifting RNA pseudoknots : structure and mechanism. *Virus research*, vol. 139, no. 2, pages 193–208, 2009. (Non cité.)
- [Jacks 1988] Tyler Jacks, Hiten D Madhani, Frank R Masiarz et Harold E Varmus. Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus gag-pol region. *Cell*, vol. 55, no. 3, pages 447–458, 1988. (Cité en page 15.)
- [Jang 2010] Christopher J Jang et Eric Jan. Modular domains of the Dicistroviridae intergenic internal ribosome entry site. *Rna*, vol. 16, no. 6, pages 1182–1195, 2010. (Cité en page 37.)
- [Jenner 2010] Lasse B Jenner, Natalia Demeshkina, Gulnara Yusupova et Marat Yusupov. Structural aspects of messenger RNA reading frame maintenance by the ribosome. *Nature structural & molecular biology*, vol. 17, no. 5, pages 555–560, 2010. (Cité en page 9.)
- [Julián 2008] Patricia Julián, Andrey L Konevega, Sjors HW Scheres, Melisa L zaro, David Gil, Wolfgang Wintermeyer, Marina V Rodnina et Mikel Valle. Structure of ratcheted ribosomes with tRNAs in hybrid states. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no. 44, pages 16924–16927, 2008. (Cité en page 8.)
- [Kaminishi 2007] Tatsuya Kaminishi, Daniel N Wilson, Chie Takemoto, Joerg M Harms, Masahito Kawazoe, Frank Schlutzenzen, Kyoko Hanawa-Suetsugu, Mikako Shirouzu, Paola Fucini et Shigeyuki Yokoyama. A snapshot of the 30S ribosomal subunit capturing mRNA

Bibliographie

- via the Shine-Dalgarno interaction. *Structure*, vol. 15, no. 3, pages 289–297, 2007. (Non cité.)
- [Katranidis 2009] Alexandros Katranidis, Diaa Atta, Ramona Schlesinger, Knud H Nierhaus, Theodora Choli-Papadopoulou, Ingo Gregor, Michael Gerrits, Georg Büldt et Jörg Fitter. Fast biosynthesis of GFP molecules : a single-molecule fluorescence study. *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 48, no. 10, pages 1758–1761, 2009. (Cité en pages 24 et 44.)
- [Katz 2016] Zachary B Katz, Brian P English, Timothée Lionnet, Young J Yoon, Nilah Monnier, Ben Ovryn, Mark Bathe et Robert H Singer. Mapping translation ‘hot-spots’ in live cells by tracking single molecules of mRNA and ribosomes. *Elife*, vol. 5, page e10415, 2016. (Non cité.)
- [Kieft 2008] Jeffrey S Kieft. Viral IRES RNA structures and ribosome interactions. *Trends in biochemical sciences*, vol. 33, no. 6, pages 274–283, 2008. (Cité en page 11.)
- [Korostelev 2007] Andrei Korostelev, Sergei Trakhanov, Haruichi Asahara, Martin Laurberg, Laura Lancaster et Harry F Noller. Interactions and dynamics of the Shine–Dalgarno helix in the 70S ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 43, pages 16840–16843, 2007. (Cité en page 16.)
- [Lamphear 1995] Barry J Lamphear, Regina Kirchweiger, Tim Skern et Robert E Rhoads. Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 37, pages 21975–21983, 1995. (Cité en page 11.)
- [Larsen 1997] Bente Larsen, Raymond F Gesteland et John F Atkins. Structural probing and mutagenic analysis of the stem-loop required for Escherichia coli dnaX ribosomal frameshifting : programmed efficiency of 50%. *Journal of molecular biology*, vol. 271, no. 1, pages 47–60, 1997. (Cité en page 16.)
- [Levene 2003] Michael J Levene, Jonas Korlach, Stephen W Turner, Mathieu Foquet, Harold G Craighead et Watt W Webb. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science*, vol. 299, no. 5607, pages 682–686, 2003. (Cité en page 23.)
- [Marshall 2008] R Andrew Marshall, Magdalena Dorywalska et Joseph D Puglisi. Irreversible chemical steps control intersubunit dynamics during translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no. 40, pages 15364–15369, 2008. (Cité en page 25.)
- [Michalet 2002] Xavier Michalet et Shimon Weiss. Single-molecule spectroscopy and microscopy. *Comptes Rendus Physique*, vol. 3, no. 5, pages 619–644, 2002. (Non cité.)
- [Mokrejš 2006] Martin Mokrejš, Václav Vopálenský, Ondřej Kolenatý, Tomáš Mašek, Zuzana Feketová, Petra Sekyrová, Barbora Škaloudová, Vítězslav Kříž et Martin Pospíšek. IRESite : the database of experimentally verified IRES structures (www.iresite.org). *Nucleic acids research*, vol. 34, no. suppl_1, pages D125–D130, 2006. (Cité en page 11.)
- [Morisaki 2016] Tatsuya Morisaki, Kenneth Lyon, Keith F DeLuca, Jennifer G DeLuca, Brian P English, Zhengjian Zhang, Luke D Lavis, Jonathan B Grimm, Sarada Viswanathan,

- Loren L Looger et al. Real-time quantification of single RNA translation dynamics in living cells. *Science*, vol. 352, no. 6292, pages 1425–1429, 2016. (Cité en pages 43 et 44.)
- [Namy 2003] Olivier Namy, Guillemette Duchateau-Nguyen, Isabelle Hatin, Sylvie Hermann-Le Denmat, Michel Termier et Jean-Pierre Rousset. Identification of stop codon readthrough genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research*, vol. 31, no. 9, pages 2289–2296, 2003. (Cité en page 18.)
- [Namy 2006] Olivier Namy, Stephen J Moran, David I Stuart, Robert JC Gilbert et Ian Brierley. A mechanical explanation of RNA pseudoknot function in programmed ribosomal frameshifting. *Nature*, vol. 441, no. 7090, pages 244–247, 2006. (Cité en pages 35 et 36.)
- [Panthu 2013] Baptiste Panthu. Développement d’un nouveau système hybride de traduction in vitro et étude du rôle traductionnel de la protéine NS1 de l’Influenza A. PhD thesis, Lyon 1, 2013. (Non cité.)
- [Panthu 2015] Baptiste Panthu, Didier D cimo, Laurent Balvay et Théophile Ohlmann. In vitro translation in a hybrid cell free lysate with exogenous cellular ribosomes. *Biochemical Journal*, vol. 467, no. 3, pages 387–398, 2015. (Cité en page 141.)
- [Pérard 2009] Julien Pérard, Rodolfo Rasia, Jan Medenbach, Isabel Ayala, Jérôme Boisbouvier, Emmanuel Drouet et Florence Baudin. Human initiation factor eIF3 subunit b interacts with HCV IRES RNA through its N-terminal RNA recognition motif. *FEBS letters*, vol. 583, no. 1, pages 70–74, 2009. (Cité en page 147.)
- [Pérard 2010] Julien Pérard, Emmanuel Drouet et Florence Baudin. Le rôle des IRES dans l’initiation de la traduction. *Virologie*, vol. 14, no. 4, pages 241–253, 2010. (Cité en pages 11, 12, 142 et 143.)
- [Pestova 2003] Tatyana V Pestova et Christopher UT Hellen. Translation elongation after assembly of ribosomes on the Cricket paralysis virus internal ribosomal entry site without initiation factors or initiator tRNA. *Genes & development*, vol. 17, no. 2, pages 181–186, 2003. (Cité en page 37.)
- [Pestova 2004] Tatyana V Pestova, Ivan B Lomakin et Christopher UT Hellen. Position of the CrPV IRES on the 40S subunit and factor dependence of IRES/80S ribosome assembly. *EMBO reports*, vol. 5, no. 9, pages 906–913, 2004. (Cité en pages 134, 140 et 147.)
- [Petrov 2010] Alexey Petrov et Joseph D Puglisi. Site-specific labeling of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes for single-molecule manipulations. *Nucleic acids research*, vol. 38, no. 13, pages e143–e143, 2010. (Cité en pages 25, 27 et 43.)
- [Petrov 2016] Alexey Petrov, Rosslyn Grosely, Jin Chen, Se n E O’Leary et Joseph D Puglisi. Multiple Parallel Pathways of Translation Initiation on the CrPV IRES. *Molecular cell*, vol. 62, no. 1, pages 92–103, 2016. (Cité en pages 38, 39, 40, 41, 47, 125, 126 et 148.)
- [Plant 2008] Ewan P Plant et Jonathan D Dinman. The role of programmed-1 ribosomal frameshifting in coronavirus propagation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, vol. 13, page 4873, 2008. (Cité en page 17.)
- [Quade 2015] Nick Quade, Daniel Boehringer, Marc Leibundgut, Joop Van Den Heuvel et Nenad Ban. Cryo-EM structure of Hepatitis C virus IRES bound to the human ribosome at 3.9-  resolution. *Nature communications*, vol. 6, 2015. (Non cité.)

Bibliographie

- [Ritchie 2012] Dustin B Ritchie, Daniel AN Foster et Michael T Woodside. Programmed- 1 frameshifting efficiency correlates with RNA pseudoknot conformational plasticity, not resistance to mechanical unfolding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no. 40, pages 16167–16172, 2012. (Cité en page 21.)
- [Rudorf 2015] Sophia Rudorf et Reinhard Lipowsky. Protein Synthesis in E. coli : Dependence of Codon-Specific Elongation on tRNA Concentration and Codon Usage. *PloS one*, vol. 10, no. 8, page e0134994, 2015. (Non cité.)
- [SantaLucia 1996] John SantaLucia, Hatim T Allawi et P Ananda Seneviratne. Improved nearest-neighbor parameters for predicting DNA duplex stability. *Biochemistry*, vol. 35, no. 11, pages 3555–3562, 1996. (Cité en page 102.)
- [SantaLucia 1998] John SantaLucia. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 95, no. 4, pages 1460–1465, 1998. (Non cité.)
- [Schluenzen 2000] Frank Schluenzen, Ante Tocilj, Raz Zarivach, Joerg Harms, Marco Gluehmann, Daniela Janell, Anat Bashan, Heike Bartels, Ilana Agmon, François Franceschiet al. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *Cell*, vol. 102, no. 5, pages 615–623, 2000. (Cité en pages 4 et 24.)
- [Takyar 2005] Seyedtaghi Takyar, Robyn P Hickerson et Harry F Noller. mRNA helicase activity of the ribosome. *Cell*, vol. 120, no. 1, pages 49–58, 2005. (Cité en page 51.)
- [Tanenbaum 2014] Marvin E Tanenbaum, Luke A Gilbert, Lei S Qi, Jonathan S Weissman et Ronald D Vale. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell*, vol. 159, no. 3, pages 635–646, 2014. (Cité en page 125.)
- [Uemura 2007] Sotaro Uemura, Magdalena Dorywalska, Tae-Hee Lee, Harold D Kim, Joseph D Puglisi et Steven Chu. Peptide bond formation destabilizes Shine–Dalgarno interaction on the ribosome. *Nature*, vol. 446, no. 7134, pages 454–457, 2007. (Non cité.)
- [Uemura 2010] Sotaro Uemura, Colin Echeverría Aitken, Jonas Korlach, Benjamin A Flusberg, Stephen W Turner et Joseph D Puglisi. Real-time tRNA transit on single translating ribosomes at codon resolution. *Nature*, vol. 464, no. 7291, pages 1012–1017, 2010. (Non cité.)
- [Viphakone 2008] Nicolas Viphakone, Florence Voisinnet-Hakil et Lionel Minvielle-Sebastia. Molecular dissection of mRNA poly (A) tail length control in yeast. *Nucleic acids research*, vol. 36, no. 7, pages 2418–2433, 2008. (Cité en page 4.)
- [von Ahsen 2001] Nicolas von Ahsen, Carl T Wittwer et Ekkehard Schütz. Oligonucleotide melting temperatures under PCR conditions : nearest-neighbor corrections for Mg²⁺, deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas. *Clinical Chemistry*, vol. 47, no. 11, pages 1956–1961, 2001. (Cité en page 99.)
- [Wilson 2014] Daniel N Wilson. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 12, no. 1, pages 35–48, 2014. (Non cité.)
- [Wimberly 2000] Brian T Wimberly, Ditlev E Brodersen, William M Clemons, Robert J Morgan-Warren, Andrew P Carter, Clemens Vornrhein, Thomas Hartsch et V Ramakrishnan.

- Structure of the 30S ribosomal subunit. Nature, vol. 407, no. 6802, pages 327–339, 2000. (Cité en pages 4 et 24.)
- [Wu 2016] Bin Wu, Carolina Eliscovich, Young J Yoon et Robert H Singer. Translation dynamics of single mRNAs in live cells and neurons. Science, vol. 352, no. 6292, pages 1430–1435, 2016. (Cité en pages 43, 44, 46, 125 et 129.)
- [Yan 2015] Shannon Yan, Jin-Der Wen, Carlos Bustamante et Ignacio Tinoco. Ribosome excursions during mRNA translocation mediate broad branching of frameshift pathways. Cell, vol. 160, no. 5, pages 870–881, 2015. (Cité en page 21.)
- [Yan 2016] Xiaowei Yan, Tim A Hoek, Ronald D Vale et Marvin E Tanenbaum. Dynamics of translation of single mRNA molecules in vivo. Cell, vol. 165, no. 4, pages 976–989, 2016. (Cité en pages 43, 44, 45, 46, 47, 125 et 129.)
- [Yusupov 2001] Marat M Yusupov, Gulnara Zh Yusupova, Albion Baucom, Kate Lieberman, Thomas N Earnest, JHD Cate et Harry F Noller. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. science, vol. 292, no. 5518, pages 883–896, 2001. (Cité en page 24.)
- [Zhang 2016] Haibo Zhang, Martin Y Ng, Yuanwei Chen et Barry S Cooperman. Kinetics of initiating polypeptide elongation in an IRES-dependent system. Elife, vol. 5, page e13429, 2016. (Cité en pages 125 et 126.)

Titre : Etude des erreurs programmées du ribosome mammifère par microscopie de fluorescence en molécule unique

Mots clés : ribosome, TIRFM, molécule unique, structures IRES, erreurs programmées.

Résumé : La synthèse des protéines est un mécanisme central de la vie cellulaire dont la compréhension est un enjeu pour la recherche biomédicale. Des phénomènes comme les erreurs programmées de la traduction eucaryote ou l'initiation par des structures IRES virales sont impliqués dans les processus de réplication de virus et de bactéries. Mieux appréhender ces processus est une étape essentielle pour aboutir au développement d'approches thérapeutiques innovantes. Les études en molécule unique permettent d'observer chaque système réactionnel individuellement et donnent accès à des événements asynchrones difficilement observables en mesure d'ensemble, tels la traduction de protéines.

Ce manuscrit de thèse présente une approche d'étude de la traduction par un ribosome eucaryote (mammifère) en molécule unique. Nous observons les systèmes traductionnels grâce à des marqueurs fluorescents liés à des oligonucléotides pouvant s'hybrider sur les séquences d'ARN messagers traduites. L'observation de ces marqueurs est faite par microscopie de fluorescence en réflexion totale (TIRFM), les ARNm étant accrochés à la surface de l'échantillon. En lisant l'ARNm, le ribosome détache les marqueurs, et leurs instants de départ nous permettent de remonter à la dynamique de traduction de ribosomes individuels. Cette méthode permet d'obtenir des données cinétiques statistiques sur un grand nombre de systèmes traductionnels en parallèle pouvant alors être ajustées par des lois de probabilité. Partant de ce principe, mes travaux de thèse ont eu pour objectif d'étendre nos expériences à une nouvelle problématique biologique : l'étude des événements non canoniques de la traduction eucaryote. Pour cela nous avons apporté les modifications et les optimisations nécessaires au dispositif et au protocole expérimental pour l'adapter à ces nouveaux enjeux.

Nos mesures de la cinétique in vitro de l'élongation eucaryote ont mis à jour un délai dû à une initiation non-canonique. En effet, nous réalisons le recrutement du ribosome par l'ARNm grâce à une structure virale de type IRES. Dans nos conditions d'expérience, l'incorporation d'un acide aminé prend environ une seconde tandis que cette structure induit un retard à la traduction de plusieurs dizaines de secondes. Nous avons réalisé une étude comparative de plusieurs de ces structures virales et avons montré que le délai mesuré était une caractéristique conservée dans le cadre de l'initiation non canonique. Ce résultat ouvre des perspectives d'études cinétiques tant pour approfondir nos conclusions sur les IRES que pour aborder d'autres événements non canoniques tels que le décalage de la phase de lecture ou le franchissement du codon stop.

Title : Study of eukaryotic translation recoding events by single molecule fluorescence microscopy

Keywords : ribosome, TIRFM, single molecule, IRES structure, recoding events.

Abstract : The synthesis of proteins is a central mechanism of cellular life whose understanding is an issue for biomedical research. Phenomena such as programmed errors of eukaryotic translation or initiation by viral IRES structures are involved in virus and bacterial replication processes. A better understanding of these processes is an essential step towards the development of innovative therapeutic approaches.

Single molecule studies allow each reaction system to be observed individually and give access to asynchronous events, such as protein translation, that are difficult to observe in overall measurements. This PhD manuscript presents a single molecule approach to study translation by a eukaryotic (mammalian) ribosome.

We observe the translational systems thanks to fluorescent primers linked to oligonucleotides that are hybridized to the translated mRNA sequences. These markers are observed by Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM) with the mRNAs attached to the sample surface. While reading the mRNA, the ribosome detaches the primers, and their instants of departure give us access to the translation dynamics of individual ribosomes. This method makes it possible to obtain statistical kinetic data on a large number of parallel translational systems, which can then be fitted by probability laws. On the basis of this principle, my PhD work aimed at extending our experiments to a new biological issue : the study of non-canonical events in eukaryotic translation. To this end, we have made the modifications and optimizations necessary to adapt the set-up and the experimental protocols to these new challenges.

Our measurements of the in vitro kinetics of eukaryotic elongation have revealed a delay due to non-canonical initiation. Indeed, the ribosome are recruited on the mRNA thanks to a viral, IRES type structure. Under our experimental conditions, the incorporation of an amino acid takes about one second while this structure induces a translation delay of several tens of seconds. We carried out a comparative study of several of these viral structures and showed that the measured delay was a characteristic preserved in the framework of the non-canonical initiation. This result opens up prospects for kinetic studies both to deepen our conclusions on IRES and to address other non-canonical events such as programmed frameshifting or STOP codon readthrough.