



HAL
open science

Etude de cinétique de la traduction eucaryote à l'échelle de la molécule unique

Nicolas Fiszman

► **To cite this version:**

Nicolas Fiszman. Etude de cinétique de la traduction eucaryote à l'échelle de la molécule unique. Optique [physics.optics]. Institut d'Optique Graduate School, 2013. Français. NNT : 2013IOTA0001 . pastel-00939858

HAL Id: pastel-00939858

<https://pastel.hal.science/pastel-00939858>

Submitted on 31 Jan 2014

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.

LABORATOIRE CHARLES FABRY
INSTITUT D'OPTIQUE GRADUATE SCHOOL
ÉCOLE DOCTORALE ONDES ET MATIÈRE

THÈSE

pour l'obtention du grade de Docteur en sciences de l'Institut d'Optique
spécialité biophysique

présentée par

Nicolas FISZMAN

ÉTUDE CINÉTIQUE DE LA TRADUCTION
EUCARYOTE À L'ÉCHELLE DE LA MOLÉCULE
UNIQUE

Soutenue le 18 octobre 2013 devant la commission d'examen :

Giovanni Cappello	Rapporteur
Emmanuel Margeat	Rapporteur
Françoise Livolant	Présidente
Emmanuelle Schmitt	Examinatrice
Nathalie Westbrook	Directrice de thèse
Karen Perronet	Membre invité

Remerciements

Il est écrit sur la couverture de ce manuscrit qu'il s'agit de la thèse d'un certain Nicolas Fiszman. Si ce dernier était effectivement impliqué (voire trempait jusqu'au cou) dans les travaux présentement décrits, il convient de préciser que cette thèse n'aurait jamais eu lieu sans la participation et l'aide d'une multitude de personnes que je souhaite remercier ici.

Je remercie donc le Laboratoire Charles Fabry pour m'avoir accueilli pendant trois ans sur l'un des plus beaux plateaux de France dans un cadre idéal et ses directeurs successifs Christian Chardonnet et Pierre Chavel pour m'avoir ouvert les portes de leur laboratoire. Je remercie le CNRS qui a gracieusement financé ces trois années et le directeur du CGM, Frédéric Boccard, sans qui je n'aurais peut-être pas eu de financement pour ma thèse.

Je tiens à remercier Giovanni Cappello, Emmanuel Margeat, Françoise Livolant et Emmanuelle Schmitt pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et pour leur bienveillance lors de la soutenance.

Un grand merci à Nathalie Westbrook qui a été une directrice de thèse formidable, toujours souriante et qui a passé de longues heures à me relire et me faire répéter. Si jamais ce manuscrit contient quelques explications et clarifications, c'est entièrement grâce à elle.

Je remercie bien évidemment Karen Perronet qui m'a encadré ces trois années depuis mon initiation à LabView et Igor sur lesquels nous avons passé de nombreuses et passionnantes heures¹ jusqu'à la relecture de ce manuscrit et ses avis encourageants à l'approche des deadlines. Karen est impliquée dans un nombre incalculable de projets, d'associations, de conseils de labo, d'enfants à élever, et d'activités diverses et variées et pourtant trouve toujours le temps de m'aider ou de répondre à mes questions. Je pense donc avoir assisté à un miracle continu. Si je faisais la liste des superlatifs mélioratifs adaptés pour qualifier Karen, ces remerciements atteindraient une longueur tout à fait déraisonnable uniquement limitée par ma méconnaissance des subtilités de la langue française. Parmi tant d'autre éléments dignes de remerciements, je citerai ce voyage à Lisbonne qui était à l'époque source de stress mais a été promu au rang d'excellent souvenir.

Ma première année dans l'équipe μ s'est déroulée en compagnie d'Antoine Le Gall. Antoine

1. Au sujet de la programmation, j'ai peur d'avoir été celui qui en a le plus profité, il n'empêche que programmer en compagnie de Karen était bien plus sympa que de le faire seul.

m'a alors tout appris sur la façon de préparer une manip de tirf : préparation des lamelles et phobie des RNAses, alignement optique et superposition de 3000 petits faisceaux retours facétieux, utilisation du séquenceur et apprentissage de la séquence de clics optimale... Au-delà de ces considérations professionnelles, Antoine est un camarade fantastique qui n'hésite pas à revenir de Montpellier où il est parti se bronzer en postdoc pour assister à ma soutenance de thèse. Je ne peux que regretter ces soirées après une dure journée de chimie de surface à disputer une partie de Khet, laquelle Antoine, sous ses airs de gentil, n'avait que trop souvent aucun scrupule à gagner impitoyablement.

Enfin, dernière arrivée dans notre équipe, Flavie Gillant a partagé notre bureau lors de mon dernier semestre à l'Institut pour mon plus grand malheur² : en effet, elle et moi avons des points de vue, des goûts et des réactions diamétralement opposés dans à peu près tous les domaines ce qui nous a mené à débattre longuement sur tout et n'importe quoi. Personnellement j'ai apprécié. Si Flavie n'effectuera pas sa thèse sur le même sujet que moi, j'ai cependant réussi (après force insistance³ auprès de François Goudail) à lui transmettre le flambeau pour l'enseignement du langage C et je la remercie pour l'ardeur avec laquelle elle s'est attelée à ce défi.

Merci également à David Dulin, le premier doctorant de cette manip, qui a mis en place ce beau montage qui m'a occupé ces trois ans et qui nous a enfin donné de beaux résultats. Prévoyant, David avait bâti pour la durée et serré les vis de façon... solide.

Je remercie Dominique Fourmy, Satoko Yoshizawa, Nicolas Soler et Hélène Walbott du CGM avec qui nous avons collaboré sur la traduction des ribosomes procaryotes, sujet à l'origine de ma thèse. J'ai dès le début été accueilli au 221b⁴ pour découvrir les techniques de biologies mises en œuvre avant l'étape d'observation sur le microscope.

Je remercie Olivier Namy de l'IGM ainsi que son équipe. Olivier a toujours été disponible lorsqu'il s'agissait de m'expliquer la biologie sous-jacente à nos expériences. J'ai en particulier collaboré avec Hélène Chommy, doctorante lors de mes deux premières années qui venait régulièrement à l'Institut pour des séances d'observation de fluorophores, souvent capricieux, jusqu'à des heures indues. L'expérience a dû lui plaire car elle est revenue une fois docteur pour deux mois à l'Institut suivre un régime molécule unique intensif. Ce qui était parti pour être de longues après-midi déprimantes, nos expériences ayant généralement un comportement non reproductible, s'est alors rapidement transformé en une course à l'acquisition de la plus grande quantité de données possible. L'un de mes plus beaux souvenirs de cette thèse est cette marche vers Lozère, à pied, à 23h30, un 13 décembre sous la neige, Hélène et moi surexcités par la toute première courbe de notre expérience à deux couleurs présentant un pic là où nous espérons en trouver un. Les autres membres de l'IGM que j'ai pu rencontrer ont tous été plus

2. Malheur de n'avoir travaillé avec elle que 6 mois et non un an et demi comme cela aurait pu être le cas.

3. fake

4. Le numéro du bureau de Dominique m'a toujours fait penser à l'adresse de Sherlock Holmes.

aimables les une que les autres : Olivier Bugaud, Laure Bidou, Sandra Blanchet, Isabelle Hatin et Matthieu Saguy.

De l'ISV, je remercie Carmela Giglione et Alexandre Pozza avec qui nous avons tenté d'observer des cofacteurs de la traduction. Du LOB, je remercie Antigoni Alexandrou et Maximilian Richly avec qui nous avons collaboré sur un projet de pince optique⁵ et qui m'ont fait participer malgré l'éloignement de ce projet et de mon activité principale. Du LadHyX, je remercie Abdul Barakat, Julien Husson avec qui, pour le coup, je n'ai pas travaillé mais qui ont apporté de nouveaux projets passionnants à développer au sein de notre équipe.

Merci au groupe biophotonique, à Michael Canva, Julien Moreau, Arnaud Dubois, Maha Chamtouri, Alexandra Sereda, Antoine Federici, Mitraddeep Sarkar, Aurore Olivero, Jean-François Bryche, Mariela Rodriguez Otazo, Houssine Makhoul, Masreshaw Bayleyegn et Alain Bellemain. Grâce à ce joyeux groupe, les repas au Magnan ont toujours été un plaisir et ce même lorsque il était impossible de trouver trois desserts potables. Avant la création de ce fantastique groupe, j'ai été accueilli dans le groupe optique atomique⁶ qui m'a permis de découvrir le monde merveilleux des atomes froids.

Au cours de ces trois années, j'ai eu l'occasion de travailler avec (et parfois même d'encadrer) plusieurs stagiaires à qui je n'ai jamais regretté d'avoir ouvert ma salle de manip : Alvin, Cécile, Jean, Clotilde, Laetitia, Éric et Julien.

Au delà des deux groupes cités, j'ai rencontré de nombreuses personnes, principalement du laboratoire Charles Fabry (mais pas seulement) que je voudrais remercier : Martine Basset, Bernard Bourguignon, Eric Charron et Jean-Jacques Greffet de l'école doctorale ondes et matière ; Nathalie Baudry et Marie-Laure Edwards pour la partie administrative qui ont répondu à toutes mes nombreuses questions au sujet des divers formulaires ainsi que Fatima Pereira pour m'avoir bien aidé pour le pot de thèse, épreuve délicate s'il en est ; Anne-Lise Coutrot, Florence Fuchs, Frédéric Moron, André Villing, André Guilbaud, Patrick Roth, Christian Beurthe, Yannick Mercier, Jean-Luc Cadoré, Fabrice Cartier, Thierry Avignon et Laurent Leclercq pour les nombreux services qu'ils nous ont rendus ; Yvan Sortais qui m'a souvent confondu avec un auto-stoppeur ; et enfin Margaux, Jérémy, Jean et Anthony qui m'ont offert des aperçus des autres groupes du laboratoire.

Côté enseignement, j'ai eu la chance d'être accueilli dans les équipes pédagogiques de Maths et Signal et de langage C avec qui ce fut un plaisir de travailler. Je remercie donc Jean-Marie Feybesse, François Goudail, Hervé Sauer, Fabienne Bernard, Sylvie Lebrun, Gaétan Messin,

5. Et avec qui nous avons partagé quelques Bacalaos.

6. S'il faut donner des noms, je citerai : Thibaut, Bess, Isabelle, Philippe, Guillaume, Vincent, Rémi, Vincent, Fred, Killian, Ralf, Thomas, Simon, Andrea, Thomas, Baptiste, Guillaume, Thomas, Marie, Samuel, Guilhem, Laurent, Lynn, David, Denis, Chris, Josselin, Raphael, Marie et Jean-Christophe avec une mention spéciale pour ces derniers à qui nous devons la découverte du Khet et une diminution inexplicable de nos stocks de sucreries.

Alexandre Baron, Nouari Kebaili, Afaf Constant, Sita Baby, Cathel Tourmente, Lionel Jacobowicz qui m'a offert un café lors de mon premier jour à l'Institut et Sébastien de Rossi pour l'organisation de la fête de la Science. Je remercie aussi les élèves de l'Institut d'Optique qui ont eu le courage de me supporter en tant que chargé de TD.

Je conclurai ces remerciements en mentionnant mes amis et ma famille car s'ils n'ont que peu de rapport avec une étude sur les ribosomes, ils ont une bonne part de responsabilité dans mon appréciation très positive de ces trois années en tant que doctorant.

Table des matières

Introduction	1
1 Synthèse des protéines en molécule unique	5
1.1 Contexte biologique	5
1.1.1 Information génétique et protéines	5
1.1.2 Etapes de la traduction	8
1.2 Méthodes d'études classiques du ribosome	10
1.3 Etudes en molécule unique	12
1.3.1 Exemples de microscopies de fluorescence	13
1.3.2 Un exemple d'étude de l'activité hélicase des ribosomes	17
1.3.3 Un exemple d'étude de traduction de protéine	20
1.3.4 Le ribosome eucaryote en molécule unique	22
1.4 Nos objectifs	23
2 Mise en œuvre de l'étude cinétique de la traduction	27
2.1 Description du système rapporteur	27
2.2 Le montage optique	29
2.2.1 Excitation des fluorophores	29
2.2.2 Collecte des photons émis par les fluorophores excités	31
2.2.3 Système de maintien de la mise au point	33
2.3 Les cellules microfluidiques	34
2.4 Séquence d'acquisition	37
2.5 Accroche spécifique aux lamelles de microscope	38
2.6 Choix des oligos marqués	41
2.6.1 Hybridation des oligos	41
2.6.2 Amélioration de la durée de vie des fluorophores	46
2.7 Préparation des systèmes biologiques	47
2.7.1 Cas procaryote	47
2.7.2 Cas eucaryote	48
2.8 Conclusion	49

3	Traitement des images de molécules uniques	51
3.1	Contraintes expérimentales	51
3.2	Détection des particules	53
3.2.1	Critère de choix des paramètres de détection	54
3.2.2	Estimation du bruit de fond	56
3.2.3	Seuillage de l'image corrigée	59
3.2.4	Détection et sélection des particules d'intérêt	62
3.2.5	Colocalisations	63
3.3	Déterminer l'instant de disparition d'une particule	64
3.3.1	Traces temporelles	65
3.3.2	Tri des fluorophores selon leurs comportements	67
3.3.3	Instants de disparition des fluorophores retenus	71
3.4	Conclusion	73
4	Résultats expérimentaux sur la cinétique de traduction en molécule unique	75
4.1	Passage du ribosome eucaryote entre deux instants de la phase d'élongation	75
4.1.1	Acquisition à deux couleurs	77
4.1.2	Histogrammes des écarts temporels entre les disparitions des deux oligos	78
4.1.3	Résultats et interprétation	81
4.2	Étude de la traduction eucaryote entre l'initiation et un jalon	84
4.2.1	Temps avant la disparition des fluorophores	85
4.2.2	Comparaison avec des séquences traduites plus longues	93
4.3	Conclusion	96
	Conclusion générale et perspectives	99
	A Protocoles	103
	B Glossaire	105
	Bibliographie	112

Introduction

La diversité des êtres vivants est la manifestation de la diversité des protéines qui les composent. La description de chaque protéine d'un organisme est contenue dans son génome. La synthèse d'une protéine suivant le gène correspondant s'appelle la traduction. Elle est effectuée par une macromolécule : le ribosome.

Le rôle joué par les ribosomes en fait un sujet de recherche de choix depuis leur découverte dans les années 50. Leur structure est désormais connue et depuis une dizaine d'années se multiplient les études du ribosome à l'échelle de la molécule unique. Ces études sont dans la grande majorité des études de ribosomes bactériens, plus faciles à modifier et marquer.

La présente thèse entre dans le cadre de cette poursuite de la compréhension de la traduction en portant ses efforts du côté du ribosome de mammifère. Nous cherchons à obtenir des informations sur la cinétique de traduction sur plusieurs cycles d'élongation. L'objectif à long terme est d'étudier des phénomènes cotraductionnels comme l'interaction du ribosome avec des structures secondaires sur l'ARNm, le repliement des protéines ou la terminaison. L'élongation étant la séquence d'incorporation des acides aminés composant la protéine traduite, il s'agit d'un processus qui se désynchronise dès lors que l'on observe plus d'un cycle : l'instant de départ du n ème cycle dépend du temps pris par le ribosome pour effectuer les cycles précédents qui ont chacun leur propre distribution de probabilité. Pour pouvoir resynchroniser ce processus, nous l'étudions en molécule unique, chaque système traductionnel étant observé individuellement. Les données peuvent ensuite être post-synchronisées pour obtenir des informations sur la statistique des vitesses d'élongation. Nous utilisons la microscopie de fluorescence par réflexion totale (TIRF) pour l'observation de molécules uniques.

Ce manuscrit décrit des travaux réalisés au sein du groupe biophotonique du Laboratoire Charles Fabry. Ces travaux poursuivent le projet d'étude du ribosome par microscopie de TIRF ayant déjà fait l'objet de la thèse de David Dulin [1], puis d'Antoine Le Gall [2] avec qui j'ai travaillé lors de sa dernière et ma première année de thèse. Depuis plusieurs années, notre équipe collabore avec Dominique Fourmy et Satoko Yoshizawa du Centre de Génétique Moléculaire sur des expériences en molécule unique utilisant des ribosomes bactériens. Un travail important a été réalisé dans ce cadre sur la méthode d'accroche spécifique des ribosomes à la surface et de nombreuses pistes ont été explorées pour marquer par fluorescence différents éléments du système : les acides aminés, les ribosomes, la protéine synthétisée. J'ai moi-même effectué

plusieurs études visant à améliorer la durée de vie des particules fluorescentes marquant les acides aminés dans des conditions compatibles avec la traduction, ou à observer la synthèse par un ribosome procaryote de protéines fluorescentes émettant dans le jaune.

Ces travaux ont été mis à profit dans le cadre d'une nouvelle collaboration qui a démarré au début de ma thèse avec l'équipe d'Olivier Namy de l'Institut de Génétique et Microbiologie. Il s'agissait cette fois d'études sur le ribosome eucaryote, plus précisément sur les ribosomes de lapins, avec comme objectif ultime l'étude de la terminaison. Ces expériences ont été effectuées en collaboration étroite avec Hélène Chommy [3], doctorante dans l'équipe d'Olivier Namy puis post-doctorante pour quelques mois dans notre équipe. Les résultats les plus marquants obtenus au cours de ma thèse l'ayant été sur ces ribosomes eucaryotes, c'est sur eux que je me concentrerai dans ce manuscrit.

Du point de vue du dispositif expérimental, vu les travaux déjà effectués par mes prédécesseurs sur le montage de microscopie de TIRF, j'ai principalement été amené à l'adapter à l'étude de nos nouveaux ribosomes de mammifères. Il s'agissait entre autres de modifier le montage pour permettre un suivi de la fluorescence dans deux couleurs distinctes en parallèle. J'ai dû améliorer la reproductibilité des expériences, ce qui est passé par l'amélioration de la chimie de surface ou encore le regroupement des expériences selon le lot d'extraits cellulaires utilisé. J'ai pour l'instant écarté l'utilisation de procédé de réduction de photoblanchiment car nous étions confrontés à une variation du taux de photoblanchiment au cours du temps. Pour avoir des expériences reproductibles, il était plus raisonnable de minimiser le photoblanchiment en optant pour un espacement des images lors de la séquence d'acquisition. Au niveau du traitement des données, j'ai également effectué un travail important d'optimisation afin d'obtenir un programme à la fois rapide et robuste. Cela nous a permis de traiter plus de données, ce qui était nécessaire pour avoir des résultats statistiquement significatifs, et cela a contribué à la reproductibilité des expériences. Enfin, en compagnie d'Hélène Chommy, j'ai assuré la préparation des expériences et la prise de données, toujours en optimisant le temps passé jusqu'à pouvoir faire 10 expériences dans la même journée là où l'on en faisait 4 au début de ma thèse.

Je présenterai donc mon travail en quatre chapitres. Le premier décrira le mécanisme de synthèse des protéines par les ribosomes. À l'aide de quelques articles choisis, je donnerai des exemples d'études de la traduction. Nous aborderons d'abord les études en mesures d'ensemble avant de montrer l'intérêt de l'approche par molécule unique. Nous positionnerons alors nos objectifs dans la continuité des études déjà réalisées en molécule unique.

Le second chapitre est consacré à la description de l'expérience de traduction en molécule unique. Nous présenterons d'abord la conception de l'échantillon puis toutes les étapes permettant de réaliser l'expérience. Nous décrirons notre montage optique utilisé pour créer

l'onde évanescente nécessaire à la microscopie TIRF et pour observer des fluorophores uniques excités par cette onde. Nous verrons comment préparer les surfaces de verre pour y placer nos ribosomes et nos fluorophores. Nous y détaillerons également la préparation des échantillons biologiques permettant de suivre la traduction d'une protéine à l'aide de fluorophores.

Le troisième chapitre portera sur le traitement des données. Les images de fluorophores obtenues à la fin d'une journée d'expériences doivent être analysées pour en extraire les temps mis par chaque ribosome pour effectuer plusieurs cycles d'élongation. Le programme présenté a pour fonctions principales la détection des fluorophores indépendamment du bruit de fond d'une part et la mesure des instants de disparition des fluorophores d'autre part. Ce programme est également capable de comparer les données provenant de fluorophores de couleurs différentes.

Enfin, le dernier chapitre présentera les résultats obtenus. Nous comparerons premièrement deux fluorophores différents interagissant avec le ribosome, l'un au début des cycles d'élongation étudiés, l'autre après une dizaine de cycles. Cela nous permettra d'obtenir une vitesse d'élongation *in vitro* pour des ribosomes de mammifères traduisant près d'une surface. Nous étudierons ensuite le comportement d'un seul fluorophore en se rapportant au début de l'expérience de traduction caractérisé par la mise en présence des ribosomes et du matériel de traduction. Cela fera apparaître un retard au départ du ribosome de sa position initiale correspondant à un phénomène différent, en plus des cycles d'élongation dont la vitesse estimée est compatible avec celle déterminée précédemment.

La mise au point et la caractérisation précise de ce système rapporteur ouvre la voie à de nombreuses études biologiques que nous présenterons à la fin de ce manuscrit.



Synthèse des protéines en molécule unique

Dans ce chapitre, nous présentons le mécanisme de traduction par lequel un ribosome synthétise une nouvelle protéine. Grâce à plusieurs exemples, nous présentons des études classiques du ribosome avant de montrer l'intérêt des études en molécule unique. Les études portant sur le ribosome et la traduction sont abondantes et nous ont permis d'en avoir une bonne compréhension. En particulier, les études structurales nous offrent une représentation du ribosome et de ses interactions avec les autres facteurs de la traduction. De plus, depuis une dizaine d'années, les études du ribosome en molécule unique se multiplient, apportant par la même occasion des informations sur la vitesse des étapes de la traduction. Nous nous positionnerons alors par rapport à ces études pour introduire notre objectif : l'étude de la cinétique de l'élongation, en particulier dans le cas de ribosomes de mammifères, en vue d'obtenir des informations sur le rôle de la cinétique dans la survenue d'événements rares traductionnels.

1.1 Contexte biologique

1.1.1 Information génétique et protéines

Les fonctions microbiologiques des êtres vivants sont majoritairement assurées par les protéines. Il est possible de trouver des exemples de protéines ayant des fonctions très variées :

- L'hémoglobine est une protéine dont la fonction est de transporter le dioxygène et le dioxyde de carbone entre les organes et le système respiratoire d'un organisme.
- Les anticorps sont des protéines spécialisées dans la détection de corps étrangers spécifiques. Ils font partie intégrante du système immunitaire.
- La kératine est une protéine fibreuse ayant un rôle de structure. Les cheveux sont composés de kératine.
- Les enzymes sont des protéines favorisant des réactions biochimiques diverses (synthèse de polymères ou dégradation de molécules par exemple).

- La myosine est une protéine motrice qui entre en jeu dans la contraction des cellules musculaires.

Cette liste est bien évidemment loin d'être exhaustive.

Les protéines sont des chaînes polypeptidiques (des séquences d'acides aminés) ayant un repliement spatial particulier (description à la figure 1.1). De la séquence et de la structure tridimensionnelle d'une protéine dépend la fonction de cette protéine. Les séquences des protéines d'un organisme sont codées dans son génome. Sauf exceptions (virus) le génome est codé sur une ou plusieurs chaînes d'acides désoxyribonucléiques (ADN). Chez l'être humain, on estime à 25 000 le nombre de gènes pouvant coder pour des protéines [4].

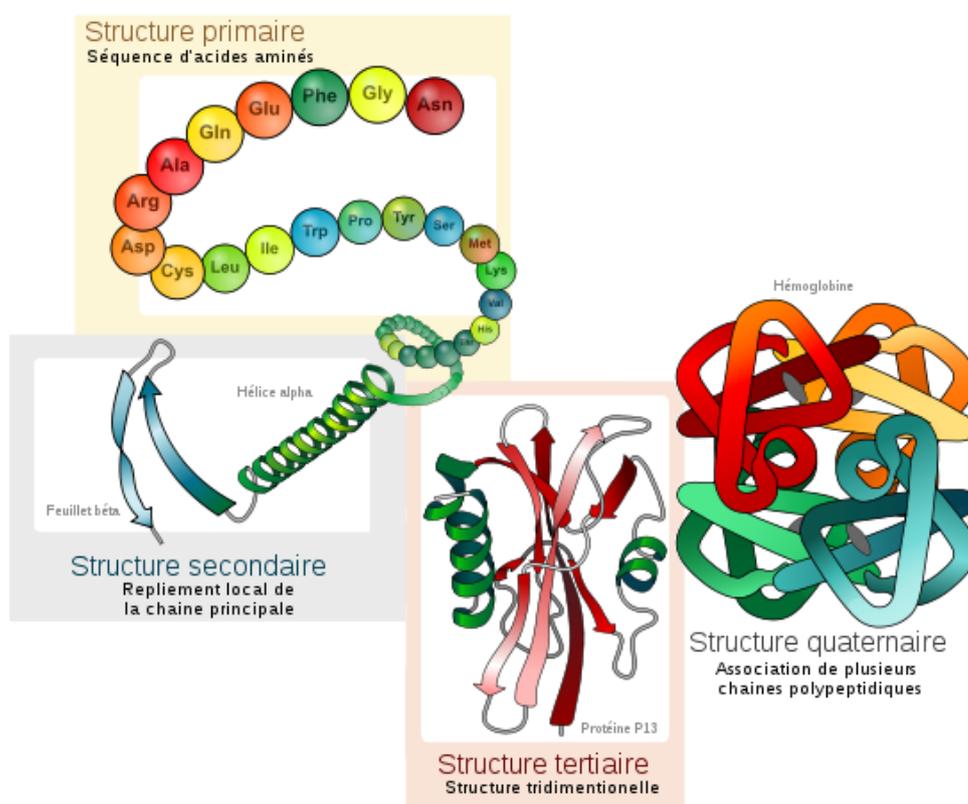


FIGURE 1.1 – Il est possible de représenter les protéines avec quatre niveaux d'information. La structure primaire de la protéine décrit la séquence d'acides aminés, et peut être déduite de la séquence de l'ARNm. La structure secondaire décrit les interactions non covalentes entre les acides aminés deux à deux. Cela fait généralement ressortir deux types d'arrangements : les hélices alpha et les feuillets bêta. La structure tertiaire donne la forme tridimensionnelle de la protéine. La structure quaternaire montre comment certaines chaînes polypeptidiques se lient entre elles pour former une protéine plus grande. Image issue du domaine public.

L'ADN est une macro-molécule stable qui permet de stocker l'information génétique tout au long de la vie d'un individu. La stabilité d'un tel polymère est rendue possible grâce à l'existence

1.1 Contexte biologique

d'un système de réparation de l'ADN. L'ADN se trouve sous forme de double hélice, chaque brin de l'hélice étant une chaîne de nucléotides : adénine (A), thymine (T), cytosine (C) ou guanine (G). Chaque nucléotide est associé avec un nucléotide complémentaire situé sur le second brin, les A s'appareillant avec les T, les C avec les G (figure 1.2).

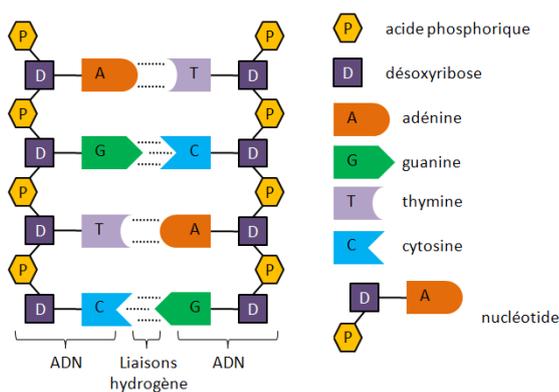


FIGURE 1.2 – Deux brins d'ADN hybridés l'un à l'autre. Notons que l'on trouve trois liaisons hydrogènes entre les bases C et G et seulement deux entre A et T ou U. Cela explique pourquoi les séquences riches en C et G forment des hybridations plus stables que les autres.

Une cellule doit pouvoir produire un grand nombre de protéines en peu de temps. La synthèse de protéines ne se fait pas à partir de l'ADN mais de copies sous forme d'ARN messenger (ARNm) obtenues après transcription de l'ADN. L'acide ribonucléique ne possède pas de base T mais une uracile (U) complémentaire de l'adénine. Les ARNm sont plus nombreux mais se dégradent beaucoup plus vite que l'ADN ayant servi de modèle. L'équilibre création/dégradation des ARNm permet un rééquilibrage rapide de la vitesse de synthèse des protéines associées.

La lecture des ARNm et la synthèse des protéines sont effectuées par une macromolécule, le ribosome, elle-même constituée de chaînes d'ARN ribosomiques et de protéines. Cette opération s'appelle la traduction car le ribosome traduit la séquence de nucléotides en séquence d'acides aminés. Par l'importance de sa fonction au sein de la cellule, le ribosome voit sa forme être bien conservée entre les différents organismes. Une distinction est cependant à faire entre les domaines des eucaryotes et des procaryotes (organismes possédant ou non un noyau cellulaire). Entre ces deux domaines, les ribosomes sont relativement différents (plus gros chez les eucaryotes) et la traduction ne se fait pas exactement de la même façon. Les points communs entre les traductions dans ces deux domaines sont cependant suffisamment nombreux pour en faire une description générale commune qui donne les grands principes de la traduction dans tous les organismes.

La traduction se fait selon le code génétique, les nucléotides étant lus trois par trois (ce qui donne 64 mots de trois lettres pour un tel alphabet à quatre lettres) du côté 5' vers 3'

de l'ARNm¹. Chaque triplet de nucléotide, appelé codon, correspond à un acide aminé parmi les vingt présents dans la plupart des organismes. Un codon (AUG) code pour la méthionine, un acide aminé utilisé pour marquer le début d'une protéine, ce codon est dans ce cas appelé codon start. Trois autres codons (UAA, UAG et UGA) ne sont pas associés à des acides aminés et marquent la fin de la séquence protéique, ils sont donc désignés comme des codons stop.

Pour associer un acide aminé à un codon, le ribosome utilise des ARNt (ARN de transfert). Les ARNt sont de courtes séquences d'ARN dont le repliement les rend aptes à se positionner dans des sites du ribosome notés A, P et E (A pour aminoacyl, P pour peptidyl et E pour exit). Ces ARNt sont dits chargés lorsqu'ils sont liés à un acide aminé. Les ARNt sont spécifiques à chaque acide aminé car ils contiennent l'anti-codon complémentaire au codon de cet acide aminé. Les sites A, P et E sont en contact avec l'ARNm lu par le ribosome où trois bases de l'ARNm (le codon) se retrouvent opposées à l'anti-codon de l'ARNt. Un ARNt peut entrer librement dans le site A et si ces trois bases ne sont pas complémentaires il libère l'emplacement. L'association entre un codon et un acide aminé donné se fait donc par les ARNt selon le code génétique. Un ARNt présentant le bon anti-codon dans le site A voit son acide aminé intégrer la nouvelle chaîne polypeptidique. Il passe ensuite dans le site P lors d'un mouvement de translocation du ribosome. Avec le mouvement de translocation suivant, l'ARNt passe du site P à E d'où il se détachera du ribosome. Il pourra alors être de nouveau chargé par un acide aminé.

1.1.2 Etapes de la traduction

La traduction se déroule en plusieurs étapes, résumées dans la figure 1.3. Premièrement a lieu l'initiation lors de laquelle le ribosome se positionne sur l'ARNm et se place au niveau du codon start. Un ARNt chargé d'une méthionine se place dans le site P du ribosome, la méthionine étant alors le premier acide aminé de la future chaîne polypeptidique. Le ribosome est alors la combinaison de deux sous-unités (une petite dite 30S² chez les procaryotes et 40S chez les eucaryotes et une grande, 50S pour les procaryotes et 60S pour les eucaryotes) naturellement séparées hors traduction. Quand elles sont associées, on obtient un ribosome procaryote complet 70S ou un eucaryote 80S.

Ensuite, lors de l'étape d'élongation, les ARNt viennent se placer les uns après les autres dans le site A du ribosome. Lorsque un ARNt correspond au codon en cours de lecture, le ribosome effectue un mouvement de translocation (ce qui le classe parmi les moteurs moléculaires)

1. L'ARNm est lu de 5' vers 3', ces chiffres correspondent au numéro du carbone du ribose libre en extrémité de chaîne.

2. Le nombre de S caractérisant les sous-unités et le ribosome sont des Svedberg ($1 S = 10^{-13} s$), une unité décrivant la vitesse de sédimentation constante divisée par l'accélération subie. Cette accélération se traduit par une force selon la masse de la particule et son rapport de densité avec le milieu. La vitesse est constante lorsque cette force s'équilibre avec les forces de frottement fluide dépendantes de la forme et du volume de la particule. Dans le cas du ribosome qui est une macromolécule dense (une vingtaine de nanomètres pour environ $4.10^6 Da$), un nombre de S élevé indique une particule lourde.

1.1 Contexte biologique

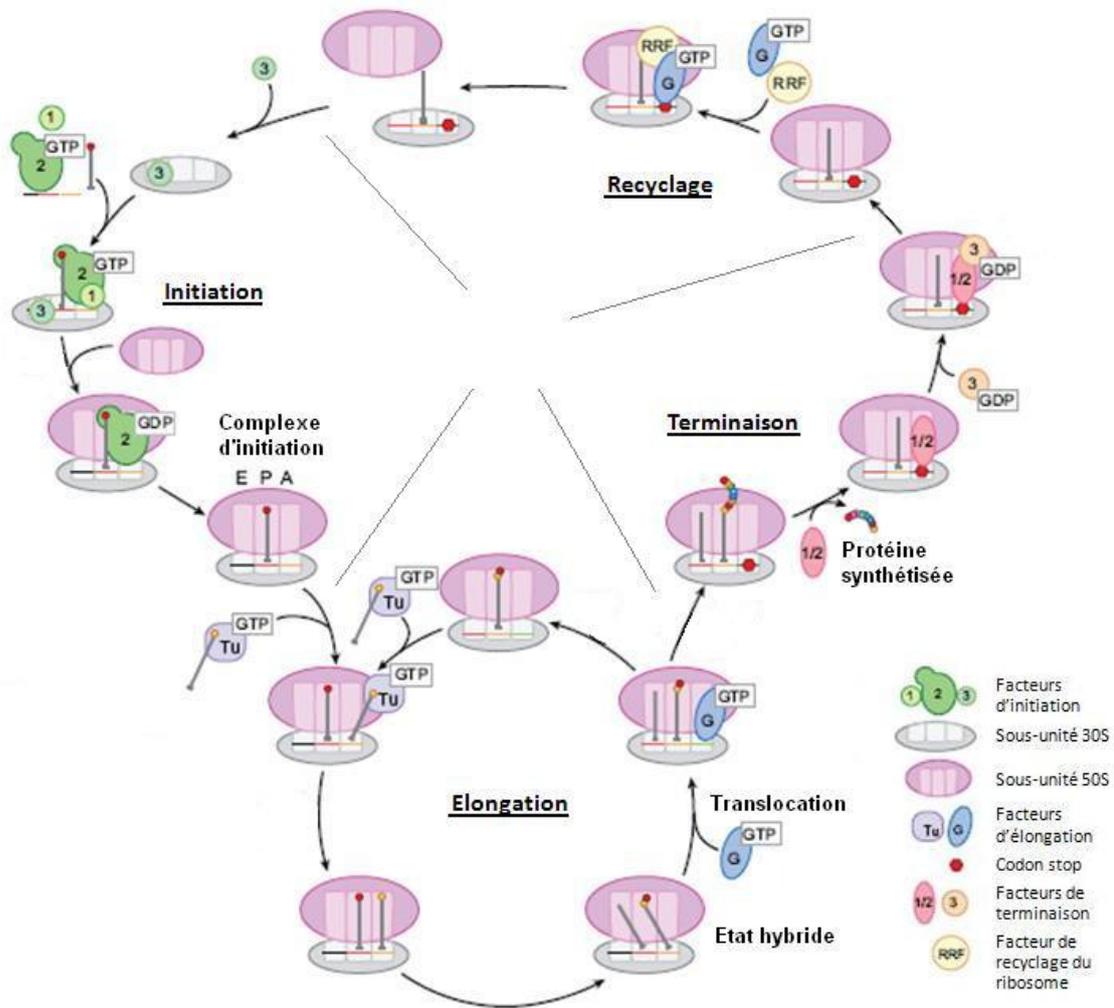


FIGURE 1.3 – Cycle de traduction du ribosome procaryote. Les deux sous unités se rassemblent lors de l'initiation, la protéine est synthétisée pendant l'élongation, relâchée à l'étape de terminaison puis le reste du système traductionnel est recyclé. Les cofacteurs de la traduction sont omniprésents et indispensables au bon déroulement du processus. Image extraite et adaptée de [5].

faisant passer l'ARNt du site A au site P, celui du site P au site E d'où il pourra être libéré et lie le dernier acide aminé reçu à la chaîne polypeptidique en cours de synthèse. Cette liaison est une liaison peptidique, résultat d'une réaction entre les groupes carboxyle ($COOH$) et amine (NH_2) de deux acides aminés. L'ARNm se déplace conjointement aux ARNt par rapport au ribosome et présente le codon suivant au site A du ribosome. Ce processus se répète jusqu'à l'arrivée d'un codon stop dans le site A.

Lorsque le codon stop se présente enfin, aucun acide aminé n'est plus incorporé, le ribosome libère la nouvelle chaîne polypeptidique. Cette étape est la terminaison. La séparation du ribosome en deux sous-unités libres est appelée recyclage du ribosome.

Ces étapes ne sont rendues possibles que par la présence de nombreux cofacteurs de la traduction aidant le ribosome à se positionner sur l'ARNm, à se déplacer et à se détacher. Les cofacteurs sont plus nombreux chez les eucaryotes que chez les procaryotes.

La chaîne polypeptidique créée subit généralement des modifications qui peuvent être co- ou post-traductionnelles (par exemple l'ablation de la première méthionine). Elle se replie sur elle-même pour adopter une conformation en trois dimensions, sa structure tertiaire, qui est généralement déterminante dans le rôle que jouera la protéine. On parle de structure quaternaire lorsque la protéine est composée de plusieurs chaînes polypeptidiques distinctes (figure 1.1).

En conclusion, la traduction est un processus complexe permettant l'expression de l'information génétique de chaque organisme. L'étude de la traduction peut mener à mieux comprendre et agir sur la vie des cellules.

1.2 Méthodes d'études classiques du ribosome

Le ribosome et la traduction sont l'objet de nombreuses études. Nous noterons que l'intérêt porté par la communauté scientifique au ribosome a conduit à l'obtention de deux prix Nobel. En 1974, Albert Claude, Christian de Duve et George Emil Palade furent récompensés par le prix Nobel de physiologie ou médecine pour leurs travaux sur l'organisation structurale et fonctionnelle de la cellule, travaux incluant la description du ribosome dans [6]. En 2009, c'est au tour d'Ada Yonath, Venkatraman Ramakrishnan et Thomas Steitz de recevoir le prix Nobel de chimie pour avoir déterminé la structure du ribosome procaryote en interaction avec des antibiotiques [7–9].

Dans la section précédente, nous avons, pour simplifier, considéré que l'ARNm était linéaire. En réalité, les ARN messagers étant de longues chaînes de nucléotides simple brin, ils présentent de nombreuses bases libres susceptibles de s'appareiller avec des séquences complémentaires. Cela arrive par exemple lorsque l'ARNm forme des structures secondaires en se repliant sur lui-même. Pour lire l'ARNm, le ribosome doit donc être capable d'ouvrir de telles structures : c'est ce qu'on appelle son activité hélicase.

L'article de Takyar *et al.* [10] paru en 2005 cherche à mieux comprendre cette activité hélicase. Nous allons ici développer les résultats de cet article, d'une part à titre d'exemple d'étude "classique" en mesure d'ensemble du ribosome, d'autre part car nous en utiliserons les résultats pour nos expériences en molécule unique.

Les auteurs de [10] cherchent à savoir si cette activité hélicase est externe au ribosome ou, dans le cas contraire, si le ribosome a besoin d'un apport d'énergie dédié pour séparer les brins ou si son simple déplacement le long de l'ARNm est suffisant. L'autre question soulevée par cet article est de savoir à quelle distance du site P se situe l'éventuel site du ribosome ayant une activité hélicase.

1.2 Méthodes d'études classiques du ribosome

Dans cet article, les auteurs préparent différents oligonucléotides (que l'on appellera par la suite oligos) constitués de courtes séquences complémentaires d'ARN ou d'ADN s'hybridant sur un ARNm en aval du codon start. Ces séquences sont présentées à la figure 1.4. Le but est de compter le nombre de codons lus par le ribosome lors des séparations de chacun de ces oligos de l'ARNm.

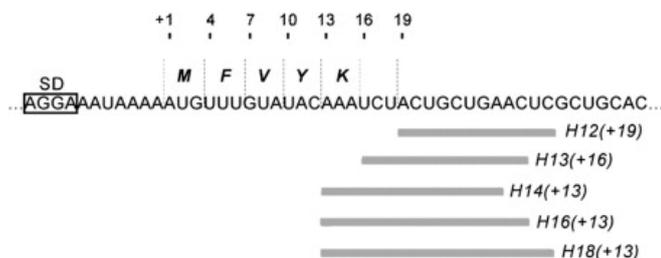


FIGURE 1.4 – Figure extraite de [10]. Le premier nucléotide du site P après initiation sur la méthionine *M* est numéroté +1. Au fur et à mesure de l'incorporation des acides aminés suivants *F*, *V*, *Y* puis *K*, le ribosome place son site P aux positions indiquées : +4, 7, 10 et 13. Différents oligos complémentaires peuvent être hybridés à partir des positions des nucléotides +13, +16 ou +19 et mesurant 12 à 18 nucléotides.

Initialement, le ribosome n'a pas à sa disposition les acides aminés nécessaires à la traduction de la séquence utilisée. En purifiant les ARNt portant ces acides aminés et en les mettant en présence du ribosome un à un, il est possible de faire avancer le ribosome pas à pas sur l'ARNm. Sur la figure 1.5 nous voyons des gels d'électrophorèse (en conditions non dénaturantes) décrivant le taux d'hybridation. Un tel gel permet de séparer différentes espèces présentes en solution selon leur poids moléculaire. Les éléments les plus lourds ou volumineux migrent moins loin dans le gel et se retrouvent dans la partie supérieure. Ici, les oligos complémentaires sont marqués : une bande noire en haut du gel représente un oligo hybridé à l'ARNm tandis qu'une bande noire en bas du gel représente l'oligo libre moins volumineux. Le gel A nous montre que l'oligo *H12(+19)* n'est détaché que si le ribosome est capable d'avancer jusqu'à placer l'ARNt et son acide aminé *Y* dans le site P. À ce niveau là, le premier nucléotide de l'oligo *H12* est en position +10 par rapport au premier nucléotide dans le site P du côté 5' (noté +1). Cela signifie que le ribosome peut agir sur une séquence située après la position +10, son activité hélicase a donc lieu après le nucléotide +10 du côté de l'extrémité 3' de l'ARNm.

En recoupant les différentes données, les auteurs concluent que le site hélicase du ribosome se situe 11 nucléotides après le premier nucléotide du site P, dans le cas d'un ribosome procaryote (*E. coli*).

Cette activité hélicase est effectuée par le ribosome car elle ne dépend que de la position de ce dernier sur l'ARNm et non de la présence des différents facteurs de la traduction. Pour savoir si le ribosome a besoin d'un apport d'énergie (tel les GTP consommés lors de la traduction) pour ouvrir un double brin, les auteurs ont utilisé un antibiotique bloquant le ribosome après une unique translocation. Cette translocation ne nécessite pas de molécule énergétique standard,

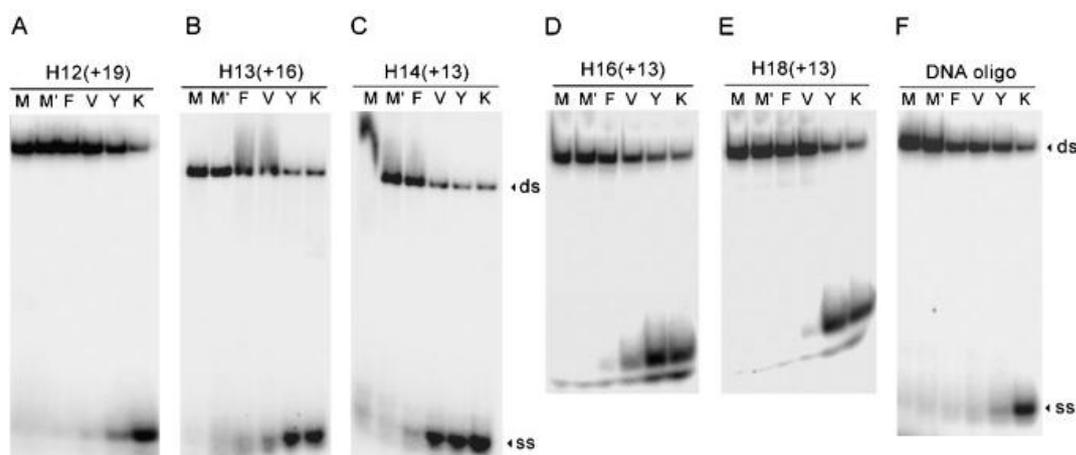


FIGURE 1.5 – Figure extraite de [10]. Les gels A à E décrivent la déshybridation des oligos et ARNm pour les cinq oligos décrits à la figure 1.4. Le gel F est similaire au cas A mais avec des oligos ADN et non ARN. Chaque colonne notée M, M', F, V, Y ou K indique le dernier acide aminé incorporé avant la réalisation du gel. La bande visible en haut du gel correspond aux cas où l'oligo est resté hybridé à l'ARNm (ds signifie double stranded) tandis que la bande du bas correspond aux oligos déshybridés (ss signifie single stranded).

l'énergie étant apportée par l'antibiotique. Cette énergie ne peut être utilisée que pour la translocation car l'antibiotique ne peut transférer son énergie autrement. En montrant que cette translocation provoque l'effet hélicase, les auteurs ont démontré que l'activité hélicase était induite par le déplacement du ribosome sans consommer localement de molécule énergétique.

Cette étude a donc déterminé par des mesures d'ensemble que le ribosome procaryote possédait une activité hélicase et que son site actif se situait 11 nucléotides en aval du premier nucléotide du site P sur l'ARN messager.

On voit au travers de cet exemple que les mesures d'ensemble permettent d'accéder à des données sur les fonctions du ribosome. Cependant, il est bien plus difficile d'obtenir des informations sur la dynamique de la traduction. Il est possible de mesurer un temps moyen de traduction total ou de sous-étapes de la traduction s'il est possible de synchroniser ces phénomènes. La mesure d'événements asynchrones tels les instants d'arrivée de certains facteurs, les changements de conformation ou même l'élongation le long de quelques codons est bien moins facile. C'est alors que les techniques de molécule unique prennent tout leur intérêt.

1.3 Etudes en molécule unique

Suivre un unique système traductionnel permet d'observer des événements rapides en temps réel. Là où les mesures d'ensemble doivent généralement bloquer les réactions pour les synchroniser, il est possible de laisser chaque système unique évoluer à son rythme sans se soucier des

1.3 Etudes en molécule unique

voisins. C'est seulement une fois les mesures faites que l'on post-synchronise les étapes que l'on souhaite étudier.

1.3.1 Exemples de microscopies de fluorescence

Observer une molécule unique ne peut se faire en éclairant l'objet et en observant la lumière renvoyée. Le spectre lumineux visible correspond à des longueurs d'onde comprises entre 380 et 780 *nm* ce qui est l'ordre de grandeur de la taille des objets directement observables. Or, les molécules se mesurent en fraction de nanomètre et même le ribosome, molécule massive de centaines de milliers d'atomes, ne dépasse pas les 30 *nm* pour les eucaryotes (de l'ordre de 20 *nm* chez les procaryotes).

En utilisant des longueurs d'onde plus courtes (diffraction des rayons X ou microscopie électronique), on peut résoudre des structures à l'échelle atomique mais le système doit être figé. Pour bénéficier des avantages de la microscopie optique où le système peut être observé en action, il est possible de marquer les molécules biologiques avec une molécule fluorescente. Une molécule fluorescente, appelée fluorophore, absorbe les photons ayant certaines longueurs d'onde pour réémettre dans une plage de longueurs d'onde plus élevée. En utilisant les filtres adéquats, il est alors possible de ne récupérer que les photons issus de la fluorescence. Il suffit alors de diluer fortement la concentration (afin d'avoir une distance entre fluorophores supérieure à la longueur d'onde d'observation) pour pouvoir détecter des molécules uniques.

Microscopie de fluorescence par réflexion totale.

Nous présentons dans cette section la microscopie de fluorescence par réflexion totale (TIRF) qui est une technique fréquemment employée pour observer des fluorophores près d'une surface. Il s'agit de la technique de microscopie que nous avons choisi pour notre étude de la traduction.

Le principe du TIRF est de n'exciter qu'une fine couche de l'échantillon située contre une surface de verre (une lamelle de microscope) comme illustré sur la figure 1.6. Cette excitation se fait par une onde évanescente qui est un champ électro-magnétique non propagatif créé de l'autre côté d'une interface sur laquelle une onde lumineuse est en réflexion totale. L'intérêt de cette excitation surfacique est d'avoir un faible bruit de fond comparé à la microscopie épi-fluorescence³ comme nous l'expliquons dans les paragraphes suivants.

Un fluorophore n'est visible que s'il est excité et n'est excité que s'il se situe dans le volume couvert par l'onde évanescente. Cette onde évanescente est générée par une réflexion totale. Nous parlons de réflexion totale lorsque une onde lumineuse arrive sur une interface de changement d'indice n_1 vers n_2 ($n_1 > n_2$) avec un angle tel que la loi de Snell-Descartes ne puisse plus s'appliquer. Un sinus ne saurait être supérieur à 1, il n'existe donc pas d'angle réfracté

3. Microscopie de fluorescence plus classique où l'onde excitatrice arrive en incidence normale sur la lamelle de verre.

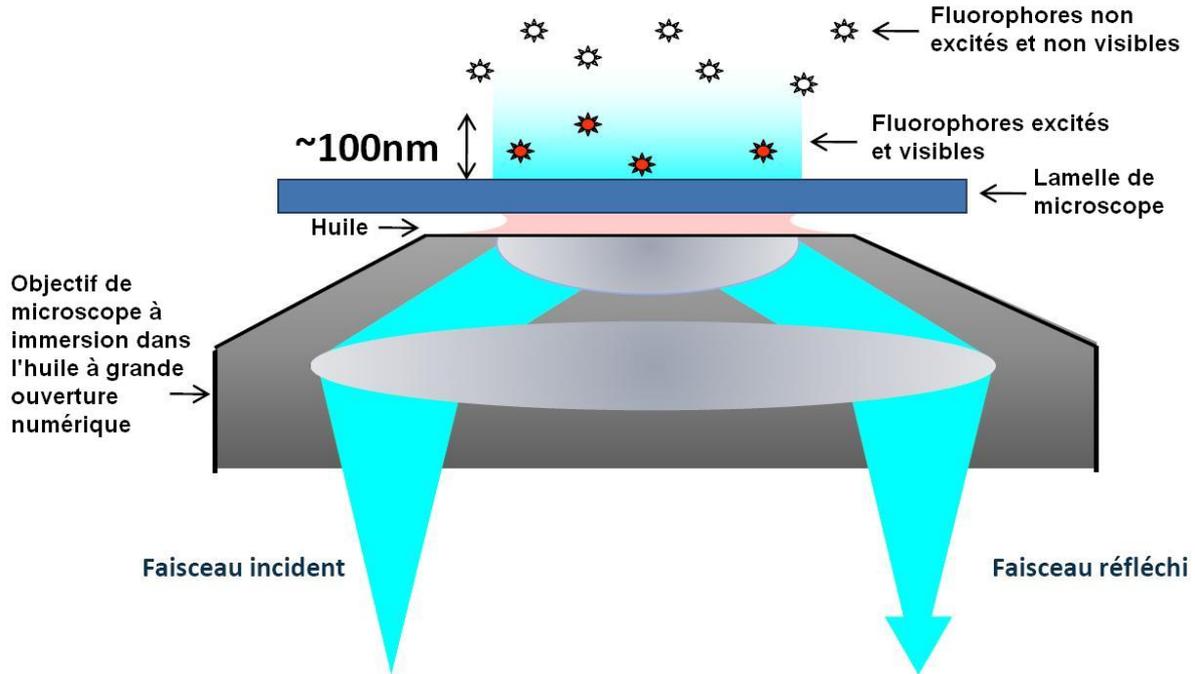


FIGURE 1.6 – Une onde évanescente excitant des fluorophores. Cette onde est générée par un faisceau provenant de l’objectif. Les fluorophores excités près de la surface sont visualisés avec ce même objectif.

pour un angle d’incidence θ supérieur à un angle critique θ_c :

$$\theta_c = \sin^{-1} \left(\frac{n_2}{n_1} \right)$$

L’onde n’étant pas réfractée, elle est entièrement réfléchi. Cependant, la conservation de la composante normale du champ magnétique et des composantes tangentielles du champ électrique au passage d’une interface impliquent l’existence d’un champ électromagnétique de l’autre côté de l’interface même dans le cas d’une réflexion totale. Ce champ évanescent décroît de façon exponentielle en s’éloignant de l’interface avec une distance caractéristique d (se référer à [11]) :

$$d = \frac{\lambda}{4\pi \sqrt{(n_1 \sin \theta)^2 - n_2^2}} \quad (1.1)$$

Dans le cas de la microscopie TIRF, d est de l’ordre de la centaine de nanomètres. Cette faible profondeur d’excitation permet de n’exciter qu’un faible volume, d’où l’intérêt du TIRF par rapport à l’épi-fluorescence. En épi-fluorescence, l’onde lumineuse se propage jusqu’au fluorophore et traverse l’environnement biologique en amont et en aval du plan d’observation. Ce

1.3 Etudes en molécule unique

volume excité peut contenir d'autres fluorophores si ceux-ci ne sont pas extrêmement dilués ou localisés. Le volume excité peut également contenir des particules légèrement fluorescentes aux longueurs d'onde utilisées qui compensent leur faible fluorescence par leur nombre. Finalement, le volume traversé par l'onde excitatrice émet des photons qui seront collectés par l'objectif. Provenant d'un plan qui n'est pas celui de la mise au point, ces photons ne formeront pas d'image mais ajouteront un bruit de fond au signal.

Un échantillon biologique, placé entre lame et lamelle de microscope, a généralement une épaisseur d'au moins quelques centaines de micromètres. En TIRF l'excitation ne concerne que les premières centaines de nanomètres de l'échantillon, le volume excité est donc mille fois moins important. Comme nous cherchons à observer des fluorophores uniques, le nombre de photons constituant le signal est faible ce qui impose d'avoir un bruit de fond tout aussi faible. En cela, la microscopie TIRF est adaptée à l'observation de molécules uniques.

Utilisation de Zero Mode Waveguides

Une évolution récente par rapport aux techniques de type TIRF pour pouvoir observer des fluorophores uniques est celle des Zero Mode Waveguides (ZMW). Sur une lamelle de verre, une couche d'aluminium est percée par des puits d'un diamètre inférieur à la longueur d'onde d'excitation utilisée. L'onde provenant du côté du verre ne peut pas se propager mais une partie du champ, non propagatif, pénètre dans les puits sur quelques dizaines de nanomètres. La figure 1.7 décrit un exemple d'utilisation des ZMW pour l'étude du ribosome. Le volume d'excitation, de l'ordre de $10^{-21} L$, est fortement réduit par rapport à la microscopie TIRF standard, ce qui permet de travailler avec de grandes concentrations en fluorophores sans avoir un niveau de fond de fluorescence prohibitif.

La figure 1.7 est extraite de l'article de Uemura *et al.* [12] dans lequel trois ARNt différents sont marqués. Cela permet de suivre plusieurs cycles d'élongation, ce qui n'avait encore jamais été fait en molécule unique. Ces ARNt sont incorporés par un ribosome situé au fond du puits, au niveau de l'onde stationnaire excitatrice. Les auteurs peuvent ainsi détecter l'arrivée des ARNt au niveau du ribosome ainsi que leur instant de départ, obtenant ainsi des informations sur la cinétique de l'élongation. Le faible volume d'excitation permet d'utiliser une concentration en espèces marquées à 200 *nM* là où il est difficile de dépasser les 10 *nM* en TIRF. Avec ces concentrations plus élevées, la traduction est beaucoup moins ralentie par le manque d'ARNt et les auteurs observent une incorporation toutes les quatre secondes environ.

Le FRET

Le FRET (Förster Resonance Energy Transfer) est un phénomène de transfert d'énergie non radiatif entre deux fluorophores [13–15]. Un fluorophore (le donneur) excité par une onde lumineuse peut transférer son énergie à un autre fluorophore (l'accepteur) si ce dernier est situé à une distance de l'ordre du rayon de Förster R_0 mesurant quelques nanomètres. L'accepteur

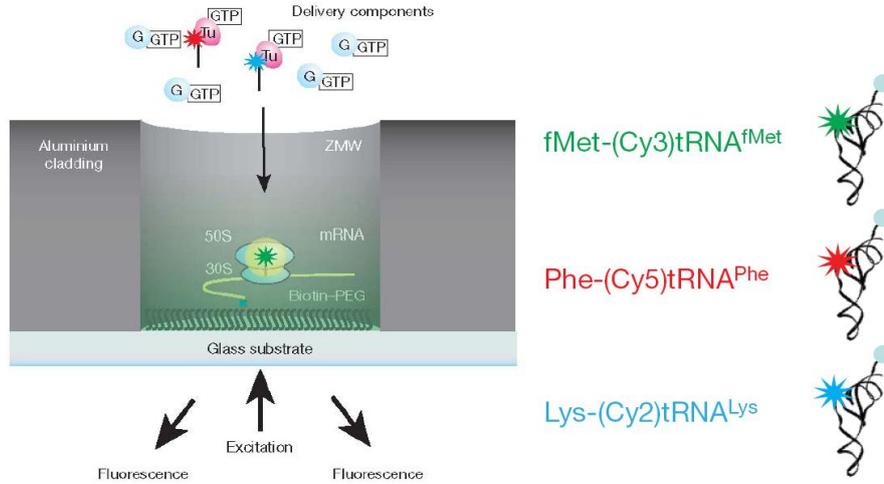


FIGURE 1.7 – Schéma d'un des puits ZMW de diamètre 50 à 200 nm. Dans cette expérience, trois ARNt sont marqués par trois fluorophores différents (trois cyanines, Cy2, Cy3 et Cy5) et sont mis en présence d'un complexe ribosome-ARNm attaché au fond du puits dans la zone d'excitation. Les fluorophores ne sont donc excités qu'à leur arrivée sur le ribosome ce qui permet de suivre l'incorporation des ARNt. Figure extraite de [12].

ainsi excité émet un signal de fluorescence. Le transfert est efficace (R_0 est grand) lorsque le spectre d'émission du donneur recouvre celui d'absorption de l'accepteur. R_0 est une grandeur qui dépend également de l'indice de réfraction du milieu, du rendement quantique du donneur et de l'orientation relative entre les dipôles du donneur et de l'accepteur. L'efficacité de FRET E_{FRET} varie en fonction de la distance entre fluorophores R selon la formule suivante :

$$E_{FRET} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (1.2)$$

Cette formule donne la courbe d'efficacité présentée à la figure 1.8.

Cette propriété est utilisée pour évaluer la distance entre deux fluorophores. Il est possible d'en déduire la distance entre deux particules biologiques auxquelles on a lié ces deux fluorophores ou encore les changements de conformation d'une même protéine. Lorsque un donneur excité et un accepteur se rapprochent, la fluorescence du premier diminue tandis que celle du second apparaît. La mesure de l'efficacité du transfert (en comparant la fluorescence du donneur et de l'accepteur) permet de retrouver la distance. En pratique, on utilise deux lasers pour exciter les deux fluorophores et vérifier qu'il sont bien présents en les observant par fluorescence simple.

Nous verrons dans la section suivante un exemple d'étude utilisant le FRET pour discriminer différentes configurations de l'appareil traductionnel.

1.3 Etudes en molécule unique

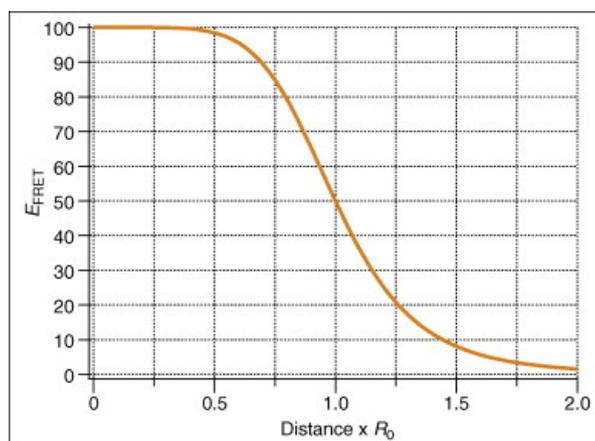


FIGURE 1.8 – Courbe d'efficacité du transfert d'énergie en fonction de la distance entre les deux fluorophores. Cette distance est exprimée en R_0 , le rayon de Förster, typiquement de l'ordre de 5 nm. Figure extraite de [16].

1.3.2 Un exemple d'étude de l'activité hélicase des ribosomes

Nous avons décrit à la section 1.2 une étude portant sur l'activité hélicase du ribosome effectuée en mesures d'ensemble. Grâce aux techniques de molécule unique, il est maintenant possible d'obtenir des informations sur d'éventuels ralentissements dus à la présence de structures secondaires sur l'ARNm. En 2013, dans [17], Chen *et al.* se sont penchés sur l'étude des pauses marquées par le ribosome lors de l'ouverture de structures secondaires. Ils utilisent une configuration de type TIRF pour détecter le FRET entre quatre types de molécules marquées : deux protéines du ribosome proches des canaux d'entrée et de sortie de l'ARNm et deux ARNt spécifiques à l'arginine et la phénylalanine marqués sur l'ARNt lui-même. En revanche, ils n'emploient pas de Zero Mode Waveguides qui ne sont encore utilisées que par un seul groupe de recherche.

Il s'agit de décomposer les cycles d'élongation en sous étapes cinétiquement limitantes puis de comparer l'évolution des durées de ces étapes lors du franchissement d'une structure. Ces sous étapes sont au nombre de trois par cycle d'élongation. La configuration à la fin de chacune de ces étapes est détaillée sur deux cycles à la figure 1.9 (a). Au début (configuration 1), la ribosome a incorporé l'acide aminé E, puis il incorpore l'acide aminé R (configurations 2 à 4) et enfin l'acide aminé F (configurations 5 à 7 similaires à 2 à 4). Plus précisément, (i) un ARNt chargé arrive dans le site A, est reconnu puis le ribosome forme une nouvelle liaison peptidique (pour terminer dans les configurations 2 ou 5 de la figure 1.9), puis (ii) le ribosome effectue un mouvement de translocation où les ARNt passent des sites A et P à P et E (arrivée dans les configurations 3 ou 6) et enfin (iii) l'ARNt présent dans le site E se dissocie du ribosome (on se retrouve alors dans les configurations 1, 4 ou 7).

La distinction entre ces différentes configurations est faite d'une part en vérifiant par fluorescence quels fluorophores sont présents à chaque instant indépendamment de leur distance

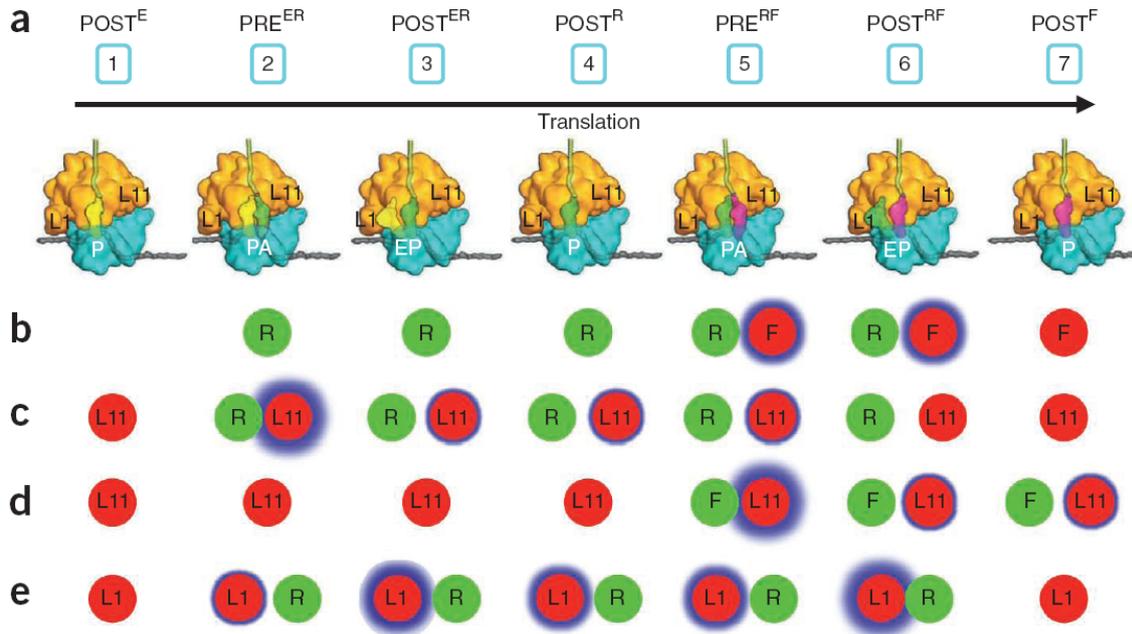


FIGURE 1.9 – Figure extraite de [17]. Deux cycles d'élongation sont étudiés ici. (a) Il y a donc six étapes potentiellement cinétiquement limitantes entre sept états numérotés de 1 à 7. Le nom des états PRE et POST est relatif à la translocation et les lettres E, R et F (respectivement acide glutamique, arginine et phénylalanine) indiquent quels ARNt sont présents dans les sites A, P ou E. (b-e) Les différentes possibilités de marquage (en vert le donneur et en rouge l'accepteur) : protéines L1 et L11 de la grande sous-unité ou ARNt-R (arginine) ou ARNt-F (phénylalanine). Un halo bleu, plus ou moins large, est dessiné lorsque la distance entre les deux fluorophores autorise le FRET, plus ou moins intense selon la distance entre les deux.

entre l'un et l'autre, et d'autre part en utilisant la technique du FRET pour connaître leurs positions relatives. Sur la figure 1.9 (b-e), le donneur est représenté en vert et l'accepteur en rouge tandis que des halos bleus indiquent la présence (et l'intensité) de FRET causé par la proximité des deux fluorophores.

Dans l'expérience décrite dans [17], il a été possible de marquer deux ARNt recrutés l'un après l'autre par le ribosome ainsi que les protéines L11 et L1 de la grande sous-unité du ribosome situées respectivement près des sites A et E. En quatre séries d'observations où deux molécules parmi les quatre sélectionnées ont été marquées, il a été possible de repérer la position du premier ARNt-R par rapport aux sites A (figure 1.9 (c)) et E (figure 1.9 (e)), du second ARNt-F par rapport au site A (figure 1.9 (d)) et de détecter la présence simultanée des deux ARNt dans le ribosome (figure 1.9 (b)). Cela permet de mesurer les durées de chaque sous-étape. La figure 1.10 donne un exemple de mesures effectuées dans la configuration (b) sur les intervalles de temps entre l'arrivée d'un ARNt et le suivant dans le site A et entre l'arrivée d'un ARNt et le départ du précédent, dans le cas où l'ARNm présente différentes structures

1.3 Etudes en molécule unique

secondaires.

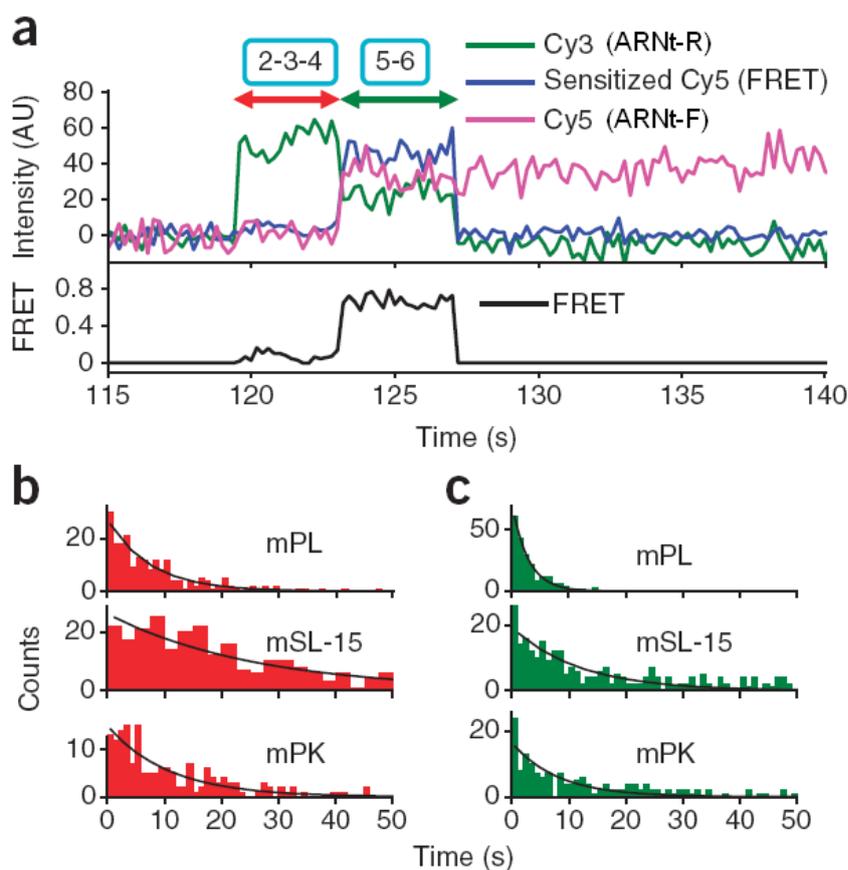


FIGURE 1.10 – Figure extraite de [17]. Avec le marquage décrit à la ligne b de la figure 1.9, il est possible de repérer la présence des ARNt R et F dans le ribosome. La sous-figure a donne un exemple de trace temporelle de la fluorescence de ces ARNt. La courbe verte correspond au donneur excité et observé en fluorescence normale, la courbe bleue est celle de l'accepteur excité par le donneur de FRET et la rose est celle de l'accepteur excité directement. Le plateau de la courbe verte correspond aux états 2 à 4 à savoir le cycle d'élongation au cours duquel l'arginine R est incorporée, le plateau de la courbe bleue aux états 5 et 6 entre l'arrivée de l'ARNt-F et le départ de l'ARNt-R. Les sous-figures b et c décrivent la distribution des durées des deux plateaux précédents dans le cas où le ribosome rencontre trois structures secondaires différentes (notées mPL, mSL-15 et mPK). Des interpolations exponentielles permettent d'en extraire des temps caractéristiques puis de comparer l'effet des différentes structures sur la cinétique.

En comparant les durées des différentes étapes, les auteurs arrivent alors à un résultat surprenant : la présence de structures sur l'ARNm ralentit le cycle d'élongation au niveau de la dissociation de l'ARNt du site E et non lors de la translocation comme on aurait pu le penser intuitivement. De plus, face à des structures très stables (à base de liaisons G-C), le ribosome ralentit non plus sur une seule étape mais sur deux. Les auteurs en concluent que le ribosome peut en cas de besoin ouvrir l'ARNm en deux étapes et non en une seule comme c'est le cas

avec des structures moins stables.

En observant une traduction partielle en molécule unique, il a donc été possible de déterminer que l'ouverture de structures secondaires ralentissait le ribosome. Il a même été possible de savoir quelle partie du cycle d'élongation était ralentie par l'activité hélicase et de faire une distinction entre des structures plus ou moins solides. Ces résultats complètent ceux obtenus en mesure d'ensemble dans [10] et illustrent parfaitement l'intérêt d'étudier la traduction en molécule unique.

Si les auteurs ont pu comparer les temps caractéristiques des différentes étapes entre eux, la valeur absolue de ces temps est de l'ordre de 10 s par cycle d'élongation, ce qui est plus lent que ce que l'on a pu obtenir avec des Zero Mode Waveguides (section 1.3.1). En effet, il s'agit là d'une limite de la technique de TIRF qui impose une faible concentration en espèce marquées, ici les ARNt (dilués à 10 nM), ce qui limite leur vitesse d'incorporation.

La technique de FRET utilisée ici est une technique couramment utilisée dans l'étude du ribosome en molécule unique [12, 18–27]. En marquant les ARNt, les ARNr, les protéines ribosomiques ou encore d'autres facteurs de la traduction, il est possible de réaliser du FRET sur des distances de 2 à 8 nm. Le FRET est donc particulièrement adapté à l'étude des changements de conformation du ribosome et donne des informations cinétiques en lien avec les études structurales. Ces études sont faisables avec les ribosomes procaryotes où on peut marquer tous ces facteurs mais sont actuellement bien moins faciles à réaliser avec des ribosomes eucaryotes.

1.3.3 Un exemple d'étude de traduction de protéine

Les techniques de molécule unique ne se sont pas limitées à l'étude d'étapes du cycle d'élongation. Observer la traduction complète d'une protéine peut apporter des informations difficiles à obtenir en mesure d'ensemble.

Katranidis *et al.* ont ainsi observé dans [28] la traduction d'une protéine par un ribosome unique pour étudier son temps de repliement et de maturation (modifications permettant la formation du chromophore dans le cas d'une protéine fluorescente). Cette observation a également été faite par microscopie TIRF. Cette étude fait écho à celle de Uemura *et al.* [29] où la synthèse d'une protéine fluorescente était le témoin de la traduction complète par un ribosome immobilisé sur une surface⁴. La protéine traduite est une GFP (Green Fluorescent Protein) naturellement fluorescente dans le vert. Il s'agit du mutant GFP Emerald connu pour la rapidité de son repliement. La GFP ne devient fluorescente qu'une fois sa conformation tridimensionnelle acquise et son chromophore formé.

Pour détecter ces protéines, les auteurs de [28] marquent le ribosome et inhibent l'étape de libération de la protéine. Ainsi, la GFP synthétisée a le temps de se replier et de mûrir en restant au contact du ribosome. Les auteurs vérifient que chaque GFP apparaît bien là où un

4. Dans le cas de [29], la protéine fluorescente mûrait en environ 15 minutes, ici Katranidis *et al.* utilisent une protéine mûrissant en 5 minutes.

1.3 Etudes en molécule unique

ribosome est détecté.

Une analyse de la vitesse d'apparition des GFP donne un temps moyen de traduction, repliement et maturation. Sur la figure 1.11, le nombre cumulé de GFP apparues en fonction du temps est interpolé par des lois de probabilité à un ou deux temps caractéristiques. Il en ressort que ce phénomène est limité par une seule constante de temps. Au vu d'autres études sur la synthèse de la GFP, les auteurs concluent que ce phénomène lent, de temps caractéristique 5 minutes, est la maturation et ils mettent une borne supérieure de 1 minute pour la synthèse et le repliement de la protéine.

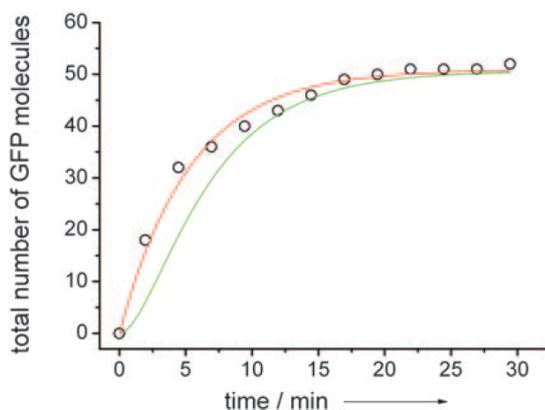


FIGURE 1.11 – Figure extraite de [28]. Les cercles représentent le nombre cumulé des GFP apparues avant l'instant considéré. La courbe rouge est une interpolation exponentielle de temps caractéristique 5,3 minutes. Considérer deux temps caractéristiques consécutifs donne comme résultat 0,1 et 5,2 minutes ce qui montre que la courbe est cinétiquement limitée par un seul événement. Si l'on fixe ces deux temps caractéristiques à 2,0 et 5,3 minutes, on obtient la courbe verte qui s'écarte trop des données. Cela conduit les auteurs à mettre une limite supérieure de 1 minute sur le temps caractéristique des événements qui précèdent la maturation.

L'étude de [28] montre surtout qu'il est possible d'observer la création d'une protéine dans son intégralité en molécule unique. La vitesse de traduction procaryote trouvée ici est de l'ordre de 5 acides aminés incorporés par seconde, proche de celle de la traduction *in vivo* rapportée dans [30] et [31]. Cette vitesse est bien plus rapide que celles que nous avons vues dans [17] où les facteurs de la traduction étaient fortement dilués (10 nM) et où la vitesse était de 0,1 acide aminé incorporé par seconde. Ici, il n'y a pas de facteur marqué autre que le ribosome, celui-ci a donc accès à tous les facteurs de traduction sans limite de concentration.

L'étude en molécule unique d'un grand nombre de cycles d'élongation pourra permettre d'étudier des phénomènes ayant lieu en milieu et fin de traduction. Par exemple, l'arrivée de cofacteurs près de la protéine en cours de traduction, le repliement de cette protéine ou sa maturation sont des événements eux aussi asynchrones. Étudier ces événements en molécule unique permettra de ne pas bloquer le système en cours de traduction pour les synchroniser.

1.3.4 Le ribosome eucaryote en molécule unique

Jusqu'ici, les études du ribosome en molécule unique que nous avons citées portaient sur des ribosomes procaryotes, généralement issus d'*E. coli*. Cela s'explique par la simplicité relative de la traduction procaryote comparée à celle des eucaryotes. En effet, les ribosomes eucaryotes ne peuvent être recrutés sur une séquence interne⁵ de l'ARNm contrairement aux ribosomes procaryotes et doivent commencer à lire l'ARNm par son extrémité 5'⁶. De plus, les facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison sont bien plus nombreux ce qui rend leur éventuelle purification plus complexe. Enfin, le ribosome lui-même est plus volumineux et moins bien connu car si les premières structures du ribosome procaryote sont parues vers l'année 2000 [32,33], celles du ribosome eucaryote ont nécessité une dizaine d'années supplémentaires [34–36]. Son marquage commence donc tout juste à être envisageable.

Nous souhaitons tout de même souligner l'existence de deux études pionnières en molécule unique sur des ribosomes eucaryotes.

La première est décrite dans un article de Petrov *et al.* [37] et montre la faisabilité de marquer un ribosome eucaryote issu de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Pour ce faire, les auteurs mutent les séquences d'ARN ribosomiques (ARNr) afin que ces derniers présentent des bases nucléotidiques à la surface des ribosomes pouvant être reconnues par des séquences complémentaires.

Le but de ces mutations est de pouvoir marquer le ribosome avec des fluorophores pour le suivre en molécule unique. Ainsi les auteurs de [37] marquent leurs ribosomes en les hybridant avec des oligos-fluorophores avant, entre autre, de les observer sur une surface comme montré à la figure 1.12. La différence du nombre de fluorophores visibles entre les cas de fixation spécifique et non-spécifique à la lamelle prouve que les ribosomes sont marqués et peuvent être observés en tant que molécules uniques.

Le choix de l'organisme, la levure, est dicté par la possibilité d'y apporter des mutations relativement facilement et de cultiver les cellules mutées en un temps raisonnable. Ce genre de mutations ne semble pour l'instant pas accessible dans le cas de ribosomes d'organismes plus complexes tels ceux de mammifères.

La seconde étude porte sur des ribosomes de lapin. Effectuée par Budkevich *et al.* dans [38], elle s'intéresse aux changements de position des ARNt au sein du ribosome de mammifère pendant la traduction. Après une première partie d'études structurales, cet article présente un suivi par FRET de ribosomes eucaryotes en molécule unique. Il s'agit d'adapter au ribosome eucaryote l'étude de la même équipe par Munro *et al.* [39]. Le FRET, effectué entre deux ARNt

5. Une séquence interne ne contient pas les extrémités 3' et 5' de l'ARNm. Le ribosome procaryote peut se complexer à l'ARNm sans passer par l'extrémité 5'.

6. Dans le cas eucaryote, cette extrémité 5' doit être coiffée. Il s'agit d'une modification post-transcriptionnelle permettant le recrutement du ribosome sur l'ARNm.

1.4 Nos objectifs

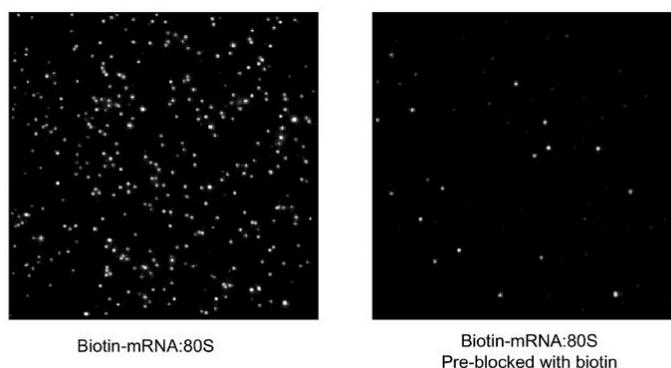


FIGURE 1.12 – *Figure extraite de [37]. Des ribosomes mutés sont marqués avec un fluorophore, chaque point lumineux correspondant à un unique fluorophore. Ces ribosomes sont initiés sur des ARNm fixés à la surface de façon spécifique sur l'image de gauche. Sur l'image de droite, les ARNm ne peuvent se fixer à la surface (dont les sites d'accroche ont été saturés par des biotines libres) et l'on ne détecte que fluorophores ou des complexes ribosome-fluorophores fixés non-spécifiquement.*

procaryotes marqués situés dans les sites A et P du ribosome, montre l'existence de trois états différents, un classique et deux hybrides dans lesquels les ARNt sont en transition entre deux sites du ribosome. La présence d'un antibiotique, la cycloheximide, modifie la répartition des états en favorisant l'état classique.

Cet article, tout en ne marquant pas le ribosome eucaryote, étend aux eucaryotes certaines études en molécule unique jusque là réservées aux procaryotes [19,22].

Les études eucaryotes en molécule unique sont donc encore très rares et la traduction eucaryote possède encore bien des secrets à nous livrer.

1.4 Nos objectifs

Notre équipe a pour objectif d'étudier la cinétique de traduction du ribosome, en particulier de l'étape d'élongation. Pour cela plusieurs approches ont été explorées, notamment par les doctorants qui m'ont précédé. Ces approches utilisent toutes le dispositif de microscopie TIRF où un ARN messager complexé à un ribosome est fixé sur une surface.

La première approche consistait à utiliser des acides aminés marqués avec un fluorophore pouvant être incorporé par le ribosome dans la chaîne polypeptidique créée [2]. L'apparition de fluorophores à la surface est alors caractéristique d'une protéine en cours de traduction. L'évolution de l'intensité devrait permettre de déterminer le nombre d'acides aminés marqués incorporés dans cette nouvelle protéine et les instants d'incorporation. Cependant, les fluorophores marquant les acides aminés doivent être petits et leurs propriétés photophysiques ne

sont pas adaptées aux observations en molécule unique. De plus, pour pouvoir être intégrés à une protéine en formation, ces acides aminés fluorescents doivent être présents en concentration suffisamment élevée. Un environnement aussi chargé en fluorophores devient un problème pour la détection de molécules uniques. À l'avenir, l'utilisation de Zero Mode Waveguides, si cette technique devient plus facile d'accès, permettrait de travailler avec des concentrations de l'ordre de 500 nM et pourrait relancer l'intérêt de ce type d'expérience. Cette technique n'est pour l'instant maîtrisée que par un seul groupe de recherche au monde, nous nous contentons donc de travailler en milieu plus dilué.

Une deuxième approche a été de marquer des ribosomes avec un *quantum dot* (nanocristal semi-conducteur), fluorophore volumineux mais aux excellentes propriétés photophysiques. La détection d'un *quantum dot* témoigne de la présence d'un ribosome et sa disparition de la séparation du ribosome et de l'ARNm, soit la fin de la traduction. Nous avons obtenu des résultats sur le ribosome procaryote marqué par *quantum dot* mais nous avons souffert de problèmes de reproductibilité car le *quantum dot* est presque aussi volumineux que le ribosome et risque d'altérer son activité. Utiliser un *quantum dot* peut permettre d'avoir un excellent ratio signal sur bruit et ainsi de faire de la super-localisation : l'image du *quantum dot* sur une caméra est une figure de diffraction étalée sur plusieurs pixels. Connaissant la valeur de l'intensité lumineuse sur chacun de ces pixels avec un faible bruit permet de déterminer la position de la particule avec une résolution sub-pixel.

Une troisième méthode a résidé dans la synthèse d'une protéine fluorescente, l'apparition de la fluorescence étant synonyme de traduction achevée. Cette méthode est un moyen fiable de vérifier l'efficacité de la traduction indépendamment de la vitesse de traduction. En contrepartie, la vitesse d'élongation ne peut être mesurée précisément car la nouvelle protéine ne peut fluorescer qu'après repliement et maturation ce qui prend un temps non négligeable devant le temps de traduction. C'est une méthode qui peut être intéressante pour confirmer l'activité du ribosome fixé sur la surface, éventuellement modifié par marquage, ou encore pour servir de système rapporteur d'un changement de phase de lecture, la protéine fluorescente n'étant codée que dans l'une des trois phases.

La quatrième méthode, qui sera largement développée dans la suite de ce manuscrit, a consisté à observer le départ de jalons fluorescents placés sur l'ARNm et détachés par le passage du ribosome. Cela permet d'obtenir des informations sur les instants de passage du ribosome à des endroits choisis de l'ARNm. Il s'agit d'une méthode apportant plus d'informations sur la cinétique que celles des *quantum dots* ou des protéines fluorescentes tout en autorisant l'utilisation de concentrations nanomolaires de fluorophores possédant de bonnes propriétés photophysiques.

1.4 Nos objectifs

Au cours des trois dernières années, nous avons principalement travaillé sur la dernière approche. L'un de nos projets les plus ambitieux a été d'effectuer cette étude avec des ribosomes de mammifères (lapins). Comme nous ne modifions pas les ribosomes, l'utilisation de ribosomes d'organismes pluricellulaires ne devait pas poser de problème fondamental comme l'ont prouvé Budkevich *et al.* [38].

Le chapitre suivant détaillera la méthode choisie pour observer la cinétique de traduction en plaçant des jalons fluorescents sur l'ARNm, ainsi que le montage réalisé pour observer cette cinétique.

Mise en œuvre de l'étude cinétique de la traduction par microscopie de fluorescence de molécules uniques

Dans ce chapitre, nous présenterons les moyens mis en œuvre pour suivre des traductions sur quelques cycles d'élongation à l'échelle de la molécule unique. Nous commencerons donc par décrire le système rapporteur que nous avons choisi pour pouvoir suivre un tel phénomène en marquant avec des fluorophores les ARNm au niveau de la séquence codante, sur le trajet du ribosome. Nous verrons le montage de microscopie TIRF utilisé pour l'observation de fluorophores uniques, adapté à l'observation de deux fluorophores de couleurs différentes. Nous y détaillerons la méthode d'accroche des systèmes biologiques à la surface d'une lamelle de microscope ainsi que la méthode de marquage grâce à des oligonucléotides fluorescents.

Ce montage et cette méthode peuvent être utilisés pour l'étude des ribosomes aussi bien procaryotes qu'eucaryotes. Nous parlons dans ce manuscrit des résultats obtenus avec les ribosomes eucaryotes mais dans ce chapitre, nous mentionnerons les quelques légères différences de traitement entre les deux types d'expériences.

2.1 Description du système rapporteur

Nous cherchons à suivre une traduction en molécule unique pour extraire une vitesse d'élongation. Nous souhaitons modifier le moins possible le système traductionnel (ribosome, ARNt, acides aminés, facteurs d'élongation et ARNm) : d'une part, les observations faites sur des systèmes non modifiés auront une signification biologique plus pertinente, d'autre part, ne pas avoir à modifier le système nous permettra d'utiliser des ribosomes de mammifères. En effet, ces derniers sont plus complexes que leurs homologues bactériens et la littérature comporte moins d'informations sur la façon dont une éventuelle modification du système traductionnel affectera ou non la traduction.

Pour pouvoir observer des molécules uniques, nous avons choisi une technique de microscopie de fluorescence. En émettant des photons à une longueur d'onde différente que celle utilisée pour les exciter, les fluorophores peuvent être détectés et apporter des informations sur les

systèmes biologiques auxquels ils sont liés.

Nous avons choisi de marquer l'ARNm en y hybridant des petits oligonucléotides, fragments d'ARN ou d'ADN de quelques codons, dont la séquence est complémentaire d'une partie de celle des ARNm. Ces oligos seront marqués à leur extrémité 5' par un fluorophore. Nous pourrions ainsi localiser les ARNm fixés sur la surface, sur lesquels nous aurons au préalable initié un ribosome. La synthèse de petits oligos-fluorophores est aisée et des solutions existent dans le commerce (nous utilisons les produits d'*Eurogentec* et d'*Eurofins*). Les séquences nucléotidiques complémentaires s'hybrident facilement de façon stable bien que non-covalente. Nous avons donc une méthode simple de marquage ayant peu d'impact sur la machinerie traductionnelle puisque son accroche avec les oligos marqués réside en de simples liaisons hydrogènes au niveau de l'ARNm.

Pour obtenir des informations sur la vitesse d'élongation, nous exploitons alors la propriété hélicase du ribosome. Rappelons qu'il s'agit de la capacité du ribosome à séparer les chaînes double brins lors de la lecture d'ARNm se repliant sur eux-mêmes. En effet, le ribosome ne peut pas se permettre de se bloquer dès qu'il rencontre une telle structure, il serait alors incapable de mener la moindre traduction à son terme. C'est pour cela que le ribosome possède une fonction hélicase lui permettant de séparer les chaînes doubles brins lors de la lecture d'un ARNm. Un ARNm se déplaçant dans un ribosome sera rendu simple brin avant d'arriver au niveau du site A. Nous nous sommes d'ailleurs intéressés au chapitre précédent à des articles portant sur cette activité hélicase [10, 17] et nous utilisons des oligos dont la séquence a été utilisée dans [10].

Or nous marquons nos ARNm en créant justement des structures ARN-oligo double brins. Le passage d'un ribosome en cours de traduction au niveau d'une hybridation ARN/oligo-fluorophore pourra être détecté par le départ du fluorophore lié au système biologique. Ce type de marquage permet de détecter le passage du ribosome à certains points de l'ARNm définis par les séquences des oligo-fluorophores. La figure 2.1 schématise le système rapporteur choisi. Le ribosome complexé sur l'ARNm le traduira en détachant les deux oligos marqués.

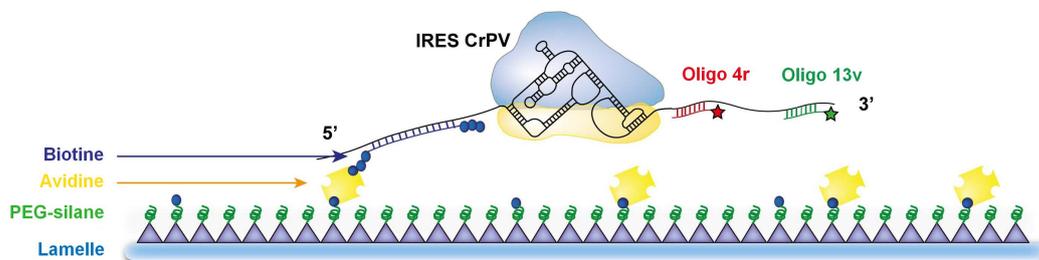


FIGURE 2.1 – Schéma du système rapporteur utilisé. Un ribosome complexé à un ARNm, lors de la traduction, détachera successivement les deux oligos marqués. L'ARNm étant fixé à la surface où est créée l'onde évanescente excitatrice, les fluorophores ainsi détachés ne seront plus excités.

2.2 Le montage optique

Nous souhaitons pouvoir assurer un suivi en temps réel de traductions eucaryotes et nous avons besoin d'en suivre plusieurs en parallèle. Pour avoir une bonne distribution de données et obtenir des informations statistiques sur les résultats, nous devons étudier le plus d'événements possible. En molécule unique, le besoin de pouvoir suivre plusieurs fluorophores en parallèle mène à utiliser la technique de microscopie de fluorescence par réflexion totale (TIRF). Nous avons vu à la section 1.3.1 que cette technique permet d'observer des fluorophores liés à une lamelle de microscope. Si nous arrivons à attacher nos systèmes rapporteurs à la surface d'une lamelle de microscope, la différence entre un oligo marqué hybridé à l'ARNm et un oligo détaché par le ribosome sera la différence entre un oligo lié à la surface et un oligo diffusant en solution loin de la surface. Seuls les premiers sont visibles.

Nous accrochons nos systèmes rapporteurs à une lamelle par l'ARNm comme montré à la figure 2.1. Selon la même logique de non modification du système, nous hybridons l'ARNm à un oligo muni de biotines. Cela permet son accroche à une surface convenablement traitée tout en ne modifiant ni l'ARNm ni le ribosome.

Enfin, la figure 2.1 montre la présence d'une structure secondaire de l'ARNm au niveau du ribosome, l'IRES CrPV. Il s'agit d'un site de l'ARNm formant une structure secondaire complexe à laquelle le ribosome peut se complexer (Internal Ribosome Entry Site). Celle-ci provient du génome du virus de la paralysie du grillon (Cricket Paralysis Virus) [40]. Ce type d'arrivée du ribosome sur l'ARNm n'est pas une initiation normale et ne nécessite ni coiffe sur l'ARNm, ni facteurs d'initiation. Utiliser cette structure est donc une astuce connue pour ne pas avoir à purifier les facteurs d'initiation lors d'une complexation ribosome-ARNm *in vitro*.

Ainsi, notre système rapporteur est constitué d'un ARNm hybridé à trois oligos, l'un équipé de biotines le reliant à la surface de la lamelle, les deux autres de fluorophores permettant de le détecter. Un ribosome eucaryote fonctionnel complexé à cet ARNm le traduit s'il se trouve en présence des ARNt, acides aminés et facteurs d'élongation requis. À son passage au niveau des oligos marqués, il les déshybride et ces derniers ne sont alors plus liés à la surface. La traduction se manifeste donc par une disparition de ces fluorophores.

2.2 Le montage optique

Nous utilisons un montage de microscopie TIRF dont nous avons décrit le principe à la section 1.3.1. Nous quittons ici le principe général du TIRF pour détailler notre montage et ses capacités d'excitation et d'observation des fluorophores.

2.2.1 Excitation des fluorophores

L'excitation des fluorophores se fait par laser, ce qui présente plusieurs avantages. Tout d'abord, utiliser une onde monochromatique permet de n'exciter que les particules absorbant à une longueur d'onde donnée. En choisissant bien la longueur d'onde du laser et les fluorophores,

il est possible d'exciter efficacement ces derniers sans pour autant exciter d'autres particules potentiellement fluorescentes présentes sur la surface observée. En particulier, lors de l'utilisation de deux fluorophores distincts, il est facile de n'exciter que l'un des deux en choisissant le bon laser.

D'autre part, nous chercherons à repérer quelques photons émis par les fluorophores parmi ceux du fond dû à la réflexion de la lumière d'excitation. Le nombre de photons détectés est faible devant le nombre de photons incidents¹, il faut donc pouvoir supprimer les photons d'excitation. Cela se fait aisément à l'aide de filtres bloquant la longueur d'onde d'excitation. Avec une excitation polychromatique, il faut filtrer les longueurs d'onde de la source situées dans la plage d'émission du fluorophore avant de pouvoir l'utiliser ce qui demande des filtres supplémentaires et demande une puissance importante qui sera en grande partie perdue par filtrage. Enfin, un faisceau laser est naturellement collimaté et peut être focalisé facilement sur une zone de largeur $100 \mu m$.

Nous disposons de quatre lasers continus et polarisés linéairement aux longueurs d'onde suivantes : 488 nm , 515 nm , 532 nm et 638 nm parfois plus familièrement appelés bleu, turquoise, vert et rouge.² Le laser à 515 nm est un iBEAM-SMART de Toptica. Celui à 532 nm est un LBX-532-50 d'Oxxius, quant au laser rouge il s'agit d'un LBX-638-100, toujours de chez Oxxius. Nous pouvons combiner le laser rouge avec, au choix, l'un des trois autres grâce à un miroir dichroïque (q550spxr, Chroma). Nous choisissons parmi les lasers vert, turquoise et bleu à l'aide de deux miroirs amovibles.

Il n'est pas nécessaire d'observer les fluorophores à tout instant, une image de 100 ms de durée d'acquisition toutes les quelques secondes est suffisante pour avoir la résolution temporelle dont nous avons besoin. Comme nous le verrons à la section 2.6.2, les fluorophores photoblanchissent et ce en fonction du nombre de photons reçus. Pour ne pas les photoblanchir trop tôt, on se contente de ne les exciter que lors des phases d'acquisitions. Pour cela, nous contrôlons le laser rouge par commande analogique créée par un séquenceur³, lui-même piloté par ordinateur à l'aide du logiciel LabView (National Instrument, version 8.2). Les autres lasers délivrent une puissance constante au cours de l'expérience mais un obturateur est placé sur leur trajet optique. Cet obturateur est également commandé par le séquenceur. Le fait de commander les différents appareils par le même séquenceur permet de les synchroniser très précisément (synchronisation à la μs), ce qui est plus difficile à réaliser avec un contrôle direct par ordinateur. Commander directement le laser sans passer par un obturateur est plus efficace mais comme nous le verrons à la section 2.2.3, nous avons besoin de garder une puissance

1. Dans nos expériences, nous faisons des images de 100 ms pour lesquelles chaque fluorophore peut être signalé par quelques centaines de photons par pixel. Le laser a une puissance d'une dizaine de milliwatts, est composé de photons d'énergie quelques électron-volts et couvre quelques dizaines de milliers de pixels. Cela se compte en centaines de milliards de photons par pixels.

2. Dénomination non standard. Il faudrait préférentiellement parler de cyan, vert printemps, vert et rouge.

3. Le séquenceur est un appareil qui peut délivrer un signal selon une séquence programmable. Une fois la séquence chargée, il l'exécute de façon autonome grâce à une horloge interne indépendante de l'ordinateur. Le séquenceur est développé par André Villing, ingénieur de recherche au LCF.

2.2 Le montage optique

constante pour les lasers vert ou bleu. Une fraction de cette puissance sera déviée avant l'obturateur et servira à établir un système de maintien de la mise au point qui doit fonctionner de façon continue.

Les faisceaux de 1 à 2 millimètres de diamètre sont ensuite élargis par un télescope $\times 10$ (Linos) pour obtenir des faisceaux capables d'exciter toute la zone observable (de $100 \mu\text{m}$ de côté). Deux miroirs servent à renvoyer les faisceaux avec le bon angle sur la dernière lentille qui les focalise dans le plan focal arrière de l'objectif. Un miroir dichroïque est placé entre cette lentille et l'objectif pour séparer les photons d'excitation et d'émission. Les faisceaux lasers d'excitation sortent de l'objectif en étant collimatés et font un angle supérieur à l'angle critique avec l'interface verre/eau, les rayons sont donc tous parallèles et l'onde évanescente créée, dont l'intensité et la profondeur dépendent de l'angle d'incidence, est uniforme sur la surface éclairée. Le montage optique est représenté sur la figure 2.2.

L'objectif est un objectif de grande ouverture numérique (Apoplan 60X, $ON = 1,45$, Olympus) à immersion à huile (10976 Fluka). L'ouverture numérique correspond au produit du sinus de l'angle maximum θ_{max} (entre l'axe optique et les rayons traversant l'objectif) et de l'indice du milieu, ici l'huile qui permet par son indice élevé ($n_1 = 1,517$ à $\lambda = 589 \text{ nm}$, 20°C) d'atteindre cette valeur de $1,45$. Or, nous avons vu que l'angle critique à dépasser pour avoir une réflexion totale vérifiait la relation :

$$n_1 \sin(\theta_c) = n_2 = 1,33$$

Nous considérons que le milieu observé possède l'indice de l'eau, $1,33$, les variations dues à la salinité étant négligeables. Le produit de l'indice du milieu par le sinus de l'angle est conservé lors du passage de l'huile au verre (d'indice similaire : $1,523$ à $\lambda = 546 \text{ nm}$, 20°C) par la loi de Snell-Descartes. Nous remarquons donc que la réflexion totale sur un échantillon aqueux ne peut être atteinte à partir d'un objectif que si celui-ci possède une ouverture numérique supérieure à l'indice de l'eau soit $1,33$.

2.2.2 Collecte des photons émis par les fluorophores excités

Nous avons un montage permettant de générer une onde évanescente à l'interface verre-eau d'une cellule microfluidique à partir d'un objectif de microscope. Nous réutilisons cet objectif d'ouverture numérique $1,45^4$ pour collecter les photons émis par les fluorophores. Nous devons alors séparer les photons d'émission de ceux d'excitation qui sont aussi collectés par l'objectif après avoir été totalement réfléchis. Nous plaçons donc un miroir dichroïque à l'arrière de l'objectif. Ce miroir qui réfléchissait les lasers d'excitation transmet les photons

4. Une ouverture numérique supérieure à l'indice du milieu observé ($1,33$ pour l'eau) ne permet pas de recueillir plus d'information, à l'exception notable des éléments proches de la surface de verre dont on peut recueillir le rayonnement à des angles supercritiques comme décrit dans [41].

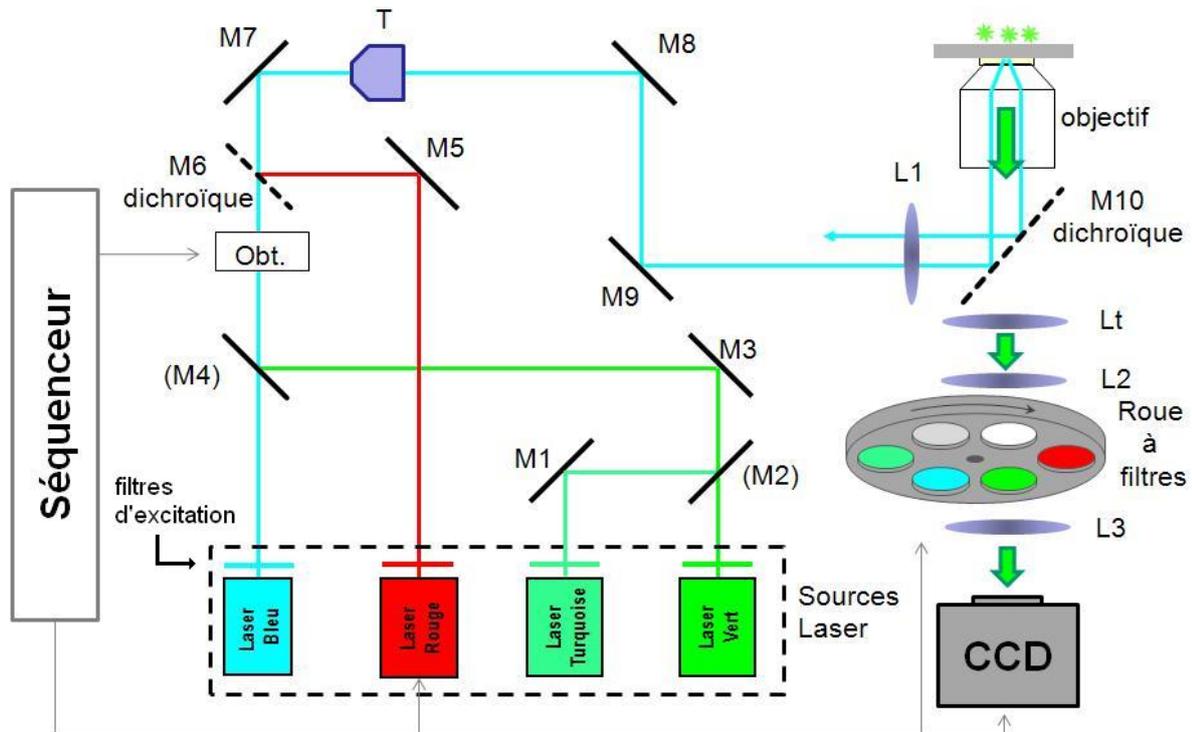


FIGURE 2.2 – Montage optique de microscopie TIRF. Les quatre lasers sont amenés sur le même trajet optique par les miroirs M1-6. Les miroirs M2 et M4 sont amovibles et permettent de choisir entre les lasers vert, turquoise et bleu. Le miroir M6 est un dichroïque permettant de combiner le laser rouge avec un autre de longueur d'onde plus courte. Le télescope T agrandit le faisceau et les miroirs M8 et M9 l'envoient sur la lentille L1 avec un angle tel que l'on se trouvera en réflexion totale en sortie de l'objectif. Le miroir dichroïque M10 réfléchit le laser d'excitation mais transmet la fluorescence collectée par l'objectif. Cette image de fluorescence est renvoyée sur la caméra EMCCD par la lentille de tube Lt en passant par une roue à filtres placée entre deux lentilles L2 et L3 de même focale. La caméra, la roue, l'obturateur (Obt.) et le courant de pompe de la diode laser rouge sont synchronisés par un séquenceur.

dans les longueurs d'onde d'émission des fluorophores. Vu les différentes longueurs d'ondes utilisées pour l'excitation, nous n'utilisons pas un seul miroir dichroïque mais trois placés dans différents cubes de la tourelle du microscope. Le dichroïque utilisé le plus fréquemment réfléchit les lasers rouge et vert (Chroma z532/633rpc).

Nous avons placé un télescope en sortie du microscope, composé de deux lentilles entre lesquelles l'image des fluorophores est renvoyée à l'infini. À ce niveau, nous avons installé une roue à filtre. Le dichroïque précédent laisse passer en transmission de 1 à 2 % de l'intensité lumineuse aux longueurs d'ondes d'excitation. Sachant que les quelques milliwatts des faisceaux d'excitation ne doivent pas cacher les quelques milliers de photons émis, un filtre ne sélectionnant que les longueurs d'onde d'émission est nécessaire. Différents filtres permettent d'observer différents fluorophores. La roue à filtre commandée par ordinateur permet de passer d'un filtre

2.2 Le montage optique

à un autre en moins de 500 *ms*. Pour observer des fluorophores excités par laser rouge, nous utilisons généralement un filtre Chroma HQ665lp ; pour une excitation turquoise, un filtre Semrock FF01-535/22 ; un filtre Chroma HQ610/75 pour une excitation verte ; un filtre Chroma HQ535/50 pour l'excitation bleue. Nous pouvons utiliser différents filtres pour chaque laser, ce qui peut permettre d'observer différents fluorophores excités à la même longueur d'onde et émettant à des longueurs d'onde différentes.

Le télescope reforme l'image de la surface au foyer de L3 où l'on a placé une caméra EMCCD (iXon, AndorTM). Cette caméra contrôlée par ordinateur délivre des images de 512×512 pixels. Compte-tenu du grandissement, ces images correspondent à des zones carrées de la surface observée de 100 μm de côté.

2.2.3 Système de maintien de la mise au point

Nous avons un montage capable d'observer des fluorophores uniques à différentes longueurs d'onde. Mais si avoir une grande ouverture numérique permet de récupérer une grande partie du signal, la mise au point devient critique car la profondeur de champ est faible. Un léger écart de mise au point étale le signal émis par un fluorophore sur plusieurs pixels et ce dernier devient rapidement indétectable. Un tel écart peut avoir lieu d'une image à l'autre pour diverses raisons telles une variation de température ou de la pression interne de la cellule microfluidique. Un écart systématique a de plus été constaté lors du passage d'une excitation rouge à une excitation bleue ou verte, dû à un chromatisme résiduel de l'objectif ou de Lt.

Nous avons donc développé un système de maintien de la mise au point. Le principe est simple : le faisceau laser est renvoyé par réflexion totale dans l'objectif et suit un parcours retour symétrique. Or, la distance entre l'objectif et l'interface qui correspond à la mise au point définit l'écart entre les faisceaux aller et retour (illustré à la figure 2.3).

Ce faisceau retour est alors réfléchi sur un petit miroir et renvoyé sur une photodiode à quatre quadrants. La position du retour laser sur la photodiode est fonction de la mise au point. Un asservissement sur le signal de la photodiode permet de maintenir la mise au point dans une configuration donnée. La mise au point est ajustée grâce à une platine de nano-positionnement piézoélectrique. Cet asservissement est programmé sous LabView. Le signal de la photodiode est numérisé (USB-6008, National Instrument) afin d'être traité par l'ordinateur. Le programme permet d'enregistrer différentes valeurs de consigne et d'associer une consigne différente à chaque position de la roue à filtre. Ainsi, chaque couleur observée possède sa propre valeur de mise au point. L'algorithme de rétroaction à action Proportionnelle-Intégrale-Dérivée a un temps de réponse, lors du passage d'une couleur à une autre, inférieur à 100 *ms* et est donc plus rapide que la rotation des filtres (environ 400 *ms*).

Nous mentionnons un faisceau retour, or nous n'excitons les fluorophores que lors de la prise d'image pour ne pas trop les photo-dégrader. Le faisceau retour n'est donc pas présent en permanence et ne peut être utilisé dans une boucle de rétroaction. Nous utilisons donc un

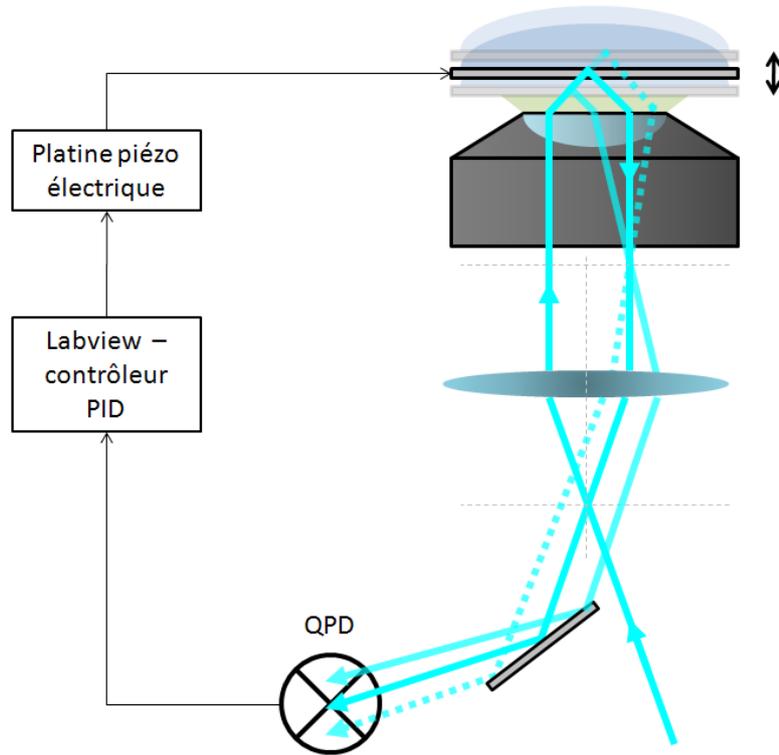


FIGURE 2.3 – Schéma de principe du système de maintien de la mise au point automatique. Un faisceau sonde en réflexion totale est renvoyé avec un décalage qui dépend de la distance entre la lamelle et l'objectif. La lecture de la position de ce faisceau retour sur une photodiode à quatre quadrants permet de définir une position de consigne pour la hauteur de la lamelle. La hauteur est corrigée à l'aide d'une platine de nano-positionnement piézoélectrique asservie selon cette consigne. Garder constante la distance entre objectif et lamelle permet de conserver la mise au point.

second faisceau parallèle au faisceau principal, dit faisceau sonde, qui reste en permanence allumé. Ce faisceau est prélevé sur les lasers vert, turquoise ou bleu avant que leurs trajets ne soient coupés par l'obturateur. Contrairement au faisceau principal, il n'est pas élargi et sera placé à la marge du trajet principal de sorte à ne pas éclairer la zone d'observation. Un schéma de son trajet optique est présenté à la figure 2.4.

2.3 Les cellules microfluidiques

Pour observer des traductions, nous devons pouvoir décider de l'instant de départ de ces traductions. Dans le cas contraire, nous risquerions de commencer l'observation après la fin de la majorité des traductions. Pour contrôler l'instant de départ, les complexes ribosomes-ARNm à la surface de la lamelle sont privés d'ARNt chargés et de facteurs d'élongation. Les traductions ne peuvent alors avoir lieu qu'après la mise en présence des complexes avec des

2.3 Les cellules microfluidiques

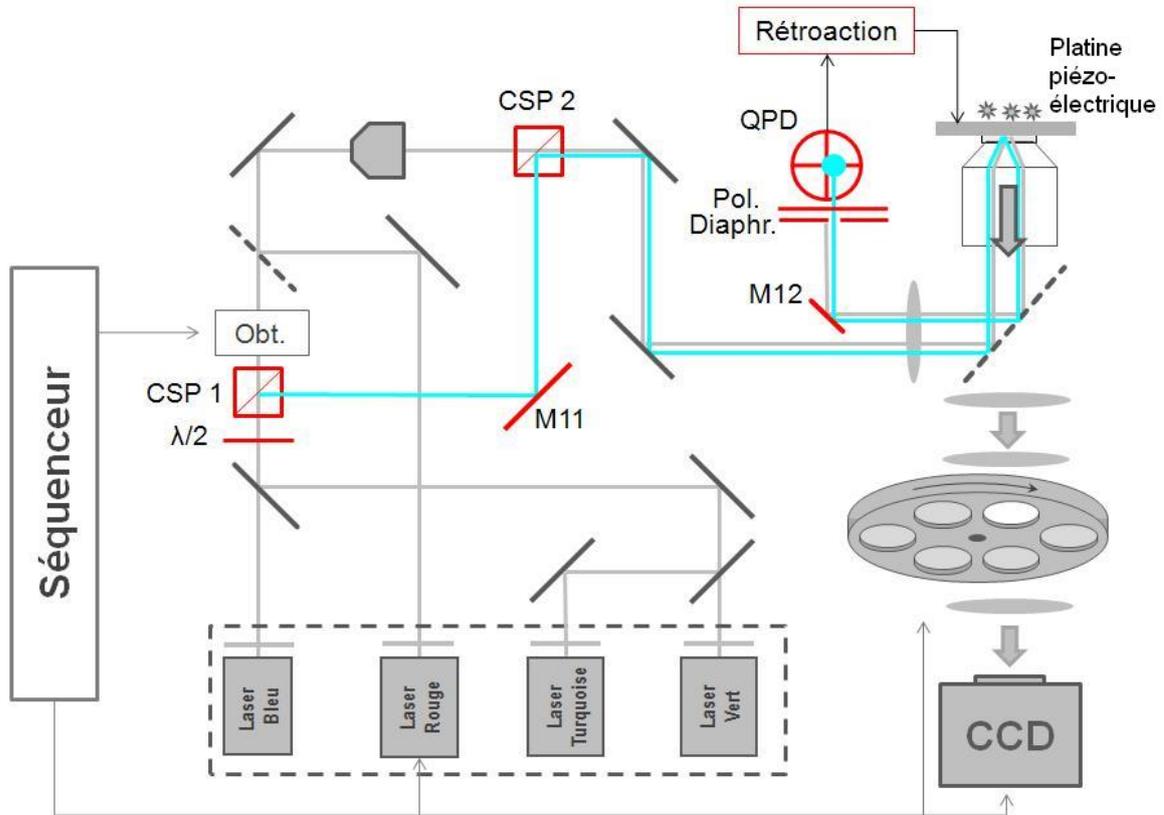


FIGURE 2.4 – Montage auquel on a rajouté un système de maintien de focus automatique. Un cube séparateur de polarisation (CSP1) extrait une partie du faisceau bleu ou vert puis un second cube (CSP2) la recombine avec le faisceau principal. La puissance du faisceau déviée est réglée grâce à l'orientation d'une lame demi-onde ($\lambda/2$) située avant le premier cube. Les faisceaux retours en sortie de l'objectif sont récupérés par un petit miroir (M12) et le faisceau sonde est envoyé sur une photodiode à quatre quadrants située derrière un diaphragme et un polariseur. Cette photodiode délivre un signal utilisé pour asservir la hauteur de la platine piézoélectrique.

extraits cellulaires contenant ces facteurs. Remplacer le tampon dans lequel baignent les systèmes accrochés à la surface de la lamelle par des extraits cellulaires marque donc le début des événements traductionnels. Ce remplacement doit donc être rapide et doit pouvoir être fait en parallèle d'une acquisition d'images. Nous avons donc mis au point des cellules microfluidiques nous permettant de remplacer le contenu de leur chambre d'observation rapidement sans déplacer la lamelle par rapport à l'objectif du microscope.

La figure 2.5 décrit cette cellule microfluidique. Elle est composée d'une lame et d'une lamelle de microscope collées l'une à l'autre par du ruban adhésif double-face. La lamelle (Menzel-Gläser Nr 1 borosilicate) a une épaisseur de 0,13 à 0,16 mm. La bande de ruban adhésif est découpée de façon à créer une chambre dont la paroi inférieure sera placée contre l'objectif du microscope. Le canal ainsi créé mesure 200 μm d'épaisseur, 3 à 5 mm de largeur sur 3 à 4 cm de longueur. Aux deux extrémités du canal, la lame de verre est percée par des

trous de diamètre $0,8\text{ mm}$. L'un des deux trous mène à un réservoir en PDMS d'une contenance de $50\ \mu\text{L}$. Ce réservoir constitue l'entrée du canal, on y dépose les extraits cellulaires avant de les injecter dans la chambre. L'autre trou débouche sur un capillaire relié à une seringue. Avec l'aide d'un tire-seringue (pousse-seringue de Harvard Apparatus modifié) nous pouvons imposer un flux au débit prédéfini ($100\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) sur une durée choisie. L'aspiration vide la chambre et remplace son contenu par celui du réservoir. Ce système rend possible l'injection de produits sur la zone d'observation au cours d'une expérience.

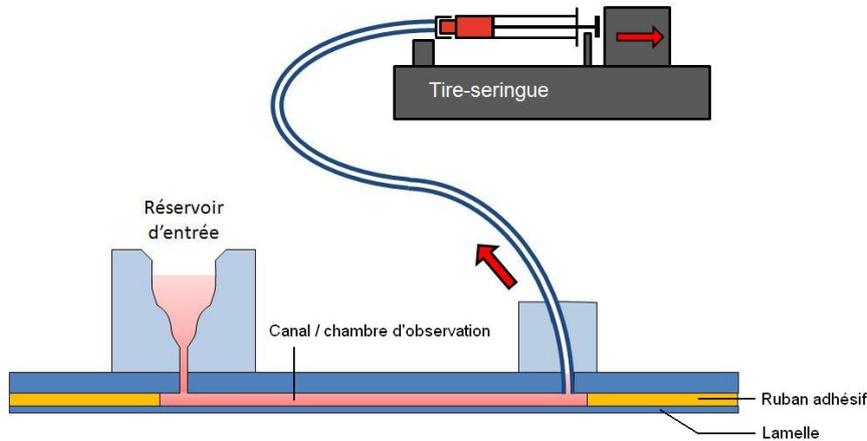


FIGURE 2.5 – Cellule microfluidique et tire-seringue.

Nous possédons un système de chauffage adapté à ces cellules microfluidiques mis en place par Antoine Le Gall [2] (figure 2.6). Ce système est composé d'une plaque en cuivre sur laquelle est fixé un module Peltier qui transfère de la chaleur depuis un petit radiateur (cube métallique) vers la plaque. L'alimentation du module est asservie électroniquement à une consigne en température comparée à la température mesurée à un endroit donné de la plaque de cuivre.

La zone d'observation est en contact avec l'objectif (à une fine couche d'huile et une encore plus fine lamelle de verre près) et celui-ci est vissé au microscope. La structure de l'objectif et du microscope étant en métal, la capacité et la conductance thermiques de ceux-ci sont très élevées. L'objectif se comporte comme un puits thermique et maintient l'échantillon à une température proche de la température ambiante (entre 20 et $22\ ^\circ\text{C}$ dans notre laboratoire). Nous avons donc entouré l'objectif d'une gaine chauffante pour palier à ce problème.

En combinant le chauffage par la plaque de cuivre et par l'objectif, nous sommes capables d'assurer une température stable au niveau de l'échantillon. Dans les conditions habituelles de nos expériences, nous nous plaçons à $31 \pm 1\ ^\circ\text{C}$.

2.4 Séquence d'acquisition

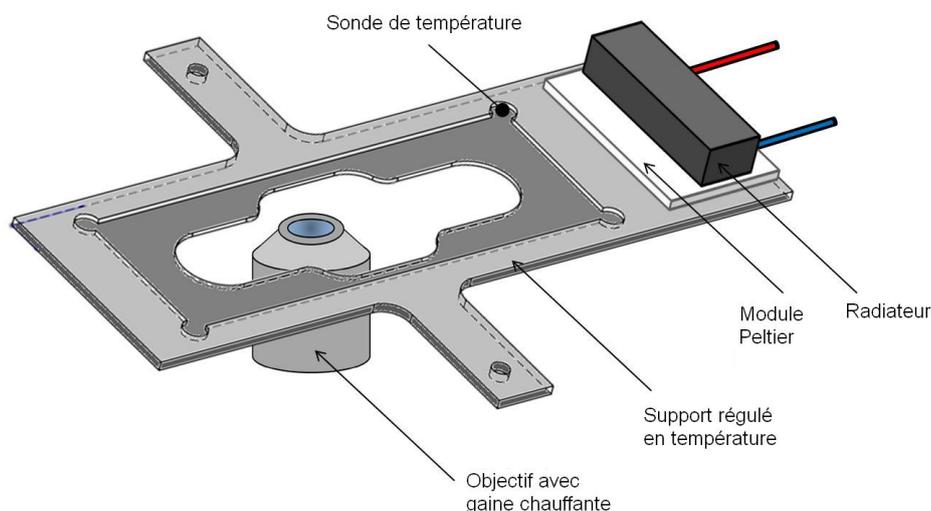


FIGURE 2.6 – *Système de chauffage des échantillons.*

2.4 Séquence d'acquisition

Nous avons vu les éléments du montage de microscopie TIRF permettant d'observer un groupe de fluorophores fixés à une surface. Il s'agit alors d'observer ces fluorophores au cours du temps.

Après injection des systèmes marqués par les fluorophores dans une cellule microfluidique, cette dernière est placée sur l'objectif à immersion à huile du microscope et nous observons la fluorescence pour une surface excitée de façon continue par une onde évanescente.

La caméra recueille alors un signal de fluorescence que nous pouvons observer en temps réel. La figure 2.7 montre deux exemples d'images observables par microscopie TIRF. Les niveaux de gris sont proportionnels au nombre de photons captés par la caméra, le fond est donc sombre et parsemé de points clairs : les fluorophores. Une zone est exploitable si elle contient moins de 2000 fluorophores fixés à la surface⁵ mais il est d'autre part préférable d'un point de vue statistique d'avoir plus de 500 points par zone d'observation.

L'injection se fait au début d'un film de 100 images prises toutes les 5 secondes. Chaque image correspond à une excitation laser et une acquisition simultanées de 200 *ms* ce qui donne dans nos conditions d'excitation un bon ratio signal sur bruit (supérieur à 4). Nous indiquons sur la figure 2.8 le déroulement d'un cycle d'acquisition répété cent fois. Un quart d'heure après l'injection, il est possible de prendre une autre série d'images sur une zone voisine pour étudier le photoblanchiment sur les oligo-fluorophores n'ayant pas été affectés par les traductions.

Dans le cas d'un contrôle avec antibiotique, nous suivons les mêmes étapes en ajoutant l'antibiotique à toute solution entrant en contact avec les systèmes ribosomes-ARNm.

5. Il s'agit d'un constat empirique : notre programme n'arrive plus à détecter tous les points lorsque ceux-ci sont trop proches les uns des autres. La perte d'efficacité n'est plus négligeable lorsque il y a plus de 2000 points par zone d'observation.

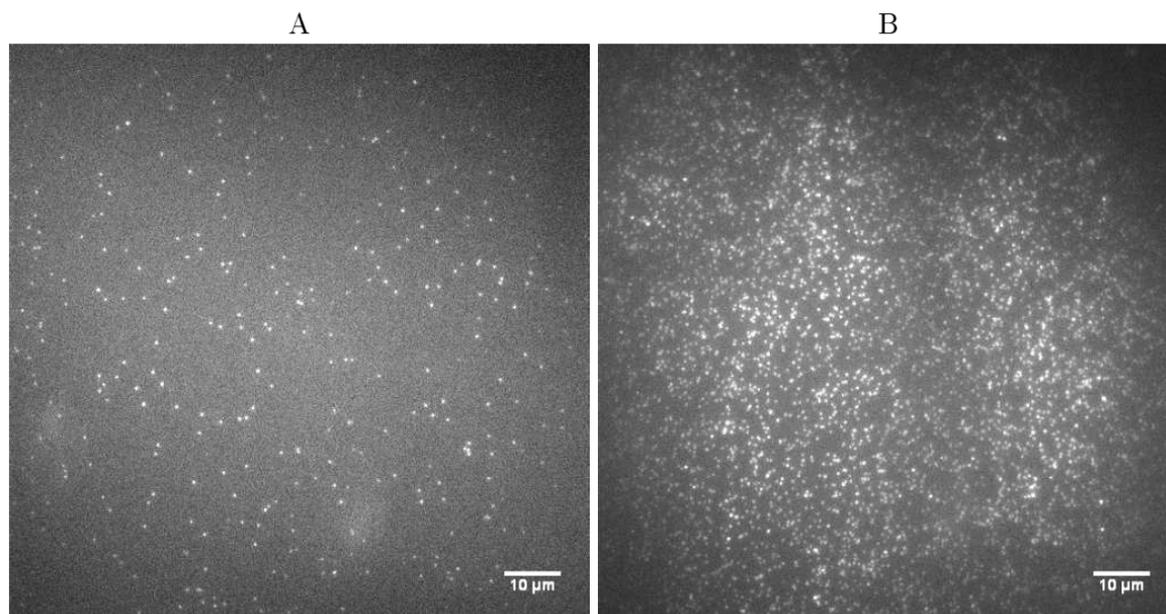


FIGURE 2.7 – Exemples d’images observées par microscopie TIRF. A : Image peu chargée en fluorophores, on en compte environ 300. B : Image chargée en fluorophores, environ 2500, ce qui est un peu trop dense pour pouvoir être étudié proprement.

2.5 Accroche spécifique aux lamelles de microscope

Nous avons vu que l’excitation par onde évanescente permettait d’observer les fluorophores situés à l’interface verre/eau. Si nous souhaitons voir des traductions sur une surface, nous devons pouvoir attacher des systèmes biologiques à cette surface.

Tout d’abord, la surface doit être propre de toute particule fluorescente. Pour ce faire, les lamelles sont placées dans un portoir en verre et lavées aux ultrasons dans un bain d’acétone pendant 25 minutes, puis deux fois dans un bain d’eau ultra-pure pendant 25 minutes. Une fois sèches, elles sont soumises à un plasma d’oxygène (de 0,4 mbar) pendant dix minutes. Nous conservons les lamelles ainsi nettoyées sous une hotte à flux laminaire de classe 100.

Une particule quelconque peut venir se fixer sur une surface de façon dite non-spécifique. La liaison n’est pas particulièrement stable et la particule ne reste en place que quelques instants. Pour observer une réaction biologique au cours du temps, ce type d’accroche n’est pas adapté. Dans notre cas, nous souhaitons avoir des systèmes biologiques accrochés de façon stable. La première étape consiste donc à passiver la lamelle de verre. Il s’agit de recouvrir le verre de molécules électriquement neutres au pH de l’expérience. Nous avons choisi de passiver nos surfaces à l’aide de polyéthylène-glycol (PEG). Les PEG utilisés possèdent une fonction silane à une extrémité : il s’agit d’un hydrure de silice qui crée aisément des liaisons avec le silicate (verre).

Notre objectif est d’accrocher les systèmes biologiques rapporteurs de façon stable. Nous

2.5 Accroche spécifique aux lamelles de microscope

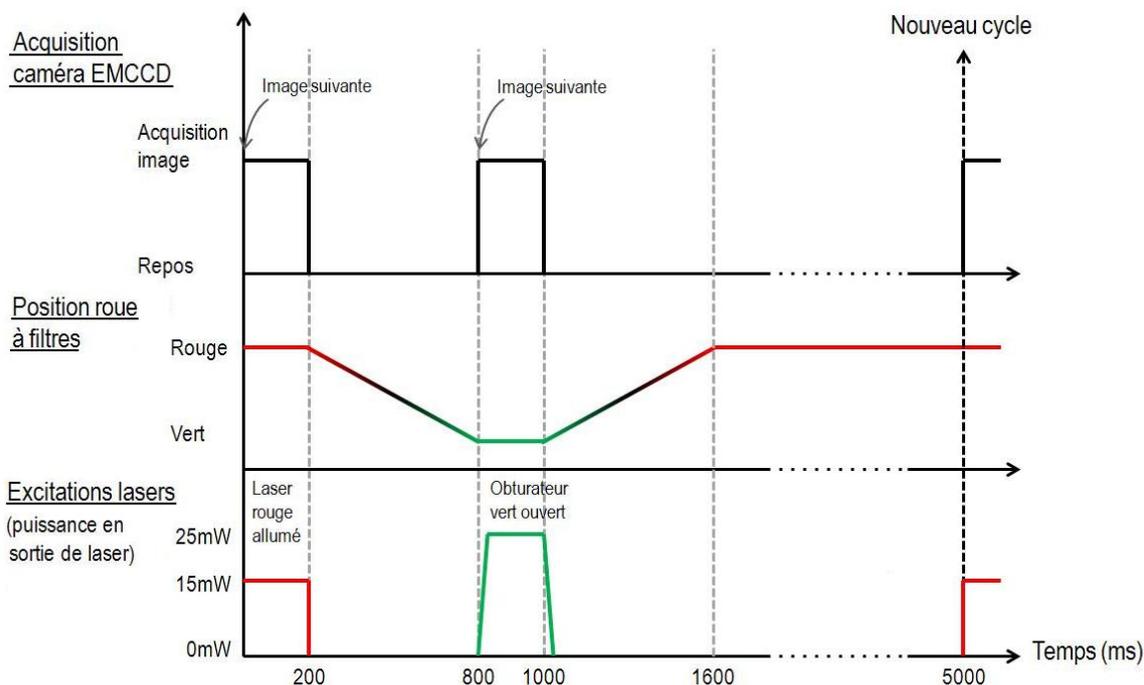


FIGURE 2.8 – Cycle d'acquisition d'images pour un film de traduction. Les différents éléments sont commandés à l'aide d'un séquenceur permettant une synchronisation à la microseconde près. Nous présentons le cas où nous observons des fluorophores de deux couleurs différentes. Dans le cas où on observerait un seul fluorophore, la roue à filtre resterait constamment sur la même position et on n'effectuerait qu'une seule acquisition d'image par cycle. La caméra est réglée pour faire l'acquisition d'une séquence d'images de 200 ms chacune (100 ms sont parfois suffisantes si le ratio signal sur bruit est assez élevé). La roue à filtre dispose de 600 ms pour passer d'une position à une autre, il est possible d'être plus rapide mais il y a alors un risque de dérégler la roue. Le laser rouge est piloté par commande analogique, le laser vert reste allumé (pour assurer son rôle parallèle dans le système de maintien de focus automatique) et n'est bloqué que par un obturateur mécanique dont le temps de réponse est de quelques millisecondes. Un compromis entre les cinétiques de traduction et de photoblanchiment nous fait prendre une image dans chaque couleur toutes les cinq secondes, mais il est possible de prendre jusqu'à quatre images par seconde dans une couleur ou à l'opposé de patienter jusqu'à trente secondes entre deux images.

utilisons le couple biotine-streptavidine bien connu ayant une faible constante de dissociation (de l'ordre de $10^{-15} \text{ mol.L}^{-1}$). Nous utilisons la Neutravidine (Invitrogen, Molecular Probes) qui possède la même constante de dissociation avec la biotine ainsi qu'un potentiel isoélectrique presque neutre (6,3). La Neutravidine possède quatre sites d'accroche pour les biotines ce qui lui permet de faire le lien entre une surface et des ARNm biotinylés.

Pour assurer la présence de biotines à la surface, nous ne passivons pas uniquement avec du PEG-silane mais aussi avec du biotine-PEG-silane. Le PEG-silane (Methoxy-Poly (Ethylene Glycol)-Silane, 5000 $g.mol^{-1}$, Laysan Bio, figure 2.9) est conservé en poudre à $-80^\circ C$. Le biotine-PEG-silane (Biotin-Poly (Ethylene Glycol)-Silane, 5000 $g.mol^{-1}$, Laysan Bio, figure

2.10) est conservé à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, dilué à 200 g.L^{-1} dans du méthanol. Nous diluons 20 mg de PEG-silane et 1 mg de biotine-PEG-silane dans un tampon d'acide borique (100 mM) à pH 8,8 avant d'injecter sur une surface préalablement activée par un plasma d'oxygène⁶ (ce plasma renettoiera par la même occasion les surfaces de verre). Nous mettons le PEG en excès par rapport au PEG-biotine pour limiter le nombre d'accroches disponibles à la surface. Le nombre de systèmes biologiques effectivement accrochés dépendra également de leur concentration lors de leur injection et du temps d'incubation avant rinçage.

Le silane s'hydrolyse en phase aqueuse et cette réaction est fortement dépendante du pH [42]. La vitesse de réaction du silane avec la surface de silice dépendra également du pH. La nature et le pH du tampon ont donc été optimisés empiriquement.

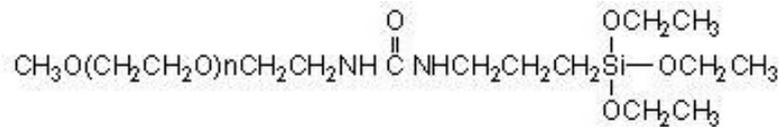


FIGURE 2.9 – Structure du PEG sans biotine terminé par une fonction silane.

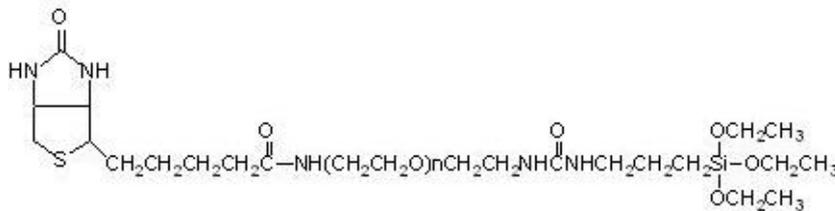


FIGURE 2.10 – Structure du PEG-biotine terminé par une fonction silane.

Après passivation par le PEG avec incubation de une à deux heures, la surface est rincée avec le tampon d'acide borique et reste au repos une nuit entière. Ce temps de repos est empirique, nous supposons que les surfaces perdent leurs charges résiduelles car la quantité d'accroches non-spécifiques diminue avec le temps. Le lendemain, nous rinçons avec une solution de BSA (Bovine Serum Albumin) à 10 g.L^{-1} dans un tampon TRIS pH 7,5 (100 mM 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol) salé (250 mM NaCl) que nous laissons incuber une à deux heures. Nous rinçons avec le tampon TRIS salé puis, avant utilisation sur le microscope, nous injectons la Neutravidine (100 mg.L^{-1} dans TRIS salé) pendant cinq à dix minutes. Après rinçage par un tampon adapté aux ribosomes, la cellule sur laquelle est fixée la lamelle est prête à recevoir des systèmes biologiques munis de biotines et à être placée sur le microscope.

6. Après ce passage dans un plasma d'oxygène, nous intégrons les lamelles aux cellules microfluidiques. L'injection et le rinçage des différents éléments passivants se fait dans le canal des cellules.

2.6 Choix des oligos marqués

Nous avons une surface prête à être observée par microscopie TIRF, passivée et possédant des sites d'accroche spécifiques pour des biotines. Il ne reste plus qu'à y fixer les systèmes biologiques à étudier.

Nous préparons donc des hybridations d'ARNm avec des oligos, certains fonctionnalisés avec une biotine pour assurer la liaison avec la surface, d'autres avec un fluorophore qui fera office de marqueur.

2.6.1 Hybridation des oligos

La grandeur qui caractérise habituellement l'affinité d'une séquence d'oligo-nucléotides pour son complémentaire est la température de fusion, T_m . T_m est la température à laquelle la moitié des oligos sont hybridés à leurs complémentaires. Aux températures inférieures les séquences complémentaires sont hybridées tandis qu'aux températures plus élevées les séquences sont sous forme simple brin. Cette grandeur est calculée par la relation suivante [43] (avec R la constante des gaz parfaits) :

$$T = \frac{\Delta H^0}{\Delta S^0 + R \cdot \ln\left(\frac{[ARN] \cdot [Oligo]}{[Complexe]}\right)} \quad (2.1)$$

$$\Rightarrow T_m = \frac{\Delta H^0}{\Delta S^0 + R \cdot \ln\left(\frac{[ARN]_{init.}}{2}\right)} \quad (2.2)$$

où $[ARN]_{init.}$ est la concentration initiale en ARNm et en oligo supposée identique dans les deux cas. Pour un oligo de séquence AAAGAGUUCAGCAGU par exemple (on le note *oligo15*), l'enthalpie standard de formation ΔH^0 vaut -579 kJ.mol^{-1} et l'entropie standard de formation ΔS^0 vaut $-1,5 \text{ kJ.mol}^{-1}.K^{-1}$. Ces ΔH^0 et ΔS^0 sont calculés à partir des tables de [44] pour des liaisons ARN-ARN et ne prennent pas en compte les concentrations ioniques comme il est possible de le faire, par exemple dans [45].

L'équation (2.2) définit le T_m à partir de ΔH^0 , ΔS^0 et $[ARN]_{init.}$. Or, la température de fusion est fréquemment considérée comme indépendante de la concentration car la valeur de $R \cdot \ln\left(\frac{[ARN]_{init.}}{2}\right)$ est petite devant ΔS^0 . Avec la séquence choisie, diluer dix fois les oligos et les ARNm fait varier T_m de $5 \text{ }^\circ\text{C}$ uniquement. Pour une séquence trois fois plus longue, l'écart n'est plus que de $2 \text{ }^\circ\text{C}$. Il est donc assez fréquent de considérer le T_m comme indépendant de la concentration. Restent ΔH^0 et ΔS^0 qui dépendent de la séquence étudiée, de la nature des acides nucléiques et des conditions de salinité.

Cependant, on calcule T_m à partir de l'équation (2.1) en choisissant une concentration en complexe égale à la moitié des concentrations initiales. Considérer que le terme $R \cdot \ln\left(\frac{[ARN] \cdot [Oligo]}{[Complexe]}\right)$

est négligeable revient à ne plus imposer une concentration égale en formes hybridées et séparées ($[ARN] = [Oligo] = [Complexe]$) ce qui est la définition de la température de fusion. Cette approximation est tout de même valable car, pour de longs oligos, il suffit de quelques degrés seulement pour passer de 10 à 90 % d'hybridation. On le constate à la figure 2.11 avec notre séquence de l'*oligo15* comparée à une séquence plus courte et une plus longue, cette figure représentant l'évolution théorique du ratio d'oligos déshybridés en fonction de la température. Nous utilisons l'équation suivante, réciproque de l'équation (2.1), où l'on considère une fois de plus que les concentrations initiales en oligos et ARNm sont identiques :

$$\frac{[Oligo]}{[Oligo]_{init.}} = \frac{1}{2 \cdot [Oligo]_{init.}} \left(-e^{\frac{1}{R} \cdot (\frac{\Delta H^0}{T} - \Delta S^0)} + \sqrt{e^{\frac{2}{R} \cdot (\frac{\Delta H^0}{T} - \Delta S^0)} + 4 \cdot [Oligo]_{init.} \cdot e^{\frac{1}{R} \cdot (\frac{\Delta H^0}{T} - \Delta S^0)}} \right) \quad (2.3)$$

Les courbes de la figure 2.11 sont donc généralement approximées par un échelon passant rapidement de l'état déshybridé à hybridé autour d'une certaine valeur de température notée T_m . On ne peut manquer de constater que cette approximation est d'autant plus valable que la séquence est longue. Dans la suite, nous conserverons la séquence intermédiaire (oligo15) pour étudier les autres paramètres.

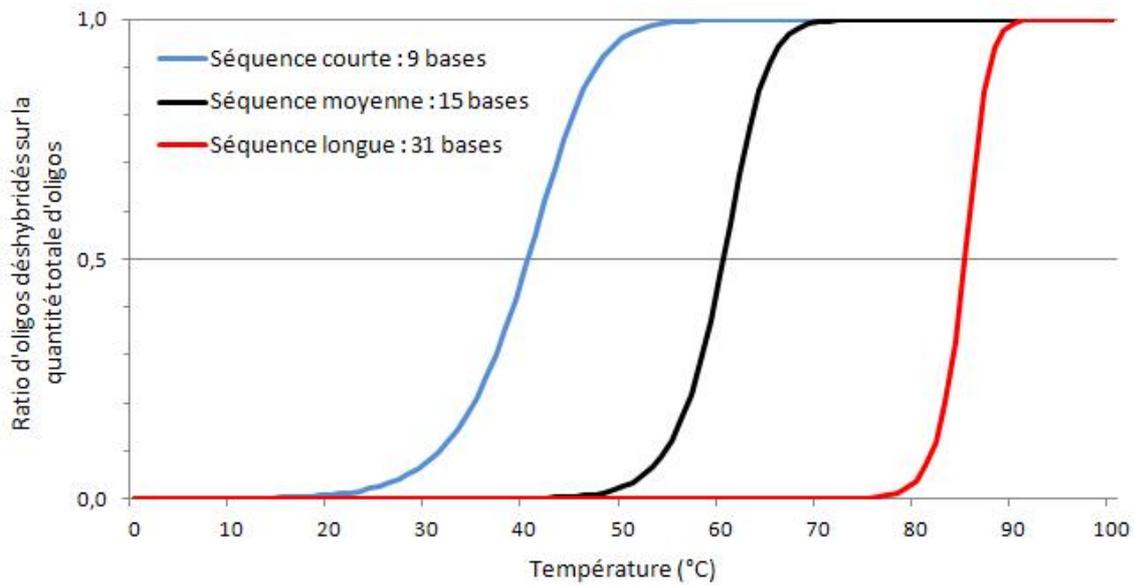


FIGURE 2.11 – Evolution théorique du ratio d'oligos déshybridés en fonction de la température (en °C). 200 nM initiaux en oligos et séquences complémentaires (ARN-ARN), 1 M de Na^+ . Les courbes de trois oligos ARN différents sont représentées. le plus court (courbe bleue) a pour séquence AGU UCA GCA, l'intermédiaire (en noir) AAA GAG UUC AGC AGU (oligo15) et le plus long (en rouge) AAA GAG UUC AGC AGU AGA AAC UUU GAA AGC A.

Cependant, si la température de fusion ne varie pas significativement avec la concentration

2.6 Choix des oligos marqués

des brins complémentaires, elle reste sensible aux très fortes dilutions. Nous pouvons suivre sur la figure 2.12 l'évolution théorique de la température de fusion en fonction de la concentration initiale en séquences complémentaires. Diluer dix fois ne change pas significativement la température de fusion, mais lorsque l'on travaille en molécule unique, on peut être amené à diluer un million de fois puis à rincer les particules non fixées à la surface (ce qui revient à effectuer une forte dilution).

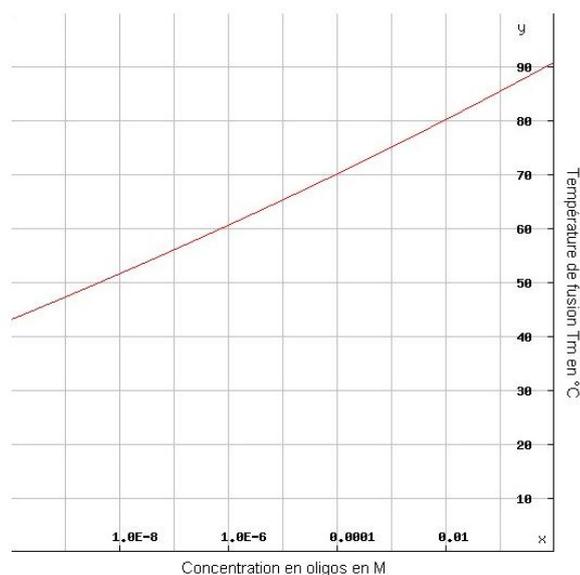


FIGURE 2.12 – Evolution théorique (selon l'équation (2.2)) de T_m (en °C) en fonction de la concentration (en M, échelle log) en oligos et séquences complémentaires. On se place dans le cas d'une liaison ARN-ARN avec 1 M en Na^+ .

D'autre part, on ne peut se fier totalement à ces courbes, l'estimation de la température de fusion étant approximative. En effet, l'équation (2.2) suppose connues ΔH^0 et ΔS^0 . Ces paramètres sont dépendants de la séquence et sont estimés à partir de mesures de T_m de séquences connues. Les auteurs de [48] comparent différentes valeurs de ΔH^0 et ΔS^0 pour des doublets de nucléotides ADN mesurés par différentes équipes. La figure 2.13 compare les courbes d'hybridation calculées selon les valeurs proposées par Santa Lucia *et al.* [46] et Breslauer *et al.* [47] La différence obtenue est du même ordre de grandeur que la différence entre des liaisons ADN-ADN et ARN-ARN. Les erreurs caractéristiques estimées sur les mesures annoncées dans ces articles sont de l'ordre d'un dixième de la valeur obtenue.

Nous comparons ici les liaisons ADN-ADN et ARN-ARN car celles-ci sont les plus documentées. Dans nos expériences, il nous est arrivé d'utiliser des hybridations ADN-ARN (en particulier dans le cas des expériences avec les ribosomes procaryotes). Il est montré dans [49] que la différence de stabilité entre ces différents types d'hybridation dépend de la séquence. Nous supposons donc que le comportement des différentes hybridations est similaire et que les écarts auxquels on peut s'attendre sont de l'ordre de ceux tracés sur la figure 2.13.

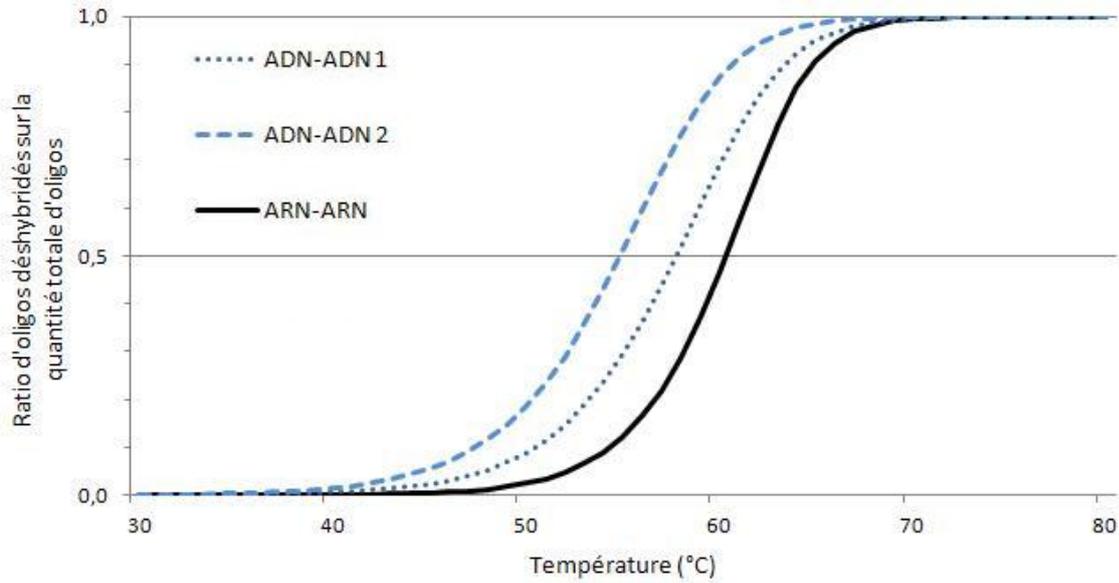


FIGURE 2.13 – Evolution théorique du ratio d'oligos déshybridés en fonction de la température (en °C). 200 nM initiaux en oligos et séquences complémentaires, 1 M de Na^+ . La courbe en tirets bleus (1) correspond à des liaisons ADN-ADN selon Santa Lucia et al. [46], celle en pointillé bleu ciel (2) à des liaisons ADN-ADN selon Breslauer et al. [47], celle en noir à des ARN-ARN selon Chen et al. [44]

Pour finir, les valeurs de ΔH^0 et ΔS^0 peuvent dépendre d'autres paramètres physico-chimiques tels que la concentration en ions Na^+ . Des équations plus ou moins simplifiées prenant en compte ce paramètre dans l'estimation du T_m sont proposées dans [45]. La température de fusion semble évoluer de façon linéaire avec le logarithme de la concentration en sodium, ce dernier stabilisant l'hybridation.

Conclusion pour nos expériences

En pratique, il conviendra d'être prudent pour ne pas voir les oligos se détacher spontanément de l'ARNm. Nous conserverons une certaine concentration en sels, mais nous serons contraints de diluer les hybridations à des concentrations nanomolaires. Ces concentrations perdront encore quelques ordres de grandeur lorsque la cellule sera rincée puis lors l'injection des extraits cellulaires.

Toutefois, la température de fusion ne donne d'information que sur l'équilibre du système. Si la cinétique de dissociation est suffisamment lente, il peut être possible de se placer hors équilibre sans subir trop de départs spontanés le temps de l'expérience (moins d'une demi-heure). En injectant des complexes ARN-ARN ou ADN-ARN sur la surface et en les observant sur quelques dizaines de minutes, nous pouvons vérifier que les départs spontanés ne sont pas trop rapides.

2.6 Choix des oligos marqués

Forts de ces informations, nous utilisons des hybridations stables à 30 °C pour fixer sur l'ARNm des oligos biotinylés et des oligos fluorescents. Ces hybridations sont faites en chauffant l'ARNm et oligos à des concentrations micromolaires puis en les laissant refroidir à température ambiante.

Dans le cas des oligos-fluorophores, nous avons une nette préférence pour les ATTO (ATTO-TEC) que nous excitions dans le bleu, le vert ou le rouge. Nous avons choisi les ATTO pour leurs excellentes propriétés photophysiques en molécule unique. Les ATTO 550 et 565 peuvent être utilisés avec le laser vert, les ATTO 488 avec le bleu et les ATTO 647N avec le rouge. Leurs spectres sont montrés à la figure 2.14.

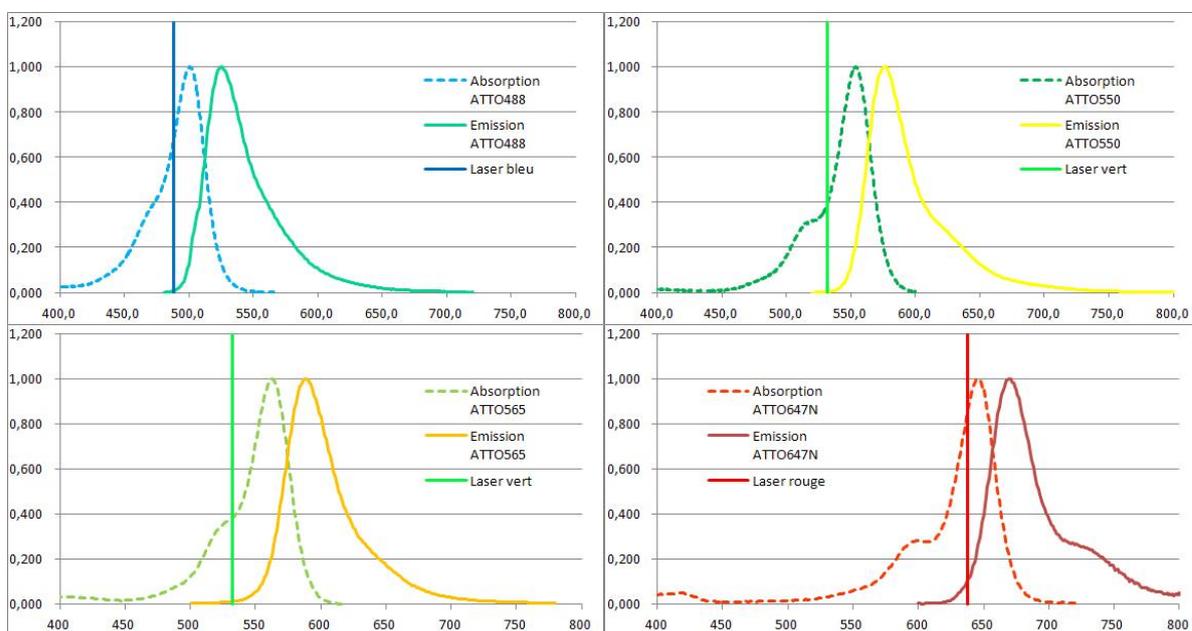


FIGURE 2.14 – Spectres d'absorption et d'émission (abscisses en nm) des différents ATTO utilisés. Le trait vertical représente la longueur d'onde d'excitation utilisée pour chaque fluorophore.

Nous choisissons une température de fusion élevée, proche de 70 °C, pour les oligos dont le rôle est de rester fixé à l'ARNm tout au long de l'expérience. C'est le cas pour les oligos biotinylés ou, dans certaines expériences que nous avons effectuées avec les ribosomes procaryotes, des oligos fluorescents situés au delà du codon stop censés simplement marquer la présence de l'ARNm.

Pour les expériences sur le ribosome eucaryote décrites dans ce manuscrit, les oligos fluorophores sont placés sur le trajet du ribosome. Nous avons choisi des températures de fusion plus faibles, de l'ordre de 40 °C, afin de ne pas placer de structures trop stables sur le trajet du ribosome. Nous avons choisi la séquence du premier oligo noté 4r parmi celles décrites dans [10] (oligo H12) où il est prouvé que les ribosomes peuvent déshybrider les oligos et poursuivre la

traduction. Pour le second oligo 13v, nous avons choisi une séquence de 12 nucléotides également, ayant la même proportion de bases C et G pour avoir la même stabilité que l'oligo 4r.

2.6.2 Amélioration de la durée de vie des fluorophores

Nous avons choisi les ATTO pour leurs qualités photophysiques. Notre équipe avait travaillé auparavant sur d'autres fluorophores aux caractéristiques moins bonnes, les bodipy-FL [50]. Il s'agissait d'augmenter leur durée de vie en ajoutant un couple oxydant réducteur (système appelé ROXS pour Reducing and OXidizing System) dans les tampons ainsi qu'un système enzymatique pour dépléter la solution en oxygène. En effet, la présence d'oxygène, combinée à l'excitation laser peut former des radicaux libres en partie responsables du photoblanchiment des fluorophores. Cependant, l'oxygène diminue aussi la durée de vie de l'état triplet (état métastable dans lequel la molécule ne fluoresce pas) ramenant les fluorophores à leur état fondamental. Il est remplacé dans ce rôle par le couple oxydant réducteur.

Une fois nos préférences fixées sur les ATTO, nous avons tenté de leur appliquer la même procédure pour améliorer leur durée de vie déjà raisonnablement longue. Dans un tampon TRIS, nous avons réussi à multiplier jusqu'à trente fois cette durée de vie sous excitation laser. Le couple oxydant réducteur utilisé est le méthylviologène ($500 \mu M$) associé à l'acide ascorbique ($500 \mu M$) comme suggéré dans [51]. Pour ôter l'oxygène de la solution, nous utilisons le protocatéchuate dioxygénase (PCD, $22,5 nM$) et son action sur l'acide protocatéchique (PCA, $10 mM$) [52].

Malheureusement, la durée de vie des fluorophores est moindre dans le RRL comparé au TRIS : les temps de vie sont divisés par 2 et l'ajout du ROXS multiplie cette durée par 5 tout au plus. Le RRL étant un lysat contenant une concentration non négligeable d'hémoglobine, nous supposons que cette dernière sert de puits à oxygène maintenant la teneur en oxygène en solution élevée. L'amélioration de la durée de vie des fluorophores n'est plus instantanée à l'échelle de l'expérience mais prend quelques dizaines de minutes. Il existe donc un risque que selon l'avancement de la réaction de suppression de l'oxygène, les durées de vie des fluorophores soient différentes d'une cellule à l'autre. Pour que le photoblanchiment puisse être ignoré, il faut qu'il ait le même comportement dans l'expérience que dans le contrôle. Pour cette raison, nous avons préféré ne pas utiliser ce système dans les expériences eucaryotes. Nous décrivons dans le tableau 2.1 les valeurs de réduction de photoblanchiment obtenues lors d'une expérience de caractérisation de ce système.

De même, la durée de vie des fluorophores avant photoblanchiment est plus faible dans le PURExpress qui est un système reconstitué de composants purifiés nécessaires à la traduction que nous utilisons lorsque nous travaillons avec des ribosomes procaryotes. Bien que cette différence soit moins marquée que dans le cas du RRL, nous avons décidé là aussi de ne pas risquer de nous confronter à un photoblanchiment variable.

2.7 Préparation des systèmes biologiques

Solution	Temps caractéristique de photoblanchiment (s)	Facteur de multiplication par rapport au tampon de référence
TRIS	35	1 (réf.)
TRIS + ROXS	500	14
RRL seul ou RRL + ROXS	25	0,7
RRL + ROXS (après 1h)	100	3
PURExpress	25	0,7
PURExpress + ROXS	200	6

TABLE 2.1 – Tableau des temps caractéristiques de photoblanchiment dans des solutions standards avec et sans système de réduction du photoblanchiment (noté ROXS). Ces temps de vie avant photoblanchiment sont ceux d'ATTO 647N excités en réflexion totale par un laser délivrant 15 mW. Ces valeurs peuvent changer selon l'angle d'incidence du faisceau avant réflexion totale, la puissance laser ou le type de fluorophore mais nous retrouvons ces ordres de grandeur pour les ATTO 550 et ATTO 565. Ce système ROXS est très efficace dans un tampon standard (TRIS dans notre cas) mais perd de son efficacité dans des extraits cellulaires (RRL) et dans des facteurs de traduction purifiés (PURExpress). Dans le cas du RRL contenant de l'hémoglobine, il faut attendre plusieurs dizaines de minutes avant de voir un effet du ROXS alors que son action est immédiate dans les autres cas.

Ce système oxydant, réducteur avec déplétion d'oxygène reste extrêmement efficace dans des solutions tampon simples et peut être utilisé pour l'étude des hybridations qui ne demandent pas d'extrait cellulaire.

2.7 Préparation des systèmes biologiques

Sur les hybridations entre ARNm, oligo biotinylés et oligos marqués par un fluorophore, nous placerons des ribosomes en phase d'initiation auxquels il ne manque qu'un extrait cellulaire pour débiter la phase d'élongation.

Ces systèmes biologiques ainsi préparés seront injectés dans les cellules microfluidiques et pourront commencer à être observés avant l'injection des extraits cellulaires.

Nous décrivons ici aussi bien le cas procaryote qu'eucaryote, pour bien faire ressortir les différences, même si nous avons fait le choix au chapitre 4 de ne présenter que les résultats obtenus sur l'eucaryote. Les protocoles détaillés du cas procaryote sont décrits dans [2] tandis que ceux du cas eucaryote le sont dans [3] ainsi qu'à l'annexe A.

2.7.1 Cas procaryote

Le protocole de préparation des systèmes biologiques avant injection sur la surface est quelque peu différent selon que nous travaillons avec des ribosomes procaryotes ou eucaryotes.

Pour les expériences procaryotes, nous hybridons les ARNm avec les oligos ADN complémentaires en chauffant une minute à 90 °C avant de laisser refroidir à température ambiante.

Nous laissons les ribosomes 70S se complexer à l'ARNm sur le codon start (AUG). Les ribosomes sont stabilisés par la présence de la séquence de Shine-Dalgarno sur l'ARNm et de $fMet - ARNt^{fMet}$ se plaçant dans leur site P. [53,54] Le $fMet - ARNt^{fMet}$ est un ARN de transfert complémentaire du codon AUG portant un acide aminé méthionine formylé caractéristique du début des chaînes polypeptidiques.

Dans le cas d'expériences témoins, on souhaite bloquer la traduction. Nous mettons donc les ribosomes en présence d'un antibiotique. Nous utilisons l'érythromycine qui se lie à la grande sous-unité (50S) et bloque la translocation.

Pour lancer la traduction une fois les ribosomes complexés aux ARNm et ces derniers liés à la surface, nous injectons des extraits cellulaires purifiés. Nous utilisons le PURExpress® (New England BioLabs) qui contient les éléments purifiés nécessaires à la synthèse de protéines à partir d'ADN. Ces extraits cellulaires contiennent en particulier de quoi effectuer une traduction d'ARNm en protéine. Pour l'expérience témoin, nous ajoutons de l'érythromycine dans le PURExpress®.

2.7.2 Cas eucaryote

Nous hybridons les ARNm et les oligos ARN complémentaires en chauffant dix minutes à $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ (dépassant ainsi la température de fusion de ces oligos) puis dix minutes à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ puis en laissant reposer à température ambiante. Des oligo-fluorophores sont hybridés quelques codons après la position initiale du ribosome. L'accroche à la surface se fait par un oligonucléotide ARN ayant des bases modifiées $2' - O - allyl$. Cette modification le rend résistant à d'éventuelles nucléases et stabilise son appariement avec l'ARN complémentaire. Les deux extrémités de cet oligo sont couplées à une chaîne de trois biotines comme décrit dans [55].

Les ribosomes 80S ne peuvent normalement pas se fixer sur l'ARNm en l'absence de facteurs d'initiation. Cependant, le virus de la paralysie du grillon (Cricket Paralysis Virus noté CrPV) possède une séquence particulière sur ses ARNm pouvant recruter un ribosome eucaryote sans les facteurs d'initiation [40,56]. Cette séquence est un site d'entrée interne du ribosome (Internal Ribosome Entry Site noté IRES) formant une structure secondaire capable en présence d'ions Mg^{2+} de mimer l'ARNt initiateur. Une fois complexé, l'IRES est logé dans les sites E et P du ribosome en attente d'acides aminés à assembler.

L'initiation par IRES présente deux avantages principaux. Premièrement, nous injectons ARNt aminoacylés et facteurs d'élongation pour lancer la traduction. Pouvoir initier sans facteurs d'initiation permet de ne pas avoir à purifier ces facteurs pour les séparer de ceux d'élongation (tous étant présents dans le RRL). L'autre avantage est l'entrée interne du ribosome : celui-ci n'entre pas sur l'ARNm par son extrémité $5'$ mais directement sur l'IRES. Cela laisse le côté $5'$ libre pour y hybrider un oligo-biotine. L'accroche à la surface se faisant en $5'$ et la lecture de l'ARNm de $5'$ vers $3'$, le ribosome traduira en s'éloignant de la surface ce qui

2.8 Conclusion

l'expose à moins de contraintes stériques lors de la lecture de l'ARNm.

Pour lancer la traduction, nous injectons dans la cellule microfluidique une préparation de lysat de réticulocytes de lapins (Rabbit Reticulocyte Lysate noté RRL de Promega). Les réticulocytes sont les cellules précurseurs des globules rouges et contiennent les facteurs d'élongation et les acides aminés permettant la traduction.

Nous avons envisagé deux méthodes pour faire une expérience de contrôle sans traduction. La première consiste à ajouter aux solutions utilisées un antibiotique bloquant la traduction. L'antibiotique choisi est la cycloheximide (voire [57]) qui bloque la translocation en se substituant à l'ARNt dans le site A du ribosome. Cette méthode suit les standards de la recherche biologique où un contrôle idéal ne diffère de l'expérience que par l'ajout d'un élément bloquant la réaction observée.

La seconde méthode se base sur l'initiation non-canonique utilisée. Nous utilisons un ARNm similaire à celui de l'expérience à la notable exception de l'absence d'IRES. Les ribosomes étant mis en présence des ARNm sans facteurs d'initiation, l'initiation canonique ne peut avoir lieu. Le RRL utilisé lors de l'injection contient les ribosomes et les facteurs de traduction mais les ARNm de l'expérience ne sont pas coiffés⁷. De plus, l'extrémité 5' des ARNm est hybridée à l'oligo-biotine et se trouve donc immobilisée près de la surface ce qui la rend inaccessible.

2.8 Conclusion

Nous avons décrit la conception de l'expérience de mesure de la cinétique de traduction de ribosomes uniques. Nous avons décidé de ne modifier ni les ribosomes, ni les facteurs traductionnels, à la fois dans un souci de simplicité (le ribosome de lapin utilisé est beaucoup plus complexe que celui d'une bactérie) et pour éviter de dénaturer le processus. Le système rapporteur repose donc sur le marquage de l'ARNm par le biais de deux oligonucléotides marqués avec des fluorophores différents. Le ribosome est fixé initialement sur l'ARNm via une structure secondaire spécifique (IRES) et les éléments nécessaires à la traduction sont issus d'un extrait cellulaire. Lors de la traduction, le ribosome traduira la séquence sur laquelle sont hybridés les marqueurs fluorescents, les détachant de l'ARNm.

L'observation est faite avec un microscope de type TIRF développé au laboratoire. Nous pouvons ainsi imager des fluorophores uniques sur une surface en ayant un très faible bruit de fond. L'observation de plusieurs fluorophores en parallèle permet d'avoir une bonne statistique lors de l'analyse des données.

Notre montage optique se distingue par une synchronisation complète des différents éléments et par un dispositif de maintien de focus, critique lors de ce type d'expériences. Il permet en outre d'observer des fluorophores émettant à différentes longueurs d'onde sans avoir

7. Réaction post-transcriptionnelle d'ajout d'une coiffe à l'extrémité 5' des ARNm permettant le recrutement des ribosomes eucaryotes.

à refaire la mise au point à chaque nouvelle image. Des cellules microfluidiques nous permettent d'observer la surface pendant l'injection des extraits cellulaires marquant le début de la traduction.

Nous avons développé une chimie de surface dédiée, à base de polyéthylènes glycols pour fixer spécifiquement le système rapporteur étudié à la lamelle de microscope.

Enfin, nous avons optimisé les oligo-fluorophores pour avoir un bon compromis entre stabilité de l'hybridation à l'ARNm et facilité de détachement par le ribosome. Nous avons choisi des ATTOs, fluorophores peu volumineux et très photostables. Le suivi du départ de ces oligo-fluorophores permettra de mesurer la vitesse de traduction d'un ribosome unique.

Le chapitre suivant s'appliquera à montrer comment nous extrayons des séquences d'images enregistrées les instants de départ des fluorophores.

Traitement des images de molécules uniques

Nous avons vu au chapitre précédent qu'il était possible d'observer des fluorophores uniques immobilisés sur une surface de verre. Dans le cadre de notre expérience, la perte du signal de fluorescence témoigne de l'activité des ribosomes associés. Les informations pertinentes sont donc la position des fluorophores à un endroit donné, témoignant de la présence d'un ARNm marqué, et les instants de disparition de ces marqueurs, indiquant le passage du ribosome à un endroit donné de l'ARNm.

Dans ce chapitre nous décrirons la méthode utilisée pour détecter les fluorophores sur les premières images de la séquence puis la façon dont nous suivons chaque fluorophore au cours du temps. Nous détaillerons également la façon dont nous comparons les fluorophores de différentes couleurs pour obtenir des intervalles de temps entre deux départs sur un même système rapporteur.

3.1 Contraintes expérimentales

Le photoblanchiment

Observer des fluorophores uniques nous met face à des problèmes d'optimisation des temps d'acquisition. En effet, les fluorophores organiques utilisés ont à chaque cycle d'excitation / émission une probabilité de photoblanchir. Les fluorophores émettent donc un certain nombre de photons avant photoblanchiment selon une loi de probabilité exponentielle. Un unique fluorophore n'émet que quelques milliers de photons en moyenne. Autrement dit, à excitation constante, un fluorophore a une espérance de vie mesurée en secondes d'excitation. Par ailleurs, la détection d'un fluorophore sur une image n'est possible que si son temps d'exposition est suffisamment élevé. Le nombre d'images N_{img} est alors borné selon la formule suivante :

$$N_{img} \times t_{img} \leq t_{vie} \quad (3.1)$$

où t_{img} est le temps d'exposition pour une image (pendant lequel les fluorophores peuvent

photoblanchir) et t_{vie} l'espérance de la durée de vie d'un fluorophore avant photoblanchiment. Il est possible d'ajouter un facteur de sécurité à l'espérance de vie. En effet, une population de fluorophores sera partiellement photoblanchie après un temps d'excitation même inférieur à l'espérance de vie moyenne. Après le temps de vie moyen, un peu plus de la moitié des fluorophores auront blanchi, mais si l'on veut s'imposer un taux n de fluorophores non-blanchis en fin de film, il faut multiplier t_{vie} par $\ln(\frac{1}{n})$ dans l'inéquation (3.1). Le temps d'exposition par image dépend du rapport signal à bruit voulu et ne peut être réduit à volonté. Cela limite donc le nombre d'images par séquence d'acquisition.

La durée de l'expérience

Le nombre d'images par séquence d'acquisition est également relié à la durée de l'expérience T_{exp} et à l'intervalle de temps constant entre deux images Δt :

$$(N_{img} - 1) \times \Delta t = T_{exp} \quad (3.2)$$

Nous illustrons cette formule sur la figure 3.1.

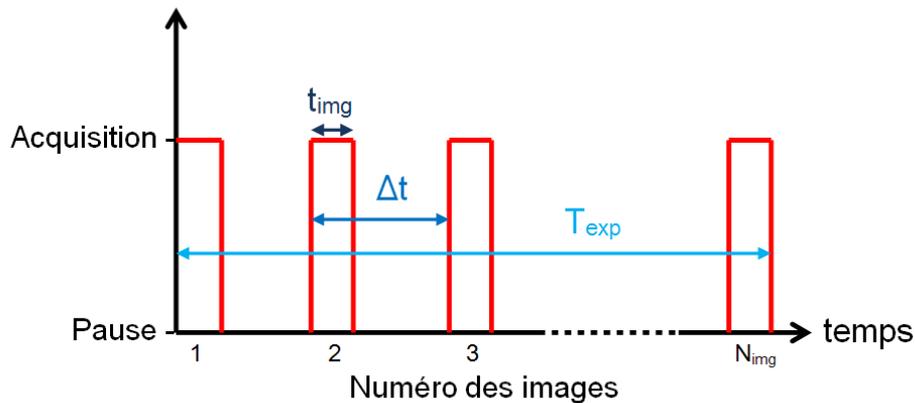


FIGURE 3.1 – Séquence d'acquisition de N_{img} images au cours d'un temps T_{exp} . L'intervalle de temps entre deux images est Δt et chaque image correspond à une acquisition de durée t_{img} .

T_{exp} est défini par le phénomène observé. Dans notre cas, il s'agit de quelques cycles d'élongation et nous estimons que trois minutes sont nécessaires et suffisantes pour observer l'essentiel de l'activité traductionnelle de surface. Le nombre d'images est alors proportionnel à la fréquence d'acquisition des images. De cette fréquence d'acquisition dépend la résolution temporelle de l'expérience. Une bonne résolution temporelle est donc obtenue en prenant un grand nombre d'images.

Le nombre d'images N_{img} fait donc l'objet d'un arbitrage. Plus ce nombre est grand,

3.2 Détection des particules

meilleure est la résolution temporelle car à T_{exp} fixé Δt diminue. N_{img} grandit au détriment soit du ratio signal sur bruit si t_{img} diminue, soit du nombre de fluorophores non photoblanchis si l'inégalité (3.1) n'est plus vérifiée. Plus le nombre d'images est faible, moins le photoblanchiment se fait sentir mais plus le pas d'échantillonnage est grand. Nous tenterons donc d'avoir un rapport signal à bruit suffisant pour obtenir des informations sur la traduction mais sans prendre trop de marge pour pouvoir gérer le photoblanchiment sur 50 images (dans certains cas, nous nous sommes autorisés des acquisitions de 100 ou 200 images).

Nous nous appliquons ici à analyser les images obtenues ayant un ratio signal sur bruit limité par ces autres contraintes pour en tirer une information sur les temps de résidence des fluorophores.

3.2 Détection des particules

La première information à obtenir d'une image ou d'une série d'images est le nombre de fluorophores détectés que l'on pourra étudier. Un exemple d'image obtenue est montré à la figure 3.2 où l'on excite des fluorophores rouges (ATTO 647N) avec un laser délivrant 15 *mW* à l'entrée du microscope pendant 100 *ms*. La surface excitée est contenue dans un carré de 100 μm de côté correspondant au champ imagé sur notre caméra.

Malgré nos efforts, nous constatons que l'excitation n'est pas parfaitement homogène sur la surface étudiée. Cela se devine au bruit de fond qui varie légèrement d'une zone à l'autre mais cela se trahit surtout par l'excitation inégale des fluorophores. Au centre de l'image, on distingue clairement les fluorophores, mais ils s'estompent lorsque l'on se rapproche des bords. Sur les bords de l'image, les fluorophores semblent absents ce qui n'est pas le cas car leur répartition à cette échelle est homogène sur la lamelle. L'homogénéité de la couverture de la surface par les fluorophores se vérifie simplement en translatant la lamelle par rapport à l'objectif à l'aide de la platine de micro-positionnement. Il est ici possible de compter à l'œil le nombre de points. Cependant une telle démarche est longue et dépend de l'observateur. Le temps passé devient prohibitif lorsqu'il s'agit d'étudier les séquences de 100 images qui constituent nos données.

Nous nous sommes donc appliqués à mettre au point un programme d'analyse d'image permettant dans un premier temps de compter et localiser le nombre de particules présentes sur une image telle que celle de la figure 3.2. Dans un second temps ce programme permet de comparer deux images prises dans des couleurs différentes afin d'y détecter d'éventuelles colocalisations entre fluorophores.

Tous les programmes présentés dans ce chapitre ont été réalisés sauf mention contraire à l'aide du logiciel de WaveMetrics IGOR Pro 6.22.

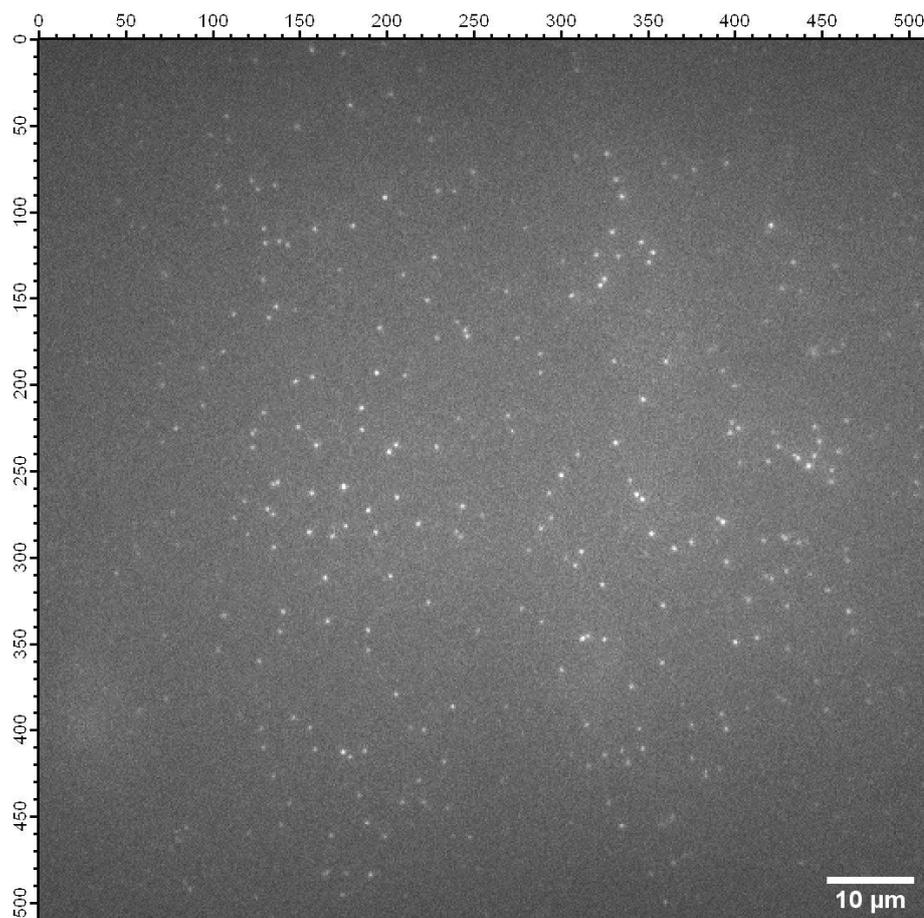


FIGURE 3.2 – Image d’ATTO 647N liés spécifiquement à une surface passivée. Le laser d’excitation rouge est réglé sur 15 mW et la durée d’acquisition est de 100 ms. La caméra utilisée (EMCCD, iXon, AndorTM) fait l’acquisition d’images carrées de 512 pixels de côté, les coordonnées en pixels sont indiquées sur cette image.

3.2.1 Critère de choix des paramètres de détection

Nous avons pour objectif de pouvoir compter des particules sur une surface. Ces particules peuvent être très visibles ou estompées jusqu’à être indétectables. Le but est de pouvoir détecter automatiquement le plus grand nombre de particules possible. En effet, l’un des avantages de la microscopie TIRF est de pouvoir observer plusieurs événements en parallèle. Cela nous est utile car nous souhaitons obtenir des informations de nature statistique ce qui nécessite un grand nombre de mesures. Nous cherchons donc à ne pas passer à côté d’événements présents dans nos données par insuffisance du traitement de ces données.

Cependant, il ne s’agit pas de détecter trop de particules. Si l’œil et le cerveau humain sont efficaces pour détecter les contrastes, il est tout de même possible pour un programme d’être encore plus performant. Nous n’avons pas souhaité dépasser les capacités humaines pour

3.2 Détection des particules

pouvoir vérifier rapidement les résultats obtenus par le programme. En effet, dans le cas d'un tel programme, développé pour les besoins spécifiques de cette expérience, nous sommes amenés à effectuer certaines modifications au cours du temps.

Tout d'abord, ce programme a fréquemment été amélioré. Au début de ces trois années de thèse, le laser bleu était le laser principal et délivrait un faisceau dont le profil d'intensité était quasiment gaussien. L'estimation du fond se faisait alors par une interpolation gaussienne de l'intensité lumineuse mesurée par la caméra. Avec l'achat de nouveaux lasers et l'utilisation plus fréquente de la diode laser rouge, cette partie du programme a dû être modifiée. En effet, le profil d'intensité du faisceau rouge est trop éloigné d'une gaussienne pour que cette méthode d'estimation du fond soit pertinente. Au cours de la première année de thèse, nous avons testé une méthode de suppression du fond par transformée de Fourier et élimination des basses fréquences. Malgré quelques oscillations parasites, cette méthode donnait d'assez bons résultats et a été utilisée pendant plusieurs mois. La comparaison ultérieure avec d'autres méthodes de filtrage plus efficaces nous a fait modifier cette procédure. Ces deux exemples illustrent l'évolution du programme au cours des trois dernières années. De nombreuses autres modifications plus ou moins importantes ont été apportées mais nous nous contenterons ici de détailler la dernière version en date.

D'autre part, nous avons de temps à autre modifié les conditions de l'expérience. Nous avons par exemple testé différents fluorophores (nanocristaux semi-conducteurs, cyanines, bodipy-FL, Alexa, ATTO) dont certains possèdent des propriétés photophysiques relativement éloignées. Nous avons également modifié l'intensité d'excitation et le temps d'intégration lors de l'acquisition d'une image ainsi que l'angle d'incidence du faisceau en réflexion totale. Ces variations ont mené à des images différentes sur les niveaux d'intensité, de bruit ou de contraste. Il était alors souhaitable de modifier les paramètres du programme et en particulier les niveaux de seuillage. Il est possible de modifier d'autres paramètres tels la taille maximale des particules ou la taille de la zone d'observation.

Nous voyons donc que le programme de traitement des images est modifié ce qui nécessite de pouvoir vérifier son efficacité. Pour cela, nous comparons la position des points détectés avec les images brutes et les instants des disparitions avec les séquences d'images. Pour la détection des points, nous pouvons compter manuellement le nombre de fluorophores sur une image. Plus simplement, nous pouvons superposer l'image brute et les points détectés, cela permet de repérer facilement les points où l'on n'est pas satisfait du programme.

Si l'image brute et les particules détectées ne correspondent pas, nous retouchons les paramètres car le programme n'est manifestement pas efficace. Si au contraire nous validons les résultats du programme sur une image, nous vérifions sa stabilité en le testant sur d'autres images. Nous choisissons généralement des images présentant soit de nombreux fluorophores soit très peu afin de vérifier que le programme est insensible au nombre de particules à traiter.

Cependant, notre programme de détection peut, avec un seuil bas, détecter plus de fluo-

rophores que l'œil d'un doctorant. Le programme peut être capable de placer des points dans les zones faiblement excitées là où l'on ne voit que du bruit. Faire une moyenne d'intensité sur plusieurs images consécutives d'une même zone permet d'augmenter le ratio signal sur bruit. Les points suggérés par le programme deviennent alors visibles. Comme nous souhaitons effectuer des vérifications sur plusieurs images, nous avons besoin de pouvoir vérifier rapidement la validité des points détectés en repartant des images brutes. Nous imposons donc un seuil assez haut au programme lors de la détection des particules de sorte à avoir la même efficacité de détection que l'œil humain. Cela permet en outre de conserver une marge par rapport au niveau de bruit.

D'autre part, nous verrons par la suite qu'il faudra détecter les instants de départs des particules ce qui est plus aisé lorsque les particules en question sont bien visibles (d'intensité bien supérieure au bruit de fond local). L'étape de détection doit donc être assez sévère pour ne considérer que les particules ayant un ratio signal sur bruit raisonnable.

La détection de particules se fait par seuillage de l'image, l'idée intuitive étant que seules les particules brillantes dépassent un certain seuil de signal. Cependant, nous avons vu que toutes n'ont pas la même intensité. De plus, l'intensité moyenne du fond est importante au centre de l'image et peut rivaliser avec l'intensité des particules sur les bords. Pourtant ces dernières sont bien visibles car situées dans une zone où l'intensité moyenne est faible et le contraste est suffisant. Nous cherchons donc à prendre en compte un fond variable sur l'image.

3.2.2 Estimation du bruit de fond

Nous avons plusieurs méthodes pour estimer le fond de l'image. Cette hétérogénéité vient du fait que le faisceau laser ne couvre pas la zone d'observation de façon uniforme. Les fluorophores sont plus excités et émettent plus au centre de l'image mais le bruit de fond, provenant de la fluorescence résiduelle du verre ou encore d'impuretés, dépend également de l'excitation (plus forte au centre).

Estimation du fond par interpolation gaussienne :

Une méthode simple pour estimer l'intensité d'excitation est d'interpoler l'image par une gaussienne à deux dimensions. La présence de points, s'il n'y en a pas trop (moins de 2000), ne nuit pas à l'interpolation ce qui permet d'obtenir une gaussienne de taille caractéristique 100 à 200 pixels (correspondant à la zone d'excitation du laser). Cependant, cette méthode n'est vraiment efficace que pour un faisceau parfaitement gaussien. Dans notre cas, le profil du faisceau est suffisamment différent d'une gaussienne pour que cette méthode ne soit pas la plus efficace.

3.2 Détection des particules

Estimation du fond par moyenne locale :

Nous préférons filtrer l'image en moyennant les pixels avec leur voisinage ce qui ne modifie pas sensiblement les valeurs du fond mais dilue celles des fluorophores en les rendant négligeables. La figure 3.3 A montre l'image 3.2 dont les pixels ont été moyennés sur un carré de côté sept pixels.¹ Cela donne une impression de pointillisme mais l'échelle de niveaux de gris est bien moins grande que sur l'image initiale. Les petites taches claires ne présentent donc qu'une variation d'intensité négligeable avec leur voisinage même si cette variation est visible à l'œil avec l'échelle de niveaux de gris choisie. Cela dessine une carte donnant une bonne approximation de l'intensité d'excitation laser. La figure 3.3 B montre le résultat après une convolution par une gaussienne de largeur 50 pixels (application d'un flou). Il s'agit de faire une moyenne de chaque pixel avec ses voisins en pondérant par une gaussienne centrée sur ce pixel. Le résultat est moins haché mais on perd un peu de contraste entre les valeurs extrêmes. De plus, la durée du traitement informatique des images est plus courte avec une simple moyenne sur un voisinage de taille raisonnable (ce temps de traitement est proportionnel à l'aire du voisinage).

Estimation du fond par rolling-ball :

Le principe est de considérer l'image comme une surface sous laquelle passerait une sphère d'un rayon donné. La sphère serait incapable d'entrer dans les pics correspondants aux fluorophores. Le volume couvert par la sphère est alors considéré comme un fond dont les variations spatiales sont lentes et qui peut être retranché. La figure 3.4 illustre ce principe en 1D. Nous utilisons l'équation (3.3) pour retrancher ce fond :

$$v_n = v_n - \max_{i \in V_n} (\min_{j \in V_i} (v_j)) \quad (3.3)$$

où, avec $k \in \{n, i, j\}$, v_k est la valeur du pixel k et V_k est le voisinage du pixel k (dans notre cas il s'agit des pixels situés à une distance inférieure à deux du pixel k , soit un cercle de diamètre 5 pixels).

Cette méthode permet comme la précédente d'estimer un fond dont la forme n'est pas connue. Deux différences sont toutefois à noter : le fond obtenu avec un rolling-ball tend à suivre les minimums d'intensité tandis que le moyennage par convolution tend naturellement à donner la moyenne du fond. L'écart entre les deux est donc de l'ordre de

1. Cela peut être décrit mathématiquement par une convolution de l'image avec une fonction porte 2D de largeur sept pixels.

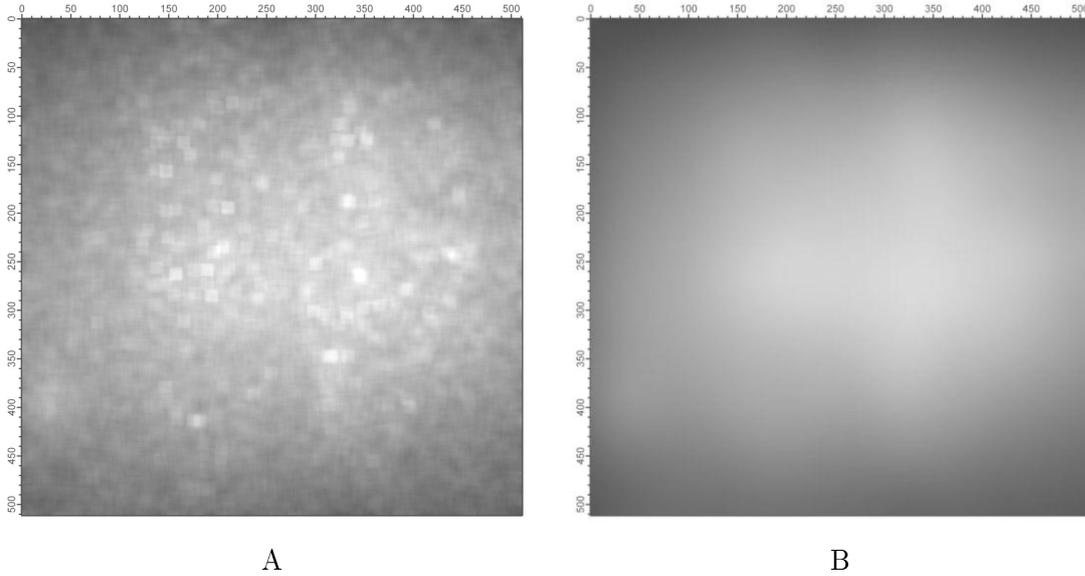


FIGURE 3.3 – A : Approximation de l'intensité d'excitation par moyenne sur un voisinage de 49 pixels. Ce type d'image suffit à approximer le niveau d'excitation pour pouvoir étudier les particules en tenant compte de leur position dans l'image. B : Forme de l'excitation laser obtenue par filtrage gaussien (largeur du filtre : 50 pixels). On ne devine plus la présence de particules mais les valeurs entre le centre et les bords sont moins contrastées. Dans les deux cas, le contraste est plus marqué que sur l'image brute 3.2 car les particules étant lissées, il n'y a plus de grandes valeurs d'intensités ce qui permet d'étaler de légères variations d'intensité sur plus de niveaux de gris.

grandeur des fluctuations locales du fond.

L'autre différence est la prise en compte des points de forte intensité (les fluorophores). La méthode de rolling-ball est censée ignorer ces variations rapides d'intensité si ce n'est une diminution du nombre de minima locaux ayant des chances d'augmenter très légèrement la valeur du fond près des fluorophores. La méthode de moyennage prend en compte toute l'intensité des fluorophores en la diluant dans son voisinage. Le fond est alors quelque peu augmenté aux alentours des fluorophores. En corrigeant l'image par ce fond, cela pourrait presque être considéré comme bénéfique car le voisinage des fluorophores se retrouve avec une faible intensité. Cela permet d'isoler les fluorophores et diminue le risque de voir deux fluorophores voisins être considérés comme une unique particule.

Nous utiliserons les deux dernière estimations du fond. En notant $D(x, y)$ les valeurs brutes des pixels, le fond estimé par moyenne locale sera noté $F_{ml}[D(x, y)]$ et celui obtenu par rolling-ball $F_{rb}[D(x, y)]$.

3.2 Détection des particules

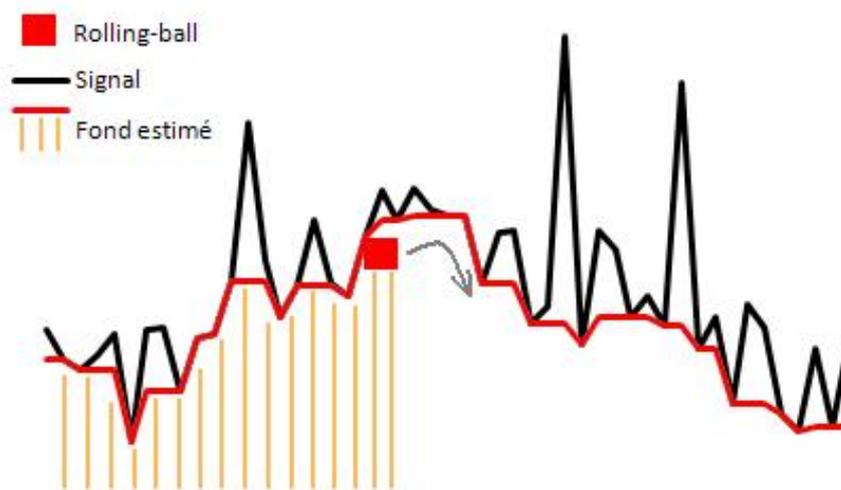


FIGURE 3.4 – Schéma de principe de la méthode de rolling-ball appliquée à une fonction à une dimension. Un motif (carré rouge) est déplacé le long de la courbe en prenant la valeur la plus élevée possible tout en ne dépassant la courbe par aucun des points du motif. La surface ainsi balayée est considérée comme étant le fond de l'image que l'on pourra retrancher au signal. Dans le cas d'une image, on étend ce principe à deux dimensions.

3.2.3 Seuillage de l'image corrigée

Nous voulons pouvoir appliquer un seuil à nos images afin de considérer comme particule tout élément supérieur au seuil. Or ces images possèdent un fond additif variable dont la valeur dépasse parfois celle des fluorophores les moins excités. De plus, le fond n'est pas constant et nous pouvons considérer qu'il est soumis à des fluctuations gaussiennes d'amplitude proportionnelle à la racine carrée de l'intensité lumineuse. Nous souhaitons d'une part avoir le même niveau de fluctuations sur l'image entière et d'autre part retrancher le fond pour pouvoir placer un seuil au dessus des fluctuations.

Nous estimons les fluctuations comme étant proportionnelles à la racine carrée de l'intensité d'excitation. Nous considérons que l'excitation est proportionnelle à $F_{ml}[D(x, y)]$, nous renormons donc une image initiale en la divisant par $\sqrt{F_{ml}[D(x, y)]}$. Cette méthode d'estimation du fond donne en effet un résultat proche de l'intensité lumineuse moyenne contrairement à $F_{rb}[D(x, y)]$ qui, en suivant les minima, s'approche de cette intensité moins les fluctuations. De plus, $F_{ml}[D(x, y)]$ n'est jamais nul ce qui est moins certain pour $F_{rb}[D(x, y)]$. Une éventuelle division par zéro n'est alors pas à craindre. Cela nous mène à l'image 3.5 A où l'on voit que si les écart-types sont uniformisés, il reste un fond moyen local (dont la valeur moyenne doit être la racine du précédent fond) qui s'ajoute aux intensités du centre de l'image. Le fait d'avoir des fluctuations comparables sur l'ensemble de l'image permettra de fixer un seuil situé bien au dessus de l'écart-type des variations d'intensité du bruit. Avant d'appliquer le seuillage, il faut supprimer le fond additif restant.

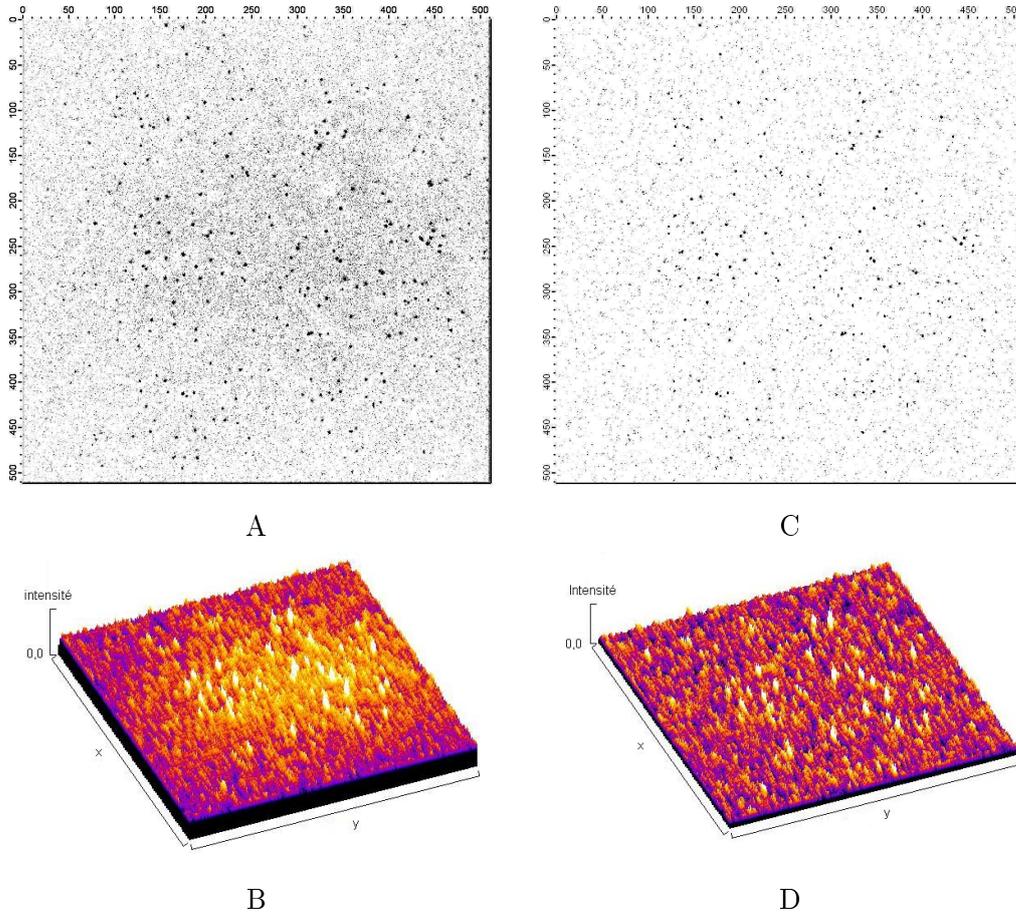


FIGURE 3.5 – Représentations 2D (A) et 3D (B) d'une image dont la variance du bruit de fond a été uniformisée à l'aide des valeurs obtenues à la figure 3.3 A (moyenne locale du fond). Représentation 2D (C) et 3D (D) de l'image précédente après traitement du type rolling-ball. Le fond moyen est retranché, il ne reste alors plus que les fluctuations du fond rendues homogènes à l'étape précédente ainsi que les fluorophores. En particulier, le milieu de l'image n'est pas plus élevé que les bords. Les représentations A et C sont en couleurs inversées par rapport à l'image originale (figure 3.2).

Nous avons après cette étape des données $D_1(x, y)$ en cours de traitement :

$$D_1(x, y) = \frac{D(x, y)}{\sqrt{F_{ml}[D(x, y)]}} \quad (3.4)$$

Pour ôter le fond restant et porter la moyenne locale du bruit à une valeur identique sur toute l'image, nous appliquons le traitement de type rolling-ball et obtenons $F_{rb}[D_1(x, y)]$. Comme nous l'avons vu sur la figure 3.3 A, notre traitement par convolution fait une moyenne sur une zone de 49 pixels et traite le fond moins finement que le traitement par rolling-ball où l'on peut choisir un motif de rayon 2 pixels seulement. Nous retranchons donc à $D_1(x, y)$

3.2 Détection des particules

son fond $F_{rb}[D_1(x, y)]$. Le résultat est montré sur l'image 3.5 C. Nous avons alors des données traitées $D_2(x, y)$:

$$D_2(x, y) = D_1(x, y) - F_{rb}[D_1(x, y)] \quad (3.5)$$

$$D_2(x, y) = \frac{D(x, y)}{\sqrt{F_{ml}[D(x, y)]}} - F_{rb}\left[\frac{D(x, y)}{\sqrt{F_{ml}[D(x, y)]}}\right] \quad (3.6)$$

À ce niveau, un seuillage global sur l'image est possible. Les figures 3.5 B et D sont une autre représentation des figures A et C où l'on se rend mieux compte de la modification effectuée entre les deux images.

Une fois ces opérations effectuées, on peut définir un seuil au delà duquel on considère qu'un fluorophore est présent. L'image 3.6 représente en noir les pixels dont la valeur dépasse le seuil. Le seuil a été choisi relativement bas pour pouvoir repérer la majorité des fluorophores.

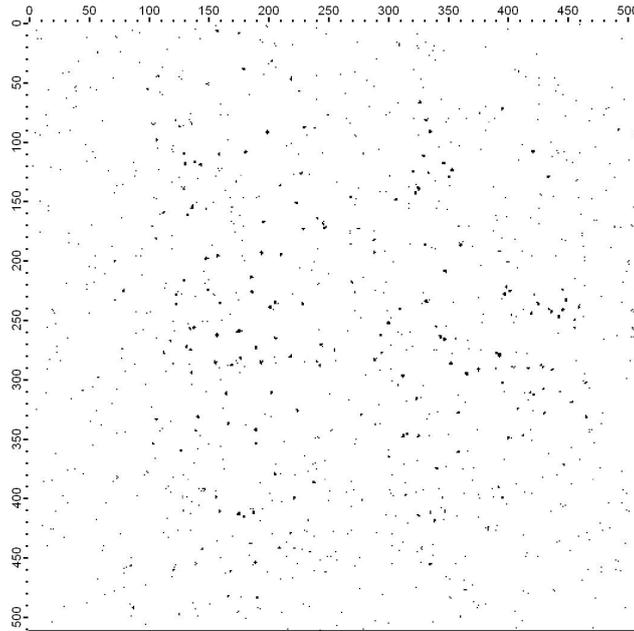


FIGURE 3.6 – Image 3.2 après traitement et seuillage. Les particules sont quasiment toutes détectées grâce à un seuil relativement bas mais cela fait apparaître quelques faux positifs.

Le fait de choisir un seuil bas permet de ne pas rater trop de fluorophores mais sur les 262 144 pixels de l'image soumis à un bruit poissonnien, certains peuvent dépasser le seuil sans fluorophore associé. On peut avoir typiquement entre 100 et 1000 points correspondant à des faux positifs (dépendant du seuil choisi)². Nous avons en moyenne environ 500 faux positifs par image, ce qui fait par pixel une chance sur 500 de donner un faux positif, .

2. Nous appelons faux positif un point détecté là où en réalité il n'y a rien. Un faux négatif sera un fluorophore présent à la surface mais non détecté par le programme.

Pour s'affranchir de ce problème, on compare cette image avec une autre de la même zone prise quelques instants après. Comme nous travaillons généralement avec des films, il suffit de comparer les deux premières images de la série. Ne sont conservés que les pixels dépassant le seuil sur les deux images. Les fluorophores fixés sur la lamelle se retrouveront sur les mêmes pixels dans les deux images et seront conservés. On a vu qu'un pixel avait statistiquement de l'ordre d'une chance sur 500 de donner un faux positif à cause de la variabilité du bruit de fond. Il y a alors pour un pixel une chance sur 500^2 de donner un faux positif sur deux images consécutives. Vu le nombre de pixels d'une image, on se retrouve avec un nombre de faux positifs de l'ordre de l'unité sur toute l'image, ce qui est négligeable et ne perturbera pas les mesures statistiques effectuées sur les fluorophores. L'image 3.7 montre les pixels conservés après comparaison de deux images différentes de la même distribution de fluorophores.

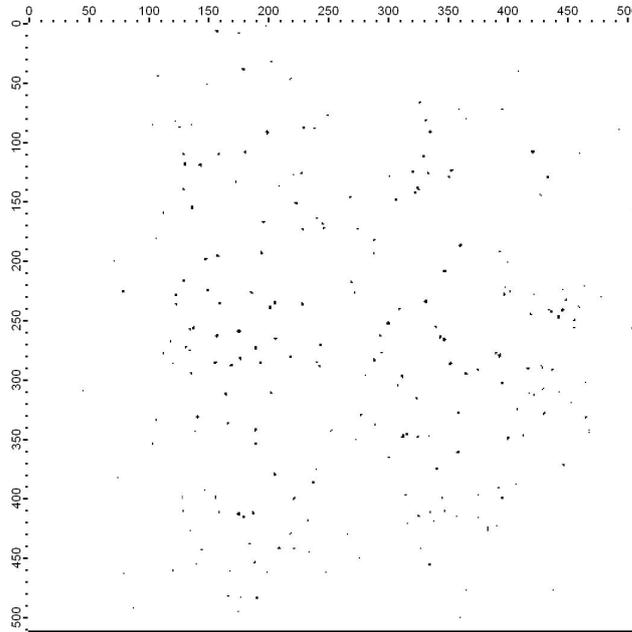


FIGURE 3.7 – La comparaison entre les deux premières images d'une séquence d'acquisition après seuillage (ici l'image 3.6 et l'image suivante du film dont elle est extraite) permet d'éliminer la grande majorité des faux positifs.

3.2.4 Détection et sélection des particules d'intérêt

Une fonction de détection des particules est ensuite appliquée pour dénombrer et localiser les fluorophores. On ne retient pas les particules dont la taille est supérieure à neuf pixels. En effet, la tâche de diffraction correspondant à une molécule unique couvre $\frac{1,22\lambda}{O.N.}$ (avec λ la longueur d'onde et $O.N.$ l'ouverture numérique de l'objectif), soit entre 450 et 570 nm selon la longueur d'onde centrale d'émission. De leur côté, les pixels collectent les photons provenant d'un carré de 207 nm de côté dans le plan d'observation. Un fluorophore peut tout à fait exciter

3.2 Détection des particules

neuf pixels. Généralement, avec le niveau de seuil choisi, la taille des fluorophores ne dépasse pas six pixels, les pixels voisins étant supérieurs au fond mais pas suffisamment pour passer le seuil.

3.2.5 Colocalisations

Si nous savons dénombrer les fluorophores présents sur une zone excitée, il est important de pouvoir leur attribuer une position pour pouvoir déterminer s'ils sont colocalisés avec d'autres fluorophores. Cela nous sera utile pour étudier nos systèmes munis de deux fluorophores différents (définis à la section 2.1).

Une méthode possible pour déterminer si deux fluorophores différents sont associés à un même système biologique est d'utiliser une technique de super-localisation. Ces techniques peuvent localiser une molécule à quelques nanomètres près comme par exemple dans [58, 59]. Deux fluorophores situés à quelques nanomètres l'un de l'autre sont donc vraisemblablement liés biologiquement.

Avec notre montage, il serait possible d'estimer la position exacte d'un fluorophore en comparant entre elles les valeurs d'intensité des pixels qu'il éclaire. Deux pixels éclairés avec la même intensité sont la marque d'un fluorophore situé à la limite entre ces deux pixels, un pixel intense entouré de deux pixels plus faible de même valeur traduit un fluorophore centré. Une interpolation par la figure de diffraction théorique permet de définir les positions intermédiaires. Cette méthode est limitée par le bruit modifiant les valeurs des pixels étudiés, une meilleure précision est alors obtenue en augmentant la durée d'acquisition ou la puissance d'excitation.

Ceci dit, cette méthode demande un bon ratio signal sur bruit pour obtenir une information pas forcément indispensable. En effet, nous cherchons simplement à déterminer si deux fluorophores sont liés au même ARNm. Pour cela, nous nous contentons de regarder les colocalisations entre fluorophores en détectant les fluorophores dont les pixels se recouvrent. Comme environ un pixel sur 500 est marqué, les chances pour chaque fluorophore de colocaliser sans raison avec un autre d'une autre couleur sont d'environ une sur 500. Travaillant avec un millier de fluorophores par image, nous pouvons espérer avoir moins d'une dizaine de colocalisations fortuites.

En pratique, deux images de la même zone sont légèrement translatées l'une par rapport à l'autre. Ce décalage peut venir du changement de filtre d'émission, les filtres étant placés dans une roue motorisée. Une différence d'épaisseur ou une légère inclinaison pourrait être la cause de cet écart. Nous pouvons également noter que les acquisitions se font à deux longueurs d'onde différentes, ce qui peut modifier le trajet optique entre la lamelle et la caméra. Nous compensons ce décalage par un prétraitement effectué sous ImageJ, mais nous ne pouvons effectuer de translation que d'un nombre entier de pixels sous peine d'étaler le signal. Nous nous sommes donc assurés que le système de détection des colocalisations était suffisamment souple pour associer deux fluorophores situés jusqu'à un pixel de distance l'un de l'autre.

Nous avons vérifié quel était le taux de colocalisation dû au hasard en injectant sur une surface deux fluorophores différents chacun lié à une biotine. On observe alors un millier de points de chaque couleur mais l'on ne constate jamais plus de deux ou trois colocalisations. Nous en concluons que la présence abondante de colocalisations ne peut être fortuite et correspond à des interactions moléculaires.

Pour tester le cas où les fluorophores doivent colocaliser, nous avons hybridé deux oligos-fluorophores sur un même ARNm biotinylé avant d'injecter sur la surface. Pour autant de points visibles, nous avons pu atteindre des taux de colocalisation élevés, jusqu'à 80 %. Lors des expériences avec deux fluorophores distincts, nous travaillons généralement avec un taux de colocalisation situé entre 60 et 80 %.

Pour augmenter le taux de colocalisation, il faudrait augmenter le nombre d'oligos par rapport au nombre d'ARNm. Or, pour travailler en molécule unique, nous devons avoir une concentration en ARNm suffisante pour pouvoir en fixer au moins une centaine à la surface (typiquement une concentration supérieure à 500 pM) mais également avoir une concentration en solution faible en fluorophores pour ne pas avoir un bruit de fond trop élevé. Si l'onde évanescente n'éclaire qu'une centaine de nanomètres en profondeur et que les fluorophores diffusant en solution ne restent pas suffisamment longtemps en place pour marquer un pixel, une concentration élevée implique une fluorescence moyenne de la solution élevée. Cette concentration limite est empirique. Elle dépend de l'efficacité des fluorophores ainsi que du réglage de l'onde évanescente. Dans nos expériences, nous nous imposons généralement de ne pas dépasser 10 nM et cherchons à avoir une concentration de travail vers 2 nM . Avoir une concentration en fluorophores élevée pourrait également mener à un dépôt non-spécifique sur la surface.

L'image 3.8 montre deux images prises sur la même zone de la lamelle dans deux couleurs différentes. Les temps d'exposition sont de 1 seconde pour avoir un bon contraste. L'échantillon observé correspond à un ARNm hybridé à deux oligos-ATTO de couleurs différentes. Nous constatons que la majorité des points se retrouvent présents dans les deux couleurs ce qui dénote une bonne efficacité d'hybridation.

3.3 Déterminer l'instant de disparition d'une particule

Dans nos expériences, nous cherchons à connaître l'instant de départ de chaque fluorophore avec une bonne précision. Nous avons vu qu'il était possible de repérer un fluorophore en s'appuyant sur deux images consécutives. Dans ce cas, on peut s'autoriser un certain nombre de faux négatifs, c'est à dire ignorer les points les moins brillants. Cela ne fait que diminuer la taille de l'échantillon étudié. En revanche, pour déterminer le temps de résidence des fluorophores, il faut déterminer si le fluorophore est présent ou non sur une centaine d'images. Si l'on cherche image par image à savoir si un fluorophore est toujours présent, il faut appliquer le programme de détection des fluorophores sur toutes les images de la séquence. Cela multiplie les risques de

3.3 Déterminer l'instant de disparition d'une particule

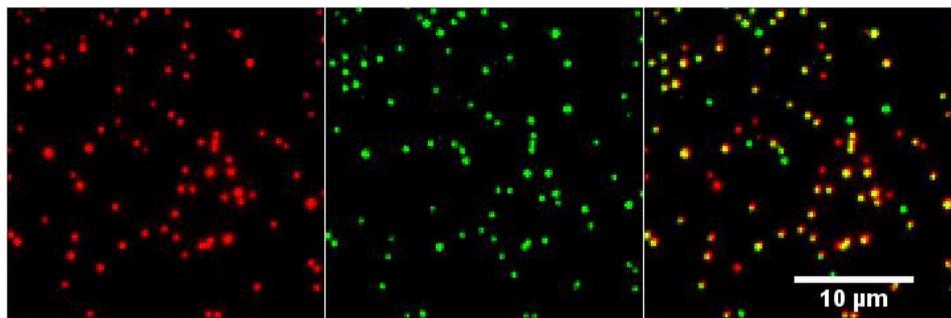


FIGURE 3.8 – Exemple de surface sur laquelle deux fluorophores différents (fausses couleurs) sont colocalisés. Une colocalisation correspond à un écart spatial de moins d'un pixel. Ici, avec moins de 100 points par couleur et plus de 10^4 pixels, une distribution aléatoire donnerait pour chaque point moins d'une chance sur 100 de colocaliser avec un fluorophore de couleur différente.

faux positifs et négatifs mais cela est compensé par la continuité temporelle de la présence des fluorophores : un fluorophore présent à un instant donné a de très fortes chances d'être présent au suivant. De plus, les fluorophores sont immobiles et on peut se concentrer sur les évolutions temporelles des intensités à la position de chaque fluorophore déterminée précédemment.

Nous cherchons à observer des fluorophores présents sur une certaine durée à partir du début du film. Ces fluorophores peuvent éventuellement disparaître en une étape³ et doivent alors être absents jusqu'à la fin du film.

3.3.1 Traces temporelles

Après avoir détecté la position des particules sur les deux premières images de la séquence, nous déterminons les pixels correspondant à chaque particule et nous suivons l'évolution de la valeur moyenne de ces pixels au cours du temps. Nous avons expérimenté différentes méthodes pour définir l'instant de départ d'un fluorophore avant de vérifier si les résultats proposés correspondaient bien aux résultats que l'on souhaitait obtenir pour un ensemble de traces temporelles témoins. La méthode suivante est celle qui, jusqu'à présent, nous a donné les résultats les plus satisfaisants.

Les fluorophores étant fixés à la surface, l'intensité des pixels où l'on a détecté un fluorophore en début de film correspond à l'intensité émise par le fluorophore au cours du temps. Ce niveau d'intensité nous permettra de décider de l'état du fluorophore, présent ou absent/éteint. Nous nous attendons à deux cas de figures possibles. Soit le fluorophore reste présent jusqu'à la fin du film, soit il disparaît en cours d'expérience. La figure 3.9 présente des traces temporelles issues d'une séquence d'images brutes.

Malheureusement, nous ne rencontrons pas uniquement ces deux types de courbes. Nous

3. Une disparition en deux étapes témoignerait de la présence de deux fluorophores.

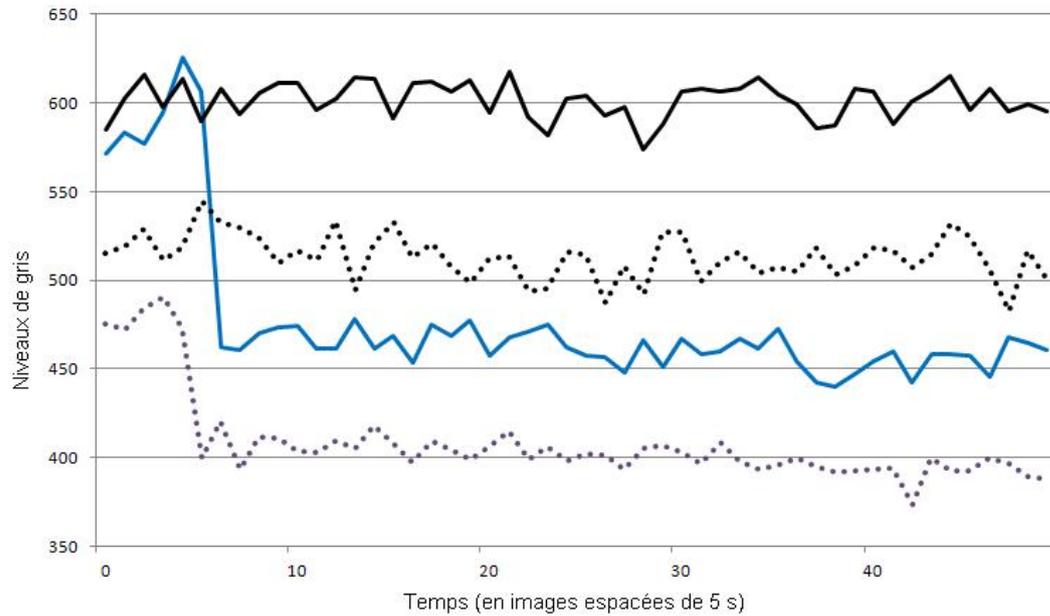


FIGURE 3.9 – Traces temporelles de quatre particules détectées au cours d'une séquence d'images. Les valeurs correspondent à la moyenne des intensités effectuée sur une zone de douze pixels (pour cette figure) autour de la position du fluorophore. Les courbes pleines sont relatives à des fluorophores détectés au centre de l'image, là où l'intensité d'excitation est maximale. Les courbes en pointillé proviennent de fluorophores excentrés et moins excités. Deux fluorophores subissent une disparition mais les deux autres restent présents jusqu'à la fin du film.

pouvons observer des traces temporelles non-canoniques ayant des comportements variés dont nous donnons quelques exemples sur la figure 3.10. Ces traces décrivent certains cas singuliers où les fluorophores ne sont ni présents jusqu'à la fin de la séquence, ni ne disparaissent en une étape bien marquée.

Nous ne souhaitons pas prendre en compte les fluorophores qui clignotent car cela nous empêche de placer leur instant de disparition avec précision et même d'être certain qu'il y a bien eu disparition et pas seulement une phase sombre en fin de film.

Nous voulons aussi ignorer les cas où les traces temporelles présentent plus de deux paliers, ce qui correspond à plusieurs fluorophores situés au même endroit.

Cependant, nous pouvons voir que le signal est bruité et il peut être difficile de discriminer entre ces différents cas. Le risque est de supprimer la majorité des fluorophores ou de favoriser un cas de figure par rapport aux autres ce qui pourrait modifier les données. Enfin, lorsque nous travaillons avec le RRL, son arrivée dans la cellule augmente le fond de fluorescence sur quelques images ce qui ne doit pas créer de faux départs ou d'éliminations abusives de fluorophores.

3.3 Déterminer l'instant de disparition d'une particule

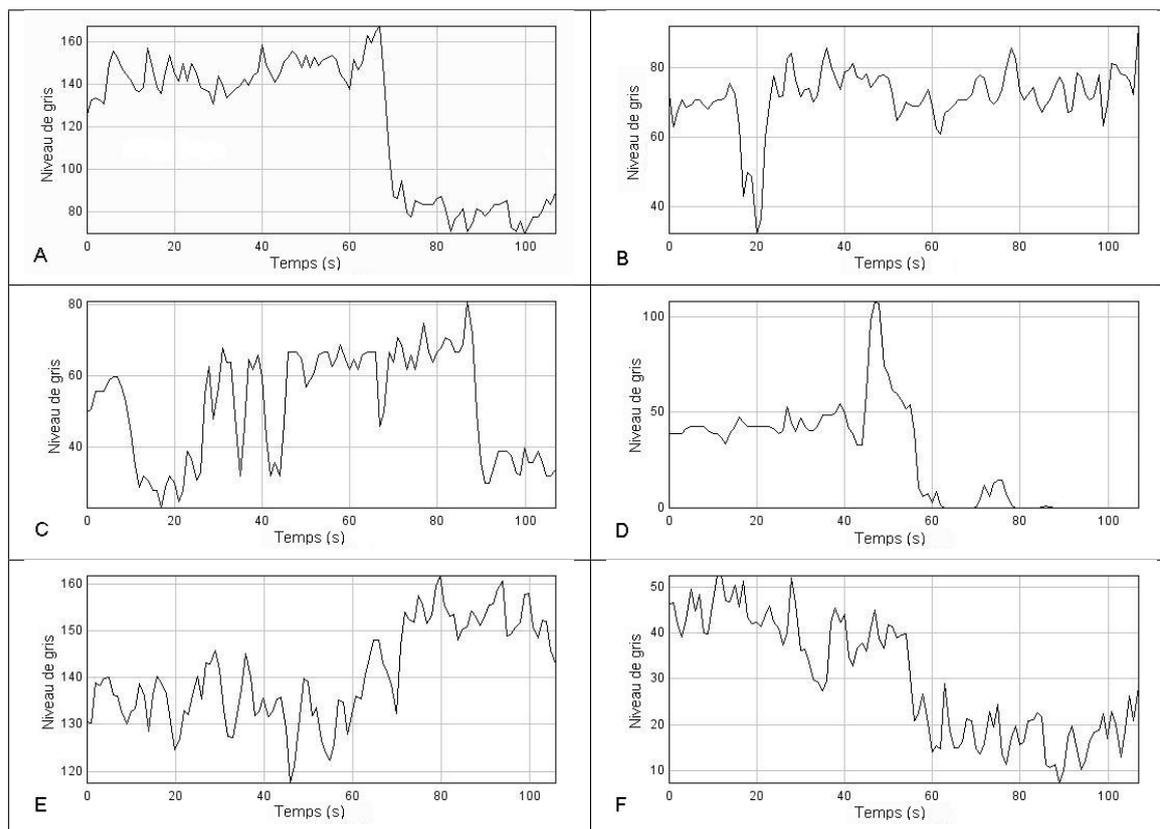


FIGURE 3.10 – Trace temporelle de l'intensité correspondant à un fluorophore sur une centaine d'images. Les niveaux de gris correspondent à l'intensité lumineuse moyenne d'un groupe de pixels et peuvent varier entre deux fluorophores situés à différents endroits de la zone d'observation.

A : Courbe canonique, un fluorophore présent au début disparaît de façon franche un peu avant 70 s.

B : Courbe où un fluorophore disparaît temporairement. La réapparition peut être la fin d'un clignotement lent du fluorophore ou encore une réhybridation spontanée après passage du ribosome.

C : Courbe montrant un fluorophore clignotant.

D : Courbe d'un fluorophore possédant deux paliers. On trouve également le cas où la courbe débute sur un palier haut avant de passer à un intermédiaire puis un bas. Cela peut s'expliquer par la présence de deux fluorophores voisins (moins d'un pixel d'écart).

E : Courbe où l'on a bien deux paliers et une marche mais où le palier final est plus élevé que l'initial.

F : Courbe décroissante qui ne possède pas de marche franche ou plusieurs instants d'extinction possibles.

Nous avons pris le parti d'éliminer tous les cas non-canoniques de l'analyse.

3.3.2 Tri des fluorophores selon leurs comportements

Nous avons donc trois populations que nous allons tenter de séparer.

- La première est constituée des fluorophores présents du début à la fin de la séquence.
- La seconde regroupe les fluorophores qui disparaissent proprement en une étape.
- La troisième rassemble toutes les autres situations non-canoniques que nous souhaitons éliminer de l'étude.

La proportion de la troisième population sur l'ensemble des fluorophores peut varier selon la séquence étudiée. Elle peut être importante si les fluorophores utilisés tendent à clignoter ou si les systèmes biologiques s'agrègent en formant des groupes de plusieurs fluorophores. Une séquence d'images de mauvaise qualité subissant par exemple une perte progressive de la mise au point ou encore une dérive spatiale latérale de l'échantillon possèdera un taux important de traces temporelles pathologiques. Habituellement, nous pouvons nous attendre à avoir de 5 à 20 % de cas non-canoniques sur une séquence d'images.

Nous commençons par appliquer le programme de détection des particules aux dernière et avant-dernière images de la séquence. Si des particules sont détectées aux mêmes endroits qu'au début, nous considérons que ce sont des fluorophores qui restent présents tout au long de l'acquisition. Cela les classe soit dans la première population soit dans la troisième.

Pour vérifier si le fluorophore est bien présent du début à la fin et ne présente pas un comportement trop étrange, nous étudions l'autocorrélation de la trace temporelle. En effet, indépendamment du niveau moyen d'intensité du fluorophore, les variations d'intensité d'une image à la suivante doivent être indépendantes de l'instant d'observation. Ce n'est pas le cas si la trace temporelle présente plusieurs plateaux d'intensité ou si l'intensité moyenne varie au cours du temps. En effet, deux instants consécutifs ont plus de chances d'appartenir au même plateau d'intensité, ce qui crée une corrélation entre les niveaux d'intensité du fluorophore d'une image et ceux des images précédentes et suivantes.

Soit $S_0(n)$ le signal (évolution temporelle de l'intensité d'un fluorophore à l'image n) et $S_1(n)$ le même signal translaté temporellement d'une image ($S_1(n) = S_0(n + 1)$). Pour un nombre d'images suffisamment grand, ce qui est le cas avec nos séquences d'au moins 50 images, S_0 et S_1 possèdent la même moyenne \bar{S} et le même écart-type σ car les effets de bords sont négligeables. Le coefficient de corrélation *corr.* entre S_0 et S_1 est alors égal au rapport de leur covariance sur leur variance σ^2 :

$$corr. = \frac{\sum_{i=1}^{N_{img}} (S_0(i) - \bar{S}) \cdot (S_1(i) - \bar{S})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{N_{img}} (S_0(i) - \bar{S})^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^{N_{img}} (S_1(i) - \bar{S})^2}} \quad (3.7)$$

$$corr. = \frac{\sum_{i=1}^{N_{img}} (S_0(i) - \bar{S}) \cdot (S_1(i) - \bar{S})}{\sigma^2} \quad (3.8)$$

3.3 Déterminer l'instant de disparition d'une particule

Lorsque ce coefficient tend vers 1, les deux signaux sont corrélés ce qui trahit la présence de variations d'intensité au cours du temps autres que celles dues au bruit⁴. Il tend vers 0 lorsque l'intensité sur chaque image est décorrélée de celles des images précédente et suivante.

L'image 3.11 donne la valeur de ce coefficient de corrélation *corr.* pour trois courbes différentes (courbes fictives générées pour l'exemple). Nous décidons de considérer que lorsque ce rapport dépasse un seuil de valeur $\frac{2}{3}$, la courbe subit trop de variations pour être considérée comme canonique.

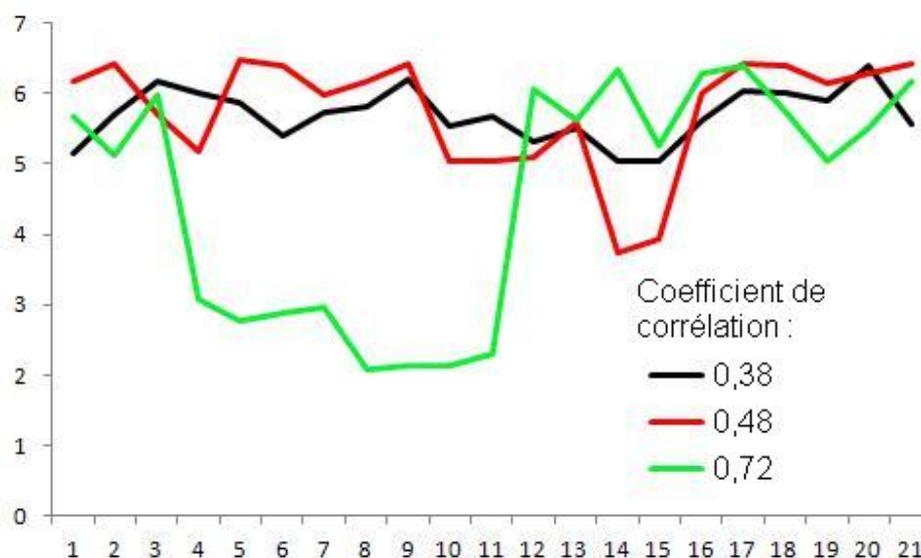


FIGURE 3.11 – Courbes fictives dont on calcule le coefficient de corrélation *corr.* avec leurs translatées. La courbe noire possède une intensité moyenne constante (*corr.* faible égal à 0,38), la courbe rouge présente quelques variations de moyenne vers les images 14 et 15 (rapport égal à 0,48) ce qui pourrait correspondre à un clignotement du fluorophore. La courbe verte est clairement décomposée en deux plateaux, un haut et un bas (rapport élevé égal à 0,72). Nous décidons de considérer la courbe verte comme non-canonique car un fluorophore disparaissant si longtemps ne peut indiquer un instant de disparition de manière fiable. Nous accordons à la rouge le droit de céder à un rapide clignotement.

L'intérêt de cette méthode est que la valeur de *corr.* ne dépend ni de l'intensité moyenne ni de l'amplitude des fluctuations du signal. Le seuil choisi peut donc s'appliquer à tous les fluorophores qu'ils se situent au centre de l'image fortement éclairée ou sur les bords.

Nous répartissons donc ainsi les fluorophores présents en début et fin de film entre les première et troisième populations.

Nous répartissons ensuite les fluorophores restants entre les deuxième et troisième populations car ces particules ont disparu à la fin du film.

4. *corr.* ne vaut 1 que lorsque les deux signaux sont identiques, soit lorsque le signal S_0 est constant, ce qui n'est jamais le cas à cause du bruit.

Pour cela, nous repérons les valeurs maximum et minimum de la trace temporelle étudiée pour définir un seuil situé à mi-chemin entre les deux. Nous partons ensuite de la fin de la séquence et remontons le temps jusqu'à trouver trois valeurs consécutives au dessus du seuil comme illustré à la figure 3.12.

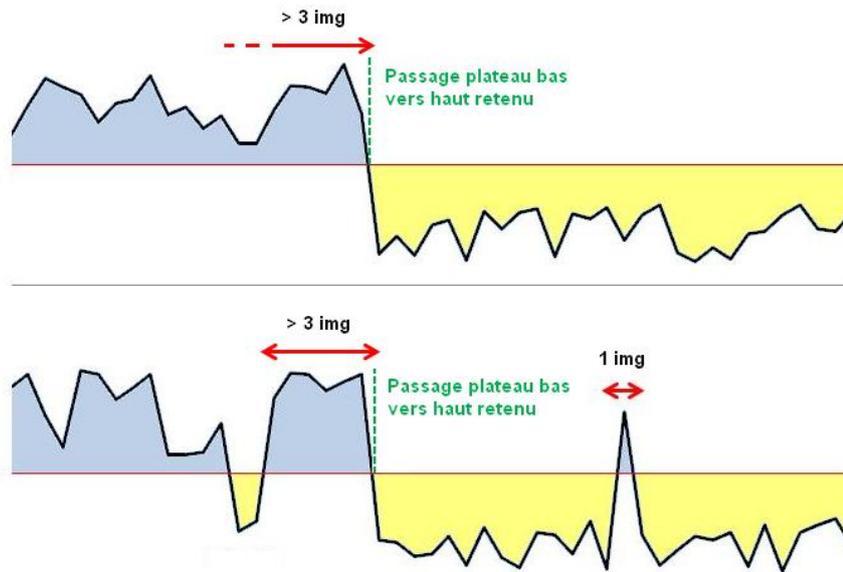


FIGURE 3.12 – Traces temporelles fictives. Un seuil est placé à mi-chemin entre le maximum et le minimum de chaque courbe. Nous cherchons la première série de trois points consécutifs situés au dessus du seuil en partant de la fin. Nous considérons que la fin du plateau haut et le début du plateau bas se situe à ce niveau. Cela permet au bruit (ou à une particule diffusante de passage sur ces pixels) de dépasser le seuil après le départ du fluorophore. Cela permet également au fluorophore de clignoter et de passer temporairement en dessous du seuil avant de disparaître définitivement.

Les fluorophores sont parfois victimes de clignotement. Ainsi, en remontant le temps, nous ignorons les passages du seuil avant la disparition du fluorophore. Sur la partie finale située en dessous du seuil, nous nous autorisons un dépassement local et bref du seuil. Cela peut arriver lors du bref passage d'une impureté brillante au niveau du fluorophore (on trouve parfois des amas fluorescents dans les extraits cellulaires). Un dépassement long est la marque d'une particule fixe, vraisemblablement le fluorophore en question.

Nous fixons le passage du plateau haut au plateau bas au niveau du saut d'intensité le plus important du voisinage de l'instant précédemment défini. Il se peut en effet que le fluorophore disparaisse au cours de l'acquisition d'une image et que la valeur d'intensité soit intermédiaire entre les deux plateaux. Nous décidons que l'extinction correspond à la plus grande différence d'intensité. La figure 3.13 montre un exemple où l'extinction n'est pas placée là où la courbe des données franchit le seuil.

3.3 Déterminer l'instant de disparition d'une particule

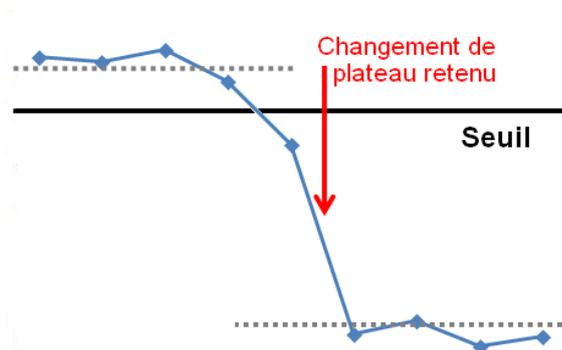


FIGURE 3.13 – Exemple de détermination de l'instant de passage du plateau haut vers la plateau bas.

Nous avons donc déterminé pour chaque fluorophore un instant où l'on passe d'un plateau haut à un plateau bas. Pour vérifier qu'un fluorophore suit bien une évolution canonique, nous comparons le saut d'intensité entre les deux plateaux estimés avec les variations d'intensité entre deux images consécutives sur le reste de la séquence. Si l'on trouve un saut d'intensité trop important dans le reste de la trace temporelle, nous considérons qu'il existe un autre palier ou que la limite entre les deux paliers estimée est un artefact. Dans ce cas, le fluorophore est classé dans la troisième population.

Si les plateaux haut et bas s'y prêtent (s'il ont suffisamment de points), nous leur appliquons le même traitement qu'aux fluorophores présents tout au long du film en étudiant le coefficient de corrélation *corr.* entre l'intensité des fluorophores et leurs translatées. Cela nous permet de repérer d'éventuelles variations d'intensités non dues au bruit sur chacun des plateaux. Encore une fois, les fluorophores présentant trop de variations sont classés parmi ceux de la troisième population.

3.3.3 Instants de disparition des fluorophores retenus

Une fois ce tri effectué entre les trois comportements possibles (présents jusqu'à la fin, disparition en cours d'expérience, comportement non-canonique), nous en retirons l'information que l'on cherche sur les instants de départs. Les fluorophores de la seconde population se font attribuer l'instant de départ estimé lors du tri. Il s'agit de l'image à laquelle la trace temporelle passe d'un palier haut à un palier bas.

Nous comptons les fluorophores de la première population car ils représentent la proportion de fluorophores toujours présents en fin de film. Le fait que tous les fluorophores n'aient pas disparu à la fin du film est une source d'information. Les fluorophores ne s'éteignent pas tous par photoblanchiment car celui-ci suit une loi exponentielle. Il doit donc logiquement rester des fluorophores présents en fin de séquence, leur nombre dépendant de l'efficacité de traduction (taux de fluorophores hybridés à un ARNm complexé à un ribosome fois le taux de ribosomes

actifs). À photoblanchiment égal, plus la traduction est efficace moins il reste de fluorophores en fin d'expérience.

Enfin, ceux n'ayant pas un comportement canonique ne sont pas pris en compte ni pour l'instant de départ, ni dans le nombre total de fluorophores étudiés. Ce nombre total est obtenu en additionnant les fluorophores des deux premières populations.

La figure 3.14 montre quelques traces de particules avec les instants de départ estimés par le programme. Sur cette figure, nous voyons la trace temporelle d'une particule de haut en bas. Les marqueurs rouges représentent les instants de départ estimés par notre programme pour chaque particule. Ces marqueurs sont placés avant la première image pour les fluorophores de la troisième population. Nous avons utilisé ce type de figure pour vérifier l'efficacité du programme et déterminer les valeurs finales des seuils utilisés.

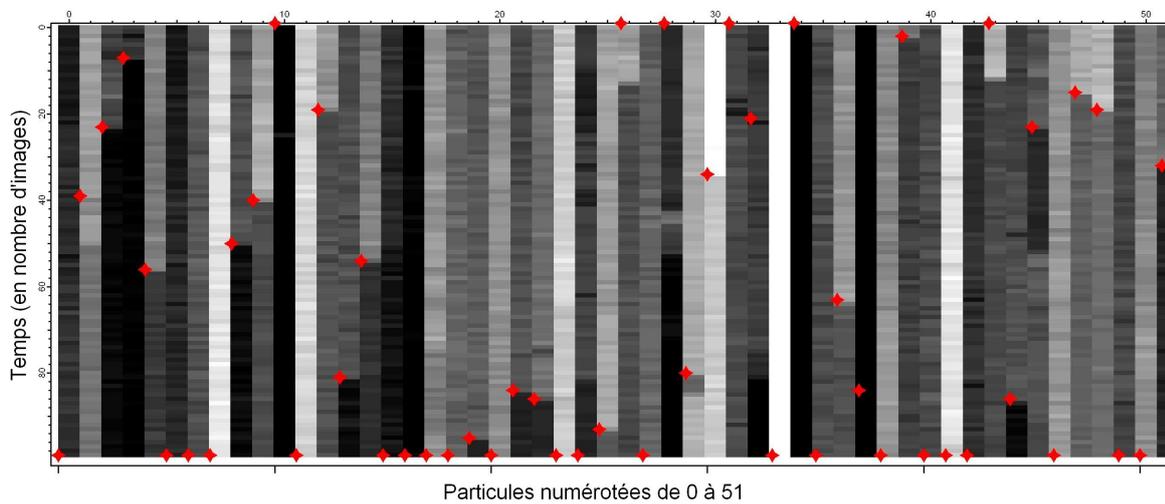


FIGURE 3.14 – Traces temporelles de 51 particules sur une séquence de 100 images. L'intensité de chaque particule est codée en niveaux de gris. Les marqueurs rouges montrent les instants de départ tels que déterminés par le programme. Ces marqueurs sont en -1 pour des fluorophores éliminés en raison de leurs comportements non-canoniques. Ils sont placés à l'image 100 pour des fluorophores toujours présents en fin de film.

Si nous sommes dans l'ensemble satisfaits de l'estimation du programme, nous notons qu'il subsiste quelques points au sujet desquels nous pourrions être en désaccord. En particulier les particules 26 et 43 ont été classées comme non-canoniques alors que l'instant de départ ne semble pas ambigu. Cette tendance à considérer comme non-canoniques quelques particules normales peut modifier légèrement le taux de traduction en augmentant artificiellement le nombre de points présents jusqu'à la fin du film par rapport aux points disparaissant de façon standard. Cependant, l'information principale que nous recherchons est le temps caractéristique d'élongation et nous n'avons pas repéré de biais concernant ce temps : la probabilité d'erreur de traitement ne dépend pas de l'instant de disparition de la particule.

3.4 Conclusion

Nous avons mis au point un programme permettant de détecter des fluorophores sur une image et de suivre leur présence sur une séquence d'images. Ce suivi est indépendant du ratio signal sur bruit des fluorophores, ce qui permet de comparer les fluorophores situés dans des régions plus ou moins excitées de la zone d'observation.

Nous avons également adapté le programme à l'étude comparée de deux séries d'images d'une même zone observée à deux longueurs d'onde différentes. Pour chaque système rapporteur équipé des deux marqueurs fluorescents, nous pouvons obtenir l'intervalle de temps entre les départs des deux fluorophores.

Ce programme est adapté aux données obtenues lors de nos expériences de TIRF et peut être rapidement modifié pour s'adapter à des niveaux de bruit de fond ou d'intensité du signal différents.

Résultats expérimentaux sur la cinétique de traduction en molécule unique

Nous avons suivi, pendant la traduction, le signal de fluorescence des oligonucléotides marqués de nos systèmes rapporteurs. Nous cherchons la signature de la traduction d'un ribosome unique, à savoir la disparition de notre champ d'observation d'oligos marqués, détachés par le passage d'un ribosome unique à un endroit précis de l'ARNm.

Dans un premier temps, nous comparerons les instants de départ respectifs des deux oligos différents situés sur le trajet du ribosome. Un écart temporel systématique nous permettra de déterminer une vitesse d'élongation *in vitro* pour des ribosomes de mammifères.

Dans un second temps, nous étudierons la distribution des instants de départ de chacun des oligos marqués à partir de l'injection des extraits cellulaires marquant le début de la traduction. La présence d'un temps caractéristique lent nous prouvera que l'initiation non-canonique du ribosome utilisée dans nos expériences ralentit fortement le premier cycle d'élongation. La vitesse des autres cycles d'élongation confirmera la valeur de la vitesse mesurée lors de l'expérience avec deux oligos marqués.

4.1 Passage du ribosome eucaryote entre deux instants de la phase d'élongation

Dans cette partie, nous étudions la traduction eucaryote en plaçant deux oligos fluorescents sur l'ARN messenger. Ces oligos sont munis d'un ATTO 647N (noté oligo 4r et dit rouge) pour le premier et d'un ATTO 565 (noté oligo 13v et dit vert) pour le second et font office de jalons comme montré à la figure 4.1. Comme on l'a vu au chapitre 2, ces deux oligos sont de courtes séquences d'ARN qui ont été choisies de façon à avoir une température de fusion la plus proche possible (même nombre de nucléotides et même taux de C et G), de l'ordre de 40 °C. L'oligo 4r est identique et est placé à la même distance du site P du ribosome que l'oligo *H12* utilisé dans les expériences de Takyar *et al.* [10] étudiant l'activité hélicase du ribosome procaryote. Cela nous permet de supposer que l'oligo 4r partira comme l'oligo *H12* après 4 cycles d'élongation.

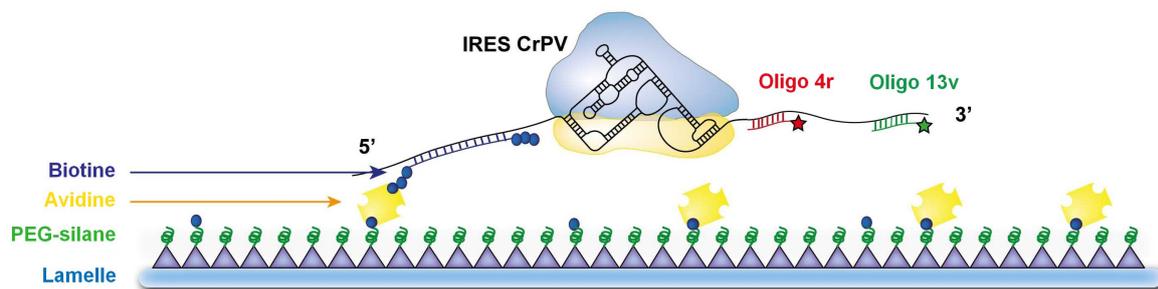


FIGURE 4.1 – Principe de l'expérience : le ribosome placé sur l'IRES commencera à traduire avec l'arrivée des extraits cellulaires. Ce faisant, il détachera successivement les oligofluorophores rouge puis vert de l'ARNm. N'étant plus reliés à la surface, ces derniers sortiront de la zone d'observation par diffusion.

Le ribosome est initialement positionné sur un IRES comme nous l'avons vu à la section 2.7.2. Le premier jalon quitte l'ARNm lorsque le ribosome a effectué quatre translocations et le second neuf translocations plus tard soit treize translocations après le début de la traduction (figure 4.2). Il devrait alors être possible de déterminer l'intervalle de temps entre le passage du ribosome à ces deux endroits précis de l'ARNm. Cela permettra d'obtenir des informations sur la vitesse de traduction locale à 31 °C, qu'il s'agisse de simples cycles d'élongation comme ici ou, à l'avenir, du passage de séquences particulières.

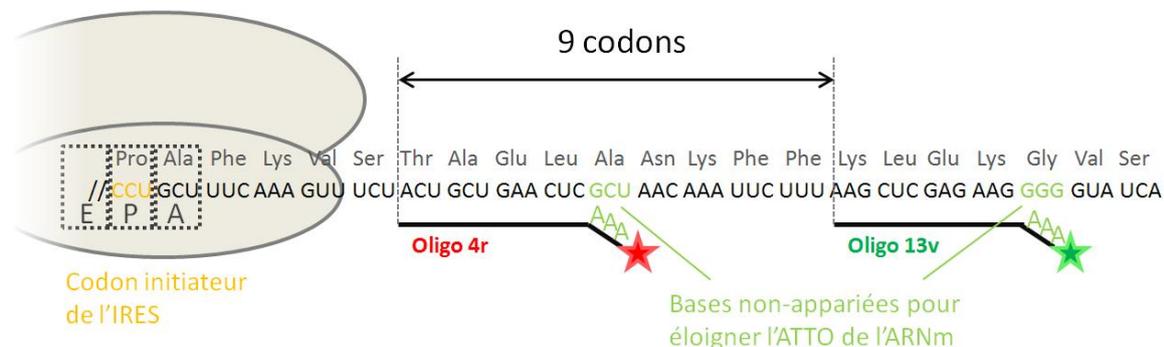


FIGURE 4.2 – Position du ribosome et des oligos hybridés sur l'ARNm. Après 4 translocations, à l'équilibre thermodynamique (oligos similaires à ceux utilisés dans [10]), l'oligo 4r s'est détaché de l'ARNm puis après 9 autres translocations, l'oligo 13v s'en va à son tour.

Notons que pour déterminer précisément le nombre de translocations nécessaires pour détacher le premier oligo, il faudrait prendre en compte les différences de conditions expérimentales entre notre expérience et celle de Takyar *et al.* [10] :

- Notre ribosome eucaryote est plus gros qu'un procaryote, on peut donc penser que le site hélicase, qu'il situe à +11 nucléotides du site P, sera un peu plus éloigné pour l'eucaryote. Au maximum, on peut le positionner à la limite de l'empreinte du ribosome eucaryote

4.1 Passage du ribosome eucaryote entre deux instants de la phase d'élongation

sur l'ARNm, estimée à +15 nucléotides. Ceci impliquerait donc qu'il pourrait suffire de 3 translocations pour décrocher l'oligo dans le cas de l'eucaryote.

- Notre température de travail est de 31 °C au lieu de 37 °C pour les expériences de Takyar *et al.*, ce qui conduit à une meilleure stabilité de l'oligo hybridé. En utilisant les formules données à la section 2.6.1, on trouve qu'il faut décrocher 4 nucléotides à 31 °C au lieu de 3 à 37 °C pour que 80 % des oligos soient détachés.

Les deux effets étant opposés, il est raisonnable de considérer que 4 translocations restent nécessaires pour décrocher le premier oligo, en gardant à l'esprit que 3 translocations pourraient suffire.

Pour les expériences décrites dans cette section, seul compte l'écart de 9 nucléotides entre les deux oligos et le fait que leur stabilité est la même : ils se détacheront pour le même nombre de bases désappariées par le ribosome. En revanche, pour les expériences de la deuxième partie du chapitre, nous pourrions avoir une incertitude sur le nombre exact de translocations nécessaires au départ de l'oligo 4r. Nous y reviendrons lors de l'analyse de ces expériences.

4.1.1 Acquisition à deux couleurs

Un système rapporteur complet est donc muni de deux fluorophores distincts. Ces fluorophores sont espacés de neuf codons soit une dizaine de nanomètres. Sur les images observées un pixel représente 0,2 μm . Or, d'après la formule (4.1), la tâche de diffraction des fluorophores a un diamètre d de l'ordre de 0,5 μm (l'ouverture numérique $O.N.$ vaut 1,45, la longueur d'onde λ est de l'ordre de 0,6 μm).

$$d = \frac{1,22\lambda}{O.N.} \quad (4.1)$$

Les fluorophores sont donc imagés sur plusieurs pixels (généralement entre quatre et neuf) comme nous pouvons le voir sur la figure 4.3.

Avec le nombre de points visibles à la surface dans les conditions de nos expériences, un point colocalise avec un autre avec une probabilité ne dépassant pas 1 %. Ayant des taux de colocalisation pouvant dépasser 80 %, nous nous permettons de considérer que deux points colocalisés appartiennent au même système rapporteur.

Nous suivons alors les traces temporelles des intensités des points rouge et vert colocalisés dont on donne un exemple à la figure 4.4. Les temps de départs des oligos 4r et 13v sont enregistrés pour pouvoir étudier leur distribution.

Après plusieurs expériences de traduction, nous avons accumulé des données sur quelques milliers de colocalisations. Ces systèmes biologiques ont été observés pendant trois minutes, à raison d'une image toutes les cinq secondes. Ce taux d'acquisition a été obtenu par un compromis entre un faible photoblanchiment et une bonne précision temporelle. En effet, des expériences antérieures, nous avaient montré qu'après trois minutes la grande majorité des

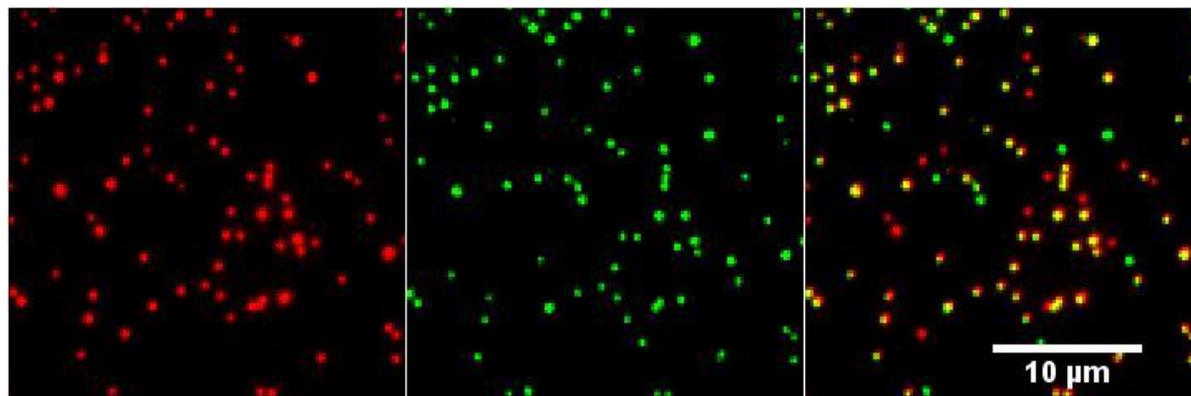


FIGURE 4.3 – Exemple de surface sur laquelle deux fluorophores différents (fausses couleurs) sont colocalisés. Une colocalisation correspond à un écart spatial de moins d'un pixel. Ici, avec moins de 100 points par couleur et plus de 10^4 pixels, une distribution aléatoire donnerait pour chaque point moins de 1 % de chances de colocalisation.

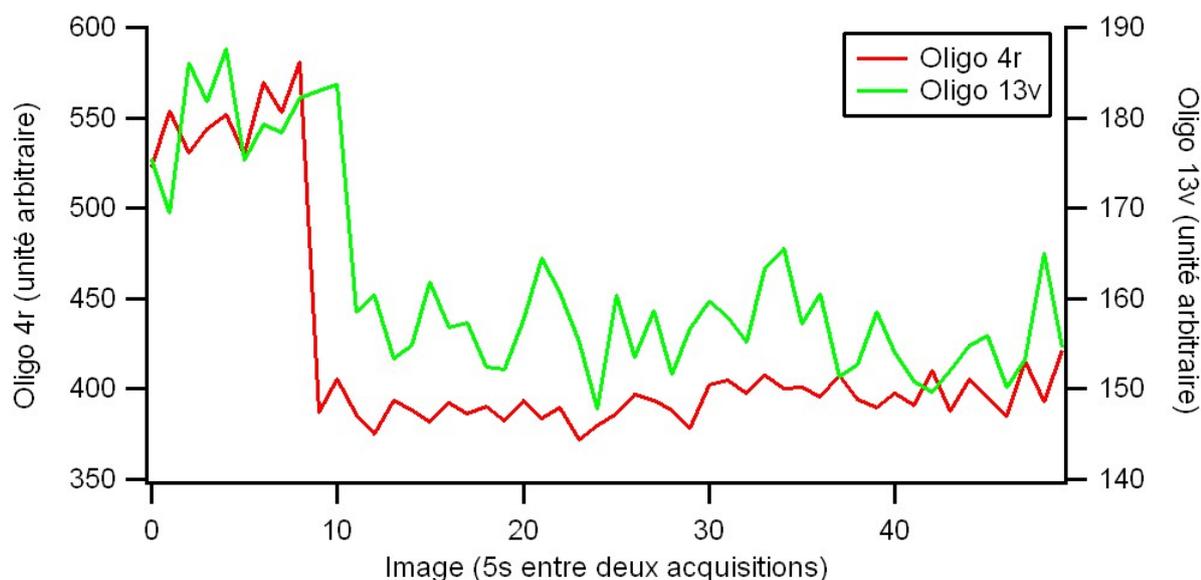


FIGURE 4.4 – Intensité de deux points colocalisés au cours du temps. Un saut est aisément détectable lors de la disparition du fluorophore. Ici, nous observons un ATTO rouge disparaître entre 9 et 10 images (soit entre 45 et 50 secondes) après le début de l'expérience et 2 images avant l'ATTO vert.

phénomènes traductionnels étaient achevés.

4.1.2 Histogrammes des écarts temporels entre les disparitions des deux oligos

Nous avons mesuré les instants de départ du premier et du second oligo pour chaque colocalisation. Ces mesures d'écarts temporels peuvent donner des valeurs aussi bien positives que négatives selon que le premier fluorophore a disparu avant ou après le second. Chaque colocali-

4.1 Passage du ribosome eucaryote entre deux instants de la phase d'élongation

sation n'est prise en compte que si le signal disparaît dans les deux canaux. Nous évitons ainsi de comptabiliser les intervalles de temps trop longs dont on ne connaît qu'une borne inférieure. Sachant que le passage du ribosome au niveau des oligos se fait majoritairement avant la fin du film, la perte d'information est négligeable.

Les disparitions des fluorophores peuvent être dues à une traduction mais également au photoblanchiment des fluorophores. Elles peuvent aussi provenir d'autres phénomènes tels des déshybridations spontanées des oligos ou des dégradations des ARNm pour des raisons chimiques, physiques ou biologiques. En outre, plusieurs paramètres peuvent influencer sur la disparition des fluorophores : un changement de température, le flux lors de l'injection, le changement de tampon, la forte dilution ou encore la présence d'extraits cellulaires non purifiés. Il est alors nécessaire de procéder à un contrôle caractérisé par des conditions identiques et par l'absence certaine de traduction.

Il existe plusieurs méthodes pour interdire toute traduction. Nous avons ici choisi d'utiliser un ARNm ne possédant pas d'IRES. Sans IRES ni facteurs d'initiation, les ribosomes sont incapables de se positionner sur l'ARNm. Puis une fois en présence des facteurs présents dans le RRL, l'extrémité 5' des ARNm n'est plus accessible car attachée à la surface.

Pour une expérience contrôle où les fluorophores ne sont pas soumis à l'activité hélicase des ribosomes, les lois de probabilités de disparition p_1 et p_2 des deux fluorophores sont relativement similaires. La cinétique de disparition dépend principalement de la vitesse de photoblanchiment qui varie en fonction de la puissance d'excitation des différents lasers. Nous avons donc choisi les puissances d'excitation pour obtenir des taux de photoblanchiment proches l'un de l'autre. Cela donne une probabilité théorique p d'avoir un intervalle de temps τ entre les disparitions des deux fluorophores :

$$p(\tau) = \int_0^{+\infty} p_1(t)p_2(t + \tau)dt \quad (4.2)$$

Pour deux lois exponentielles identiques, $p_1(t) = p_2(t) = H(t).\lambda e^{-\lambda t}$, nous obtenons une loi simple symétrique formée de deux exponentielles (illustrée à la figure 4.5) :

$$p(\tau) = \frac{\lambda}{2} e^{-\lambda|\tau|} \quad (4.3)$$

Avec l'équation (4.3) nous avons une densité de probabilité à support non borné alors que sur nos données nous ignorons les événements survenant après un temps T correspondant à la fin du film. Ces événements se situent dans la queue de l'exponentielle et sont donc peu nombreux mais cela modifie légèrement le résultat (figure 4.5), pour τ compris entre $-T$ et T on a :

$$p(\tau) = \frac{\lambda}{2}(e^{-\lambda|\tau|} - e^{-\lambda(2T-|\tau|)}) \quad (4.4)$$

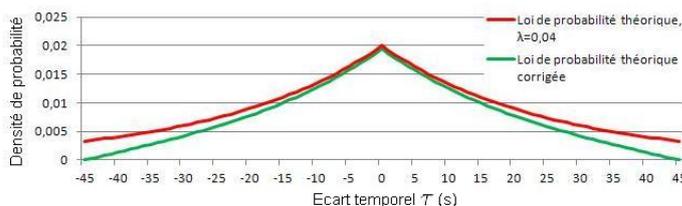


FIGURE 4.5 – Probabilité de départ de deux fluorophores avec un écart temporel τ . Ces courbes correspondent aux équations (4.3) pour la courbe rouge et (4.4) pour la courbe verte avec $\lambda = 0,04 \text{ s}^{-1}$.

Utiliser cette fonction pour interpoler l’histogramme du contrôle sans IRES donne le résultat montré sur la figure 4.6.

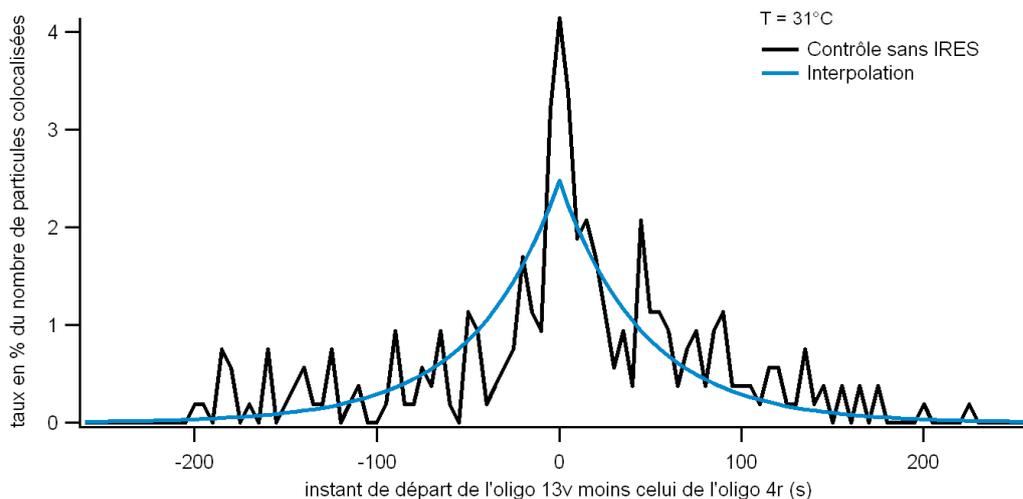


FIGURE 4.6 – Histogramme des intervalles de temps entre les départs de l’oligo 13v et le l’oligo 4r dans le cas du contrôle sans IRES (courbe noire). Une interpolation selon l’équation (4.4) donne la courbe bleue.

Cette courbe d’interpolation n’est pas satisfaisante en 0 où elle ne reproduit pas le pic présent sur les données. Ce pic correspond à des fluorophores colocalisés disparaissant au même instant. Il peut s’agir par exemple d’ARNm se détachant de la surface emportant avec eux les deux oligos. Quoi qu’il en soit, ce phénomène a lieu dans le contrôle, il doit donc être pris en compte dans l’expérience. Nous utiliserons donc la courbe du contrôle et non son interpolation pour corriger la courbe de l’expérience de traduction.

4.1 Passage du ribosome eucaryote entre deux instants de la phase d'élongation

Dans le cas d'une traduction, les lois de probabilités de disparition de chaque fluorophore sont plus complexes qu'une simple exponentielle. Si des lois de probabilités peuvent être envisagées à partir des résultats obtenus avec un seul fluorophore (prenant en compte les départs par traduction et photoblanchiment pour les deux fluorophores), elles ne se prêtent que difficilement à une interpolation. Une difficulté supplémentaire est que l'on ne peut plus s'affranchir des départs qui ne sont pas dus à la traduction (que l'on appellera blanchiment dans la suite). Il faudrait retrancher les intervalles où les deux fluorophores blanchissent, ce que l'on peut mesurer avec une expérience témoin mais également ceux où l'un des deux a blanchi et l'autre a été détaché par le ribosome. Or nous ne pouvons faire d'expérience témoin pour ces cas là sans recréer tout un système rapporteur avec traduction pour un seul des deux fluorophores. Il faudrait par exemple changer la séquence de l'ARNm pour placer un codon stop entre les deux oligos et voir le premier partir par traduction et le second par blanchiment. Un autre témoin serait de placer le premier oligo hors de la séquence codante pour le voir blanchir tout en conservant les effets de la traduction pour le second. Ces changements en feraient un contrôle moins fiable car basé sur une séquence différente et des efficacités d'hybridations potentiellement différentes.

Pour ne pas se perdre dans des modèles complexes induisant potentiellement des biais, nous nous contenterons de soustraire les cas où les deux fluorophores blanchissent. Nous considérons alors que les événements croisés blanchiment et traduction sont suffisamment rares.

4.1.3 Résultats et interprétation

Nous pouvons alors comparer les histogrammes des comportements des colocalisations avec et sans traduction possible comme le montre la figure 4.7.

Nous avons ici deux histogrammes représentant la distribution des intervalles de temps entre la disparition du fluorophore rouge puis du vert. Ces histogrammes sont obtenus en regroupant les données extraites de plusieurs expériences. Ces expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions et nous avons fait attention à ne pas faire varier les éléments qui influent sur le résultat comme par exemple la température, le lot d'extraits cellulaires et le lot de ribosomes utilisés. Dans la suite, nous regrouperons les données de plusieurs expériences uniquement lorsque ces conditions expérimentales sont les mêmes pour toutes les expériences.

Comme nous l'avons souligné précédemment, lors de la traduction le ribosome déshybride l'oligo fluorescent, ce qui se traduit par la disparition du signal lumineux (le fluorophore diffusant hors de l'onde évanescence). Cependant, la disparition peut aussi être la conséquence d'un autre mécanisme, mais celui-là aura également lieu dans le contrôle. Comparer expérience et contrôle nous permet donc de déterminer l'effet de la traduction seule.

Ces histogrammes montrent le temps de départ du second oligo (le vert) moins le temps de départ du premier (le rouge). Le photoblanchiment peut affecter l'un ou l'autre dans n'importe quel ordre (avec un temps caractéristique d'extinction de l'ordre de la vingtaine de secondes d'exposition, soit une centaine d'images), tandis que le ribosome doit passer par le rouge avant

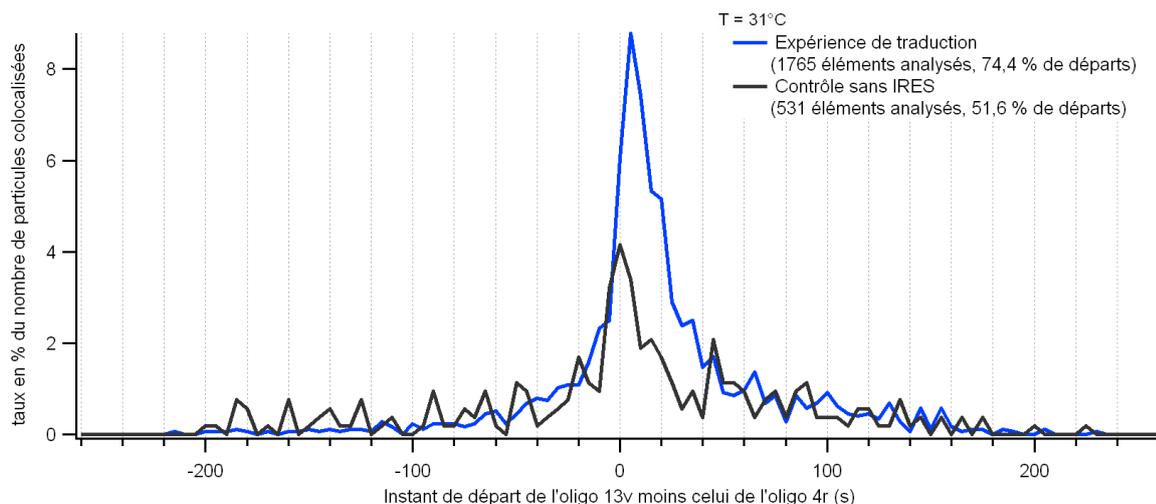


FIGURE 4.7 – Histogramme des écarts temporels entre la disparition des deux oligos. Les valeurs de l'histogramme sont en pourcentage du nombre de colocalisations étudiées. Le temps de départ de l'oligo 4r (le premier jalon sur la séquence traduite) est soustrait au temps de départ de l'oligo 13v. En bleu l'expérience de traduction, en noir le contrôle sans IRES. Nous constatons que lors de l'expérience, il y a de nombreux départs d'oligos 13v entre 5 et 40 secondes après les oligos 4r associés. La courbe de l'expérience de traduction est obtenue à partir de l'analyse de 1765 colocalisations extraites de 10 expériences dans les mêmes conditions. La courbe du contrôle provient de l'analyse de 531 colocalisations extraites de 6 expériences, ce qui explique son plus grand bruit statistique.

d'atteindre le vert. Ainsi, une traduction se manifestera par un pic autour d'une valeur positive sur l'histogramme. On remarque directement sur la figure 4.7 que la différence entre le contrôle et l'expérience est précisément une augmentation du nombre de cas où l'écart mesuré est positif. Cela témoigne donc directement d'une activité traductionnelle.

Cependant, les temps relatifs correspondent à deux disparitions de fluorophores. Nous venons de voir qu'entre la courbe de l'expérience et celle du contrôle, s'ajoutent les cas où les deux oligos ont été détachés par le ribosome mais également ceux où l'un des deux a blanchi ou a été détaché pour une autre raison avant le passage du ribosome.

Par souci de simplicité, nous commencerons par négliger ces événements croisés. Cela peut se justifier par l'indépendance de la traduction et des autres disparitions : le passage du ribosome au niveau d'un oligo n'implique ni ne découle d'une disparition hors traduction de l'autre oligo. L'écart temporel entre les deux disparitions peut donc prendre de nombreuses valeurs et les occurrences pour chacune de ces valeurs seront donc peu nombreuses. Au contraire, les doubles disparitions par passage du ribosome sont corrélées, et les occurrences seront regroupées sur quelques valeurs seulement. Nous en concluons que le pic bleu de la figure 4.7 correspond très majoritairement aux doubles départs par traduction. Nous nous contentons donc de soustraire la courbe de contrôle à celle de l'expérience (cf. figure 4.8).

Comme cela était déjà visible à la figure 4.7, le passage de ribosomes sur les ARNm gé-

4.1 Passage du ribosome eucaryote entre deux instants de la phase d'élongation

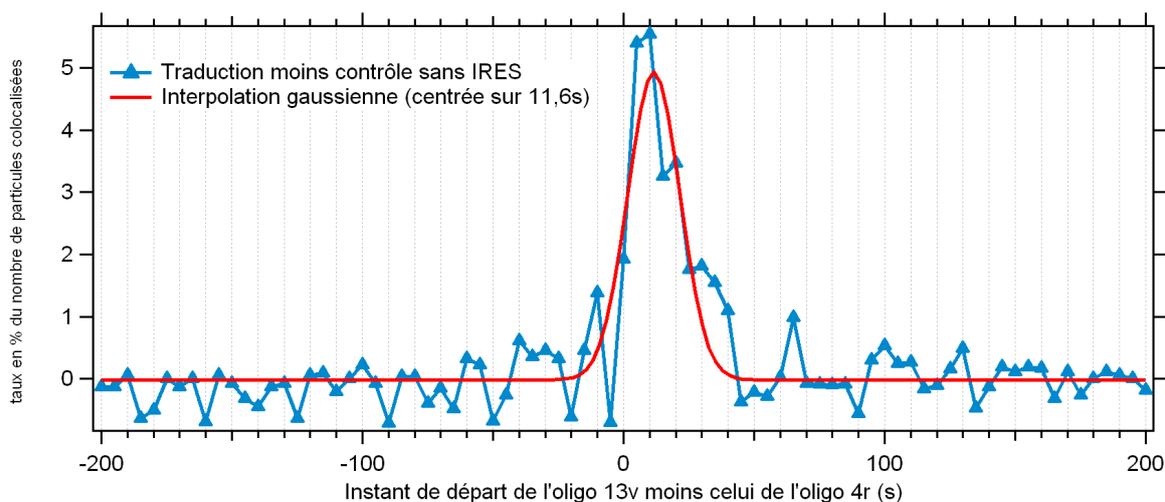


FIGURE 4.8 – Différence des histogrammes de la figure 4.7 avec interpolation gaussienne. Nous retranchons à l'expérience (courbe bleue de la figure 4.7) les départs aussi présents dans le contrôle sans IRES (courbe noire de la figure 4.7). La majorité des points comptabilisés sur cet histogramme correspondent à deux départs consécutifs des oligos 4r et 13v causés par le ribosome. L'interpolation gaussienne est centrée sur 11,6 s. Sachant que les oligos sont espacés de neuf codons, nous en déduisons que la vitesse moyenne d'élongation est ici de 0,78 cycle par seconde.

nère des départs de fluorophores rouges et verts séparés de quelques images seulement. Par une simple interpolation gaussienne nous apprenons que l'écart entre les deux départs vaut en moyenne 12 secondes. La fonction d'interpolation donne une valeur de 11,6 ($\pm 0,7$) s ce qui montre que malgré le bruit statistique, le temps caractéristique est obtenu avec une bonne précision. Notons que pour toutes les expériences rassemblées sur cet histogramme (10 pour la traduction, 6 pour le témoin), nous avons pris la précaution de maintenir des conditions biologiques les plus semblables possibles, en particulier l'utilisation du même lot de RRL (extrait cellulaire) et la même température pour l'échantillon. Nous avons en effet constaté, sans en faire une étude systématique, qu'une variation de ces conditions pouvait changer le temps caractéristique de translocation.

Sachant que l'écart entre les deux oligos est de neuf codons, cela correspond à un temps moyen de 1,3 ($\pm 0,1$) s par translocation ou encore une vitesse d'élongation moyenne d'environ 0,78 cycle par seconde. Cette vitesse d'élongation est en accord avec les vitesses d'élongation *in vitro* qui sont généralement de l'ordre de 1 cycle par seconde [28,37]. Il n'est pas surprenant de noter que ces vitesses peuvent être dix fois plus rapides *in vivo* [37].

Nous considérons qu'une interpolation gaussienne n'est dans ce cas guère différente d'une interpolation par une loi d'Erlang. Nous introduisons cette loi de probabilités à la section 4.2.1, elle correspond à n événements consécutifs de lois exponentielles identiques. Si nous supposons que le mécanisme d'élongation est assimilable à neuf cycles de translocation consécutifs de lois de probabilité exponentielles et de temps caractéristiques proches, alors les instants de départs

se répartiront sur une courbe proche d'une loi d'Erlang de paramètre de forme égal à neuf. Or la figure 4.9 montre que ce type de courbe est proche d'une gaussienne et peut être interpolé par une courbe de Gauss de façon satisfaisante. L'interpolation gaussienne réalisée est donc aussi pertinente qu'une interpolation par une loi d'Erlang et a l'avantage de la simplicité.

Nous avons donc obtenu une vitesse de traduction *in vitro* de 0,78 cycle par seconde pour le ribosome eucaryote en phase d'élongation. Or, pour pouvoir observer plusieurs traductions lors d'une même acquisition de données, nous avons bloqué les ribosomes en les privant de matériel traductionnel avant de lancer l'expérience en injectant des extraits cellulaires dans la cellule microfluidique. L'instant de départ est alors le même pour tous les ribosomes de la surface à la seconde près. Nous souhaitons exploiter cette synchronisation pour suivre la cinétique des temps de départs des oligos par rapport l'instant d'injection des extraits cellulaires.

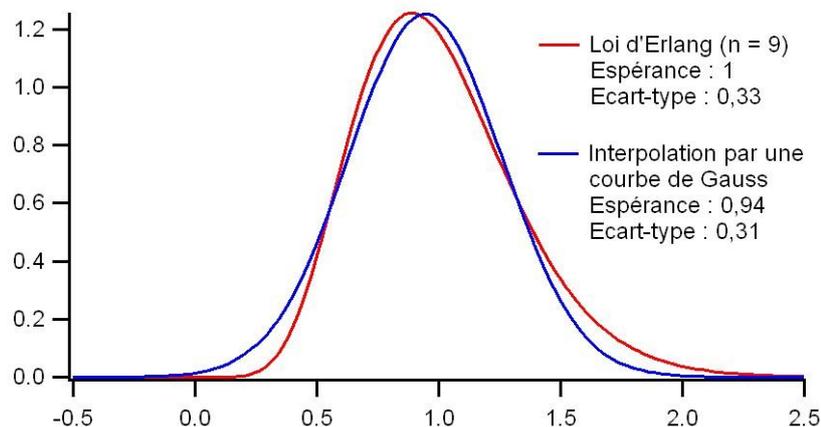


FIGURE 4.9 – Interpolation gaussienne d'une loi d'Erlang. En rouge une loi d'Erlang de paramètre de forme 9 (nombre d'événements consécutifs) de moyenne 1 et d'écart-type $1/3$; en bleu l'interpolation de cette fonction par une gaussienne. La gaussienne obtenue a une moyenne de 0,94 et un écart-type de 0,31. Une simple fonction gaussienne permet d'estimer les paramètres d'une telle fonction d'Erlang sans trop d'erreur.

4.2 Étude de la traduction eucaryote entre l'initiation et un jalon

Nous venons de mesurer des intervalles de temps entre les disparitions de deux oligos consécutifs. Nous pouvons également étudier l'intervalle entre le départ d'un oligo et le début de l'expérience, ce dernier correspondant à l'arrivée des extraits cellulaires sur la zone d'observation. En présence de traduction, la disparition des oligos fluorescents sera plus rapide après injection des extraits cellulaires que dans le cas d'une expérience de contrôle sans traduction.

4.2 Étude de la traduction eucaryote entre l'initiation et un jalon

4.2.1 Temps avant la disparition des fluorophores

Nous ne prenons en compte que l'oligo-fluorophore rouge. Tracer la proportion d'oligos restants en fonction du temps (figure 4.10) permet de faire ressortir le nombre de points ayant disparu au cours de l'expérience. Nous comparons l'expérience avec différents contrôles pour pouvoir n'étudier que la traduction.

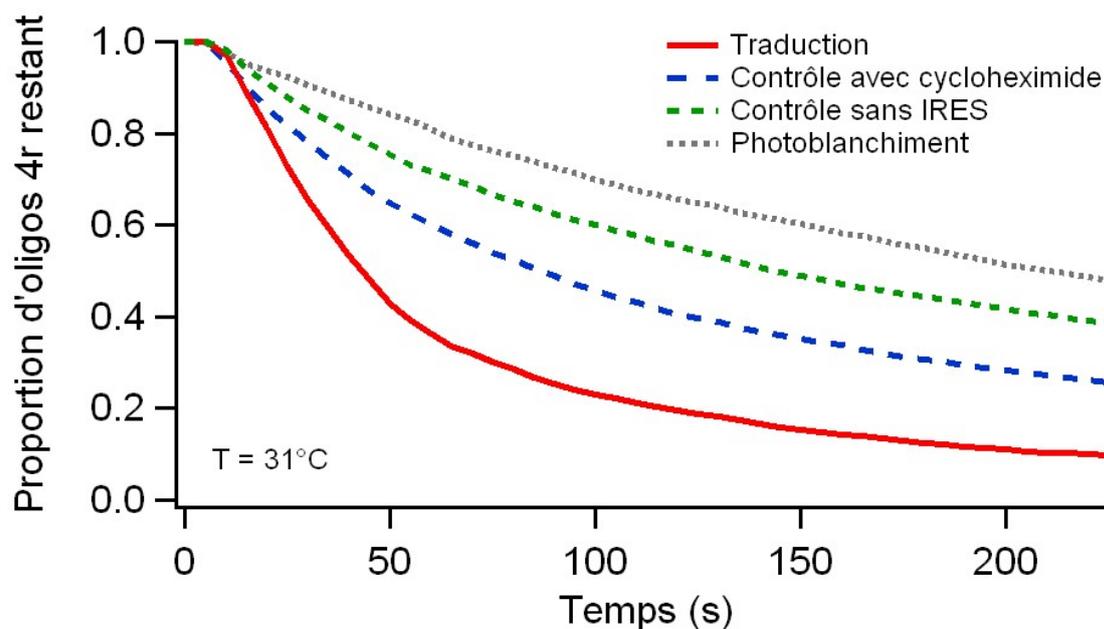


FIGURE 4.10 – Proportion de fluorophores rouges toujours visibles au cours du temps. On éclaire et acquiert une image toutes les 5 secondes. La courbe rouge représente les oligos soumis à une traduction, les autres courbes sont des courbes de contrôle. La courbe bleue est le contrôle en présence de cycloheximide qui bloque la traduction après deux translocations ; la courbe verte est le contrôle sans IRES où l'initiation ne peut avoir lieu ; la courbe noire est le photoblanchiment observé longtemps après l'injection des extraits cellulaires sur une zone non précédemment éclairée. En présence de traduction, nous voyons que les oligos fluorophores disparaissent plus vite que dans les expériences de contrôle.

Pour faire une expérience témoin, il faut bloquer uniquement la traduction. Il est possible de supprimer la séquence IRES de l'ARNm comme vu précédemment pour empêcher toute initiation du ribosome. Il peut être considéré comme gênant d'utiliser un ARNm ayant une séquence différente, aussi avons-nous également effectué un contrôle avec IRES mais en présence d'un antibiotique, la cycloheximide. La cycloheximide bloque les translocations en se plaçant dans le site E du ribosome. Dans le cas d'une initiation à partir de l'IRES CrPV, le blocage a lieu après le second cycle d'élongation [56,57]. L'hybridation est alors moins stable, ce qui peut mener à quelques départs d'oligos non souhaités, en particulier si le ribosome arrive à effectuer 3 ou 4 cycles avant d'être bloqué par la cycloheximide. C'est pour cette raison que nous avons choisi le contrôle sans IRES pour l'expérience à deux couleurs.

Nous traçons également la courbe de photoblanchiment : il s'agit d'une acquisition d'images de 4 minutes longtemps après l'injection des extraits cellulaires (plus de 15 minutes) sur une zone voisine n'ayant pas été éclairée auparavant. Cette courbe représente la proportion de disparitions dues à l'excitation laser.

On considère qu'après 15 minutes, nous avons atteint un équilibre chimique et biologique. En effet, la rupture d'équilibre a lieu lors de l'injection d'extraits cellulaires. Les fluorophores peuvent alors disparaître selon différents mécanismes (traduction ou autres). Les populations soumises à un mécanisme de disparition donné possèdent une décroissance rapide ou lente devant les 4 minutes que dure une expérience. Dans le cas d'une décroissance rapide (quel que soit le mécanisme mis en jeu), les fluorophores concernés ne sont plus présents 15 minutes après l'arrivée des extraits cellulaires. Le photoblanchiment est une exception car il dépend de l'illumination et n'a lieu que pendant l'acquisition des images. Dans le cas d'une décroissance lente, la variation du nombre de ces fluorophores sur 4 minutes est négligeable devant les disparitions dues au photoblanchiment qui est rapide.

Nous constatons que les résultats sont conformes à nos attentes : les points disparaissent plus rapidement en présence de traduction et plus lentement avec le seul photoblanchiment. Les deux témoins se situent entre traduction et photoblanchiment. En effet, les oligos ne sont pas soumis à la traduction et disparaissent donc moins vite. Cependant, ils sont soumis au photoblanchiment et à la rupture d'équilibre (chimique et biologique) causée par l'injection d'extraits cellulaires. Ainsi la vitesse de disparition des points est légèrement plus élevée que celle de la courbe de photoblanchiment.

L'absence d'IRES semble plus efficace que l'antibiotique pour bloquer la traduction. Cela est raisonnable car en l'absence d'IRES, le ribosome ne peut se positionner sur l'ARNm. Avec l'antibiotique et l'IRES, le ribosome est présent et la traduction est bloquée. Selon [56], la cycloheximide peut bloquer le ribosome après au moins deux translocations. Le ribosome détache l'oligo 4r en 4 cycles d'élongation, la cycloheximide agit donc après que le ribosome ait parcouru la moitié du chemin. Cela peut se traduire par une légère augmentation du nombre de départs par rapport à un contrôle sans IRES. Nous sommes donc plus enclin à nous fier au contrôle sans IRES comme nous l'avons fait à la section 4.1.1.

Nous ne nous intéressons qu'aux départs dus à la traduction, nous aimerions donc nous affranchir des autres départs correspondants à ceux enregistrés lors des contrôles. Nous appliquons pour cela la règle de renormalisation suivante :

$$C_{trad} = \frac{C_{exp}}{C_{ctrl}} \quad (4.5)$$

où C_{trad} est la courbe renormée, C_{exp} est la courbe des points restants lors de la traduction et C_{ctrl} est l'interpolation exponentielle de la courbe contrôle sans IRES. Nous interpolons cette dernière pour éviter d'ajouter son bruit statistique au résultat. De plus, cette courbe de

4.2 Étude de la traduction eucaryote entre l'initiation et un jalon

contrôle se superpose particulièrement bien avec une exponentielle comme le montre la figure 4.11. Nous voyons sur cette figure que le bruit statistique est faible lorsque l'on bénéficie d'un bon nombre de points (nous souhaitons généralement avoir plus de 500 points) mais cela n'est plus vrai pour certains contrôles où la statistique est moins bonne, auquel cas l'interpolation exponentielle permet de s'affranchir du bruit du contrôle.

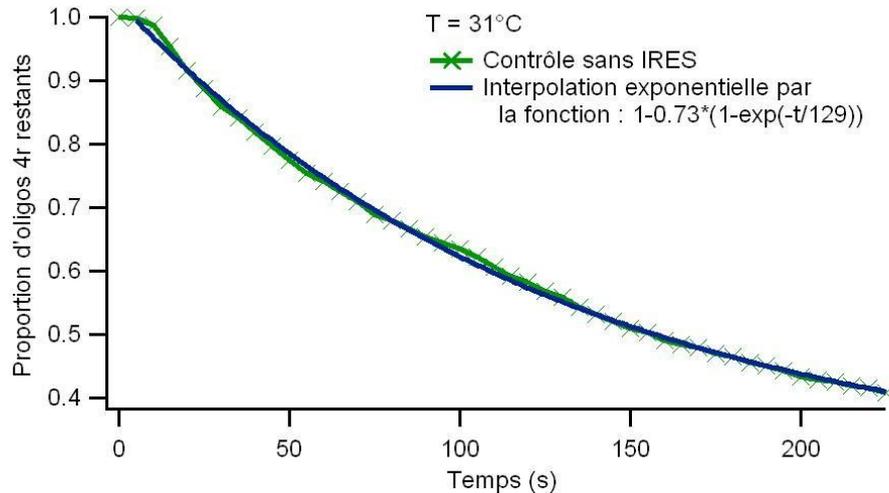


FIGURE 4.11 – Ajustement exponentiel du contrôle sans IRES. Cette courbe rassemble les instants de départs de 6991 fluorophores sur 6 expériences. La courbe de taux de fluorophores restants lors du contrôle sans IRES en vert est interpolée par une exponentielle en bleu de temps caractéristique 129 secondes.

Nous obtenons sur la figure 4.12 la courbe renormée où l'on voit les points disparaître dans la première partie de l'expérience avant d'atteindre un palier correspondant à la proportion de particules insensibles à la traduction. Cette insensibilité peut résulter soit de l'absence de ribosome sur l'ARNm, soit de l'incapacité de certains ribosomes à se déplacer sur l'ARNm. Ici, 75 % des oligos sont affectés par le passage du ribosome.

Taux de départ par image

Si les courbes de proportion de fluorophores restants sont peu bruitées et font bien ressortir le nombre final de disparitions, il est plus difficile d'en extraire des informations sur la cinétique. Nous traçons donc le nombre instantané de départs par image, obtenu en dérivant la courbe de la figure 4.12. Pour dériver cet histogramme, nous déterminons simplement l'écart entre deux valeurs consécutives, ce qui correspond bien à un taux de variation. On obtient alors les courbes tracées sur les figures 4.13 à 4.17. Ces courbes sont les dérivées d'histogrammes où le nombre de points observés à chaque instant est rapporté au nombre total de points étudiés. On corrige les courbes pour avoir le nombre de départs dus à la traduction en se rapportant au nombre de fluorophores encore présents lors du contrôle sans IRES selon l'équation (4.5).

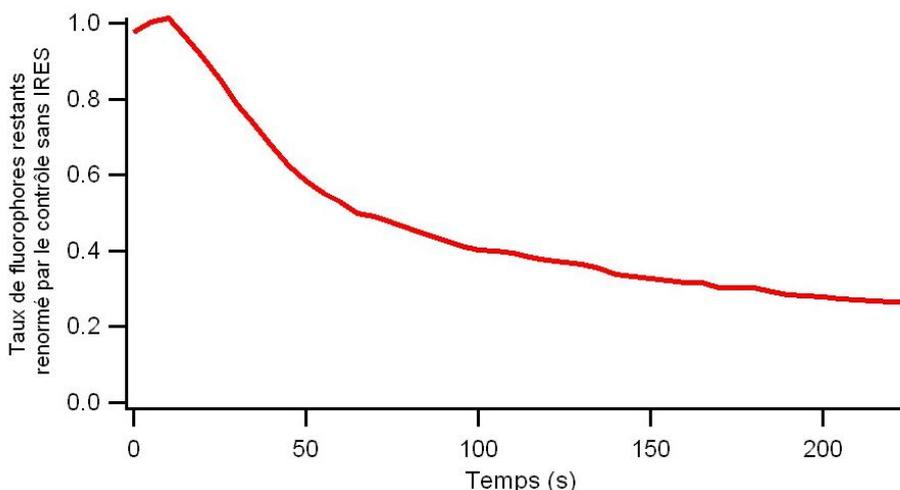


FIGURE 4.12 – Courbe de traduction renormée par le contrôle sans IRES selon l'équation (4.5). Une fois les départs n'étant pas dus au passage du ribosome ignorés, on voit le taux d'oligos restants tendre vers un palier, se situant à environ 25 %. Cela nous donne un ordre de grandeur de l'efficacité de traduction dans les conditions de l'expérience autour de 75 %.

De la même manière qu'à la section 4.1.3, nous tentons d'interpoler les résultats le plus simplement possible. Nous utilisons d'abord une courbe exponentielle décroissante. Si ce type d'interpolation est satisfaisant pour les courbes de contrôle (figure 4.11), il l'est nettement moins pour les courbes de traduction (figure 4.13). Nous comparons alors différentes lois de probabilités pour interpoler les données.

Modèle : loi d'Erlang, un unique temps caractéristique

Entre l'injection des extraits cellulaires et la séparation de l'ATTO, le ribosome doit effectuer quatre translocations en moyenne (figure 4.2). Or, ces translocations sont par nature consécutives, et il est peu probable que les quatre aient lieu quasi-instantanément. Cela explique le faible taux de départs sur les premières images. Pour modéliser quatre événements consécutifs indépendants, on effectue la convolution des lois de probabilités de ces événements.¹ On considère que les quatre cycles d'élongation suivent une même loi de probabilité exponentielle décroissante $p(t)$ de temps caractéristique $\frac{1}{\lambda}$:

$$p(t) = p_1(t) = p_2(t) = p_3(t) = p_4(t) = H(t) \cdot \lambda \exp(-\lambda \cdot t)$$

On note $H(t)$ la fonction de Heaviside, nulle pour t négatif et valant 1 pour t positif.

Une convolution de n exponentielles identiques possède une expression analytique simple

1. La convolution de deux lois de probabilités $p_1(t)$ et $p_2(t)$ s'écrit $p(\tau) = (p_1 * p_2)(\tau) = \int p_1(t)p_2(\tau - t)dt$. Ainsi, la probabilité que deux événements consécutifs prennent exactement un temps τ correspond à la probabilité que le premier événement prenne un temps t et le second $\tau - t$ quel que soit t .

4.2 Étude de la traduction eucaryote entre l'initiation et un jalon

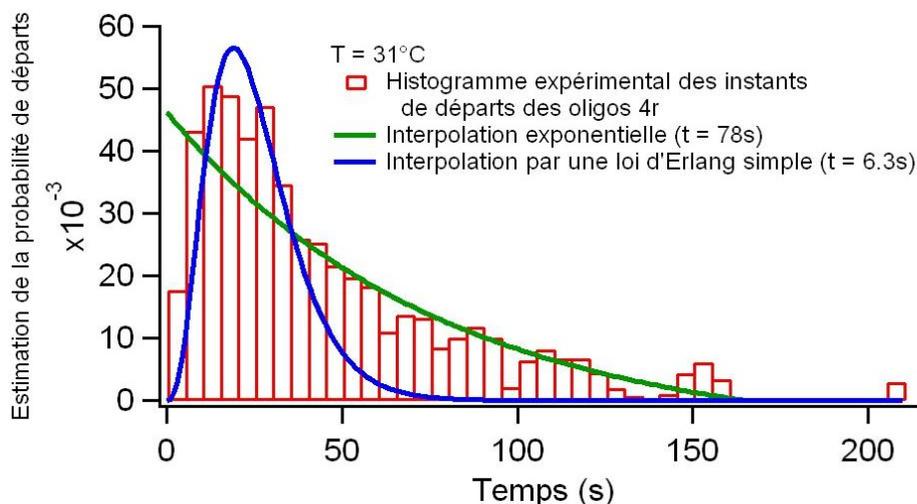


FIGURE 4.13 – Interpolation à un paramètre d’un histogramme des temps de départs de fluorophores dans le cas d’une traduction. En vert une simple exponentielle décroissante qui suggère quatre translocations en près de 80 s. En bleu une loi d’Erlang ($n = 4$) où chaque cycle d’élongation prendrait environ 6 s. Les données proviennent de 7 expériences dans les mêmes conditions présentant 7112 points analysés.

connue sous le nom de loi d’Erlang, de la forme :

$$p(t) = H(t) \cdot \frac{\lambda^n t^{n-1} e^{-\lambda t}}{(n-1)!} \quad (4.6)$$

Lorsque l’on compare les courbes de probabilité théoriques avec les histogrammes, on fait apparaître un facteur A qui représente le nombre d’oligos affectés par la traduction, $(1 - A)$ étant alors la proportion d’oligos sur un ARNm sans ribosome ou avec un ribosome inactif. Les histogrammes ne comptent que les départs dus au ribosome sur le nombre total de points alors que $p(t)$ est normé. Le facteur A dépend du plateau trouvé sur les courbes du type de la figure 4.12. Toutes les interpolations sont alors faites selon une expression analytique de la forme $A \cdot p(t)$. Dans le cas de la loi d’Erlang, la courbe obtenue est tracée en bleu sur la figure 4.13. Si cette courbe fait bien apparaître un retard avant le départ des premiers oligos, elle décrit mal la décroissance lente de la courbe au-delà du maximum de départs. L’interpolation nous donne $\frac{1}{\lambda} = 9,1 (\pm 0,5)$ s de temps caractéristique, soit une vitesse de traduction de $0,11 \text{ aa} \cdot \text{s}^{-1}$, et un taux de traduction $A = 50 (\pm 4) \%$.

Modèle : deux temps caractéristiques distincts

Nous venons de voir que les données semblent impliquer l’existence d’un phénomène lent. Sachant qu’au début de l’expérience le ribosome part d’un IRES et non d’un codon start conventionnel, on admet que le premier cycle d’élongation puisse être plus lent que les suivants.

Il ne s'agit alors plus de la convolution de quatre exponentielles identiques mais d'une première lente suivie de trois identiques. Le temps caractéristique différencié sera $\frac{1}{\lambda_l}$ par opposition aux trois autres identiques $\frac{1}{\lambda_c}$. L'expression analytique est alors :

$$p(t) = H(t) \cdot \frac{\lambda_c^3 \lambda_l}{(\lambda_c - \lambda_l)^3} \left[e^{-\lambda_l t} - e^{-\lambda_c t} \left(1 + t(\lambda_c - \lambda_l) + \frac{t^2(\lambda_c - \lambda_l)^2}{2!} \right) \right] \quad (4.7)$$

Nous voyons sur la figure 4.14 que ce modèle (courbe noire) décrit bien mieux nos données. L'interpolation définit un événement long de temps caractéristique $38 (\pm 4)$ s ainsi que trois temps courts de $1,4 (\pm 0,4)$ s. L'efficacité de traduction vaut alors $69 (\pm 5)$ %.

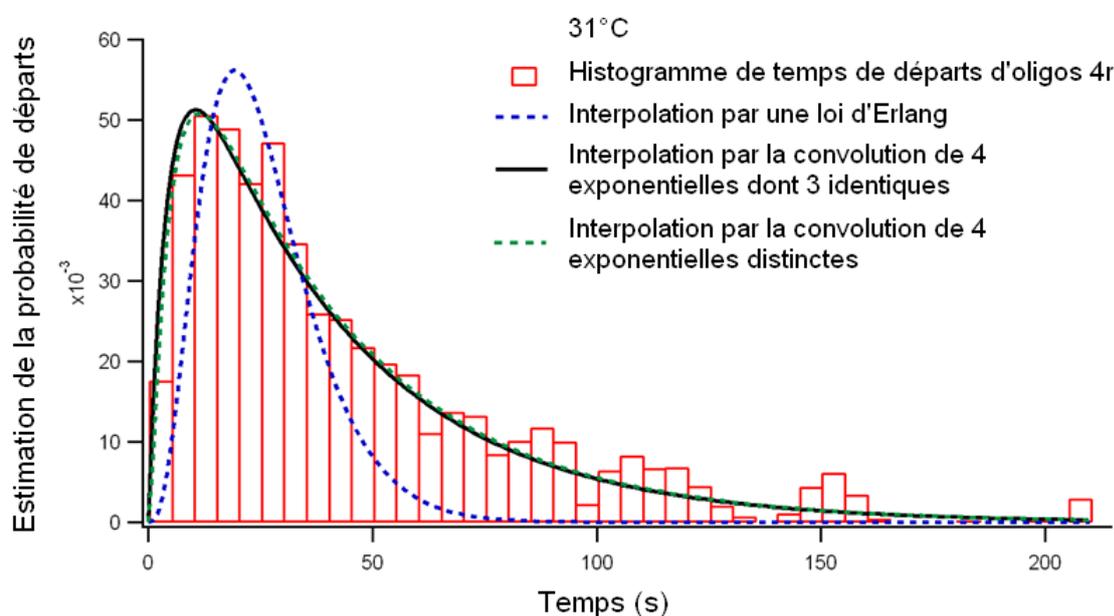


FIGURE 4.14 – Différentes interpolations d'un histogramme (en rouge) de temps de départs d'ATTO lors d'une traduction (normé par rapport à un contrôle sans IRES). En bleu une loi d'Erlang ($n = 4$) avec des cycles d'élongation de 6 s ; en noir la convolution de quatre lois exponentielles dont trois ont le même temps caractéristique, ajusté à près de 3,6 s, le dernier temps étant de 43 s ; en vert la convolution de quatre lois exponentielles distinctes où l'une d'entre elles a un temps caractéristique de 42 s et les autres de moins de 6,3 secondes seulement. Les courbes verte et noire sont en bon accord avec les données. Imposer trois temps caractéristiques identiques sur quatre (courbe noire) permet de s'affranchir de la grande incertitude d'interpolation présente pour la courbe verte à quatre temps distincts. Les données sont les mêmes que celles de la figure 4.13.

La courbe d'interpolation est bien meilleure lorsque l'on se donne deux temps caractéristiques distincts pour le premier cycle d'élongation et les suivants. Suivant cette logique, nous devons vérifier si autoriser encore plus de degrés de libertés permettrait un meilleur accord avec les données.

4.2 Étude de la traduction eucaryote entre l'initiation et un jalon

Modèle : quatre temps caractéristiques

Nous interpolons l'histogramme par la convolution de quatre exponentielles de temps caractéristiques distincts $\frac{1}{\lambda_i}$ (figure 4.14). Cette convolution possède une loi de probabilité de la forme suivante (avec $n = 4$) :

$$p(t) = H(t) \cdot \prod_{i=1}^n \lambda_i \cdot \sum_{i=1}^n \frac{e^{-\lambda_i t}}{\prod_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^n (\lambda_j - \lambda_i)} \quad (4.8)$$

Nous constatons sur la figure 4.14 que ce modèle (courbe verte) ne donne pas de résultat vraiment différent du modèle à deux temps caractéristiques. Le taux de traduction est de 70 (± 5) %. De plus, il fait naturellement ressortir un temps long de 38 (± 4) s et trois temps brefs de quelques secondes. Les temps courts sont interpolés avec un intervalle de confiance grand devant leur valeur. Différentes interpolations (en changeant les conditions initiales de l'algorithme par exemple) donnent des résultats très différents pour les temps courts. Cependant, leur somme se situe toujours autour de 11 s. Cela montre qu'il y a trop de degrés de liberté pour les paramètres dont les valeurs individuelles ne peuvent être déterminées par la seule interpolation des données. Nous pouvons en conclure que ce modèle ne permet pas d'extraire plus d'information des données que le modèle à seulement deux temps caractéristiques.

Modèle : deux simples exponentielles consécutives

On se rend compte que la forme de la loi de probabilité décrivant les événements rapides n'influe pas beaucoup sur la loi générale. En effet, la courbe ressemble principalement à la loi exponentielle décroissante de temps caractéristique long, excepté sur les premières images où l'ajout d'événements consécutifs, même brefs, retarde les premiers départs. Pour nous affranchir du paramètre représentant le nombre d'événements consécutifs rapides (trois jusqu'ici), nous essayons de remplacer les événements rapides par un seul événement de loi exponentielle. Il ne faut pas oublier que la loi de probabilité utilisée pour l'interpolation n'est qu'un modèle qui ne prétend pas décrire parfaitement le phénomène biologique mais simplement en extraire des paramètres. Une telle loi exponentielle nous donnera autant d'informations que trois consécutives pour la phase d'élongation comme le montre la figure 4.15. Sa forme analytique est alors celle de l'équation (4.8) avec $n = 2$:

$$p(t) = H(t) \lambda_1 \lambda_2 \frac{e^{-\lambda_1 t} - e^{-\lambda_2 t}}{(\lambda_2 - \lambda_1)} \quad (4.9)$$

Interprétation

Cette dernière méthode d'interpolation semble être celle qui assure le meilleur compromis entre simplicité du modèle et fidélité aux données. Des deux temps obtenus, le temps long

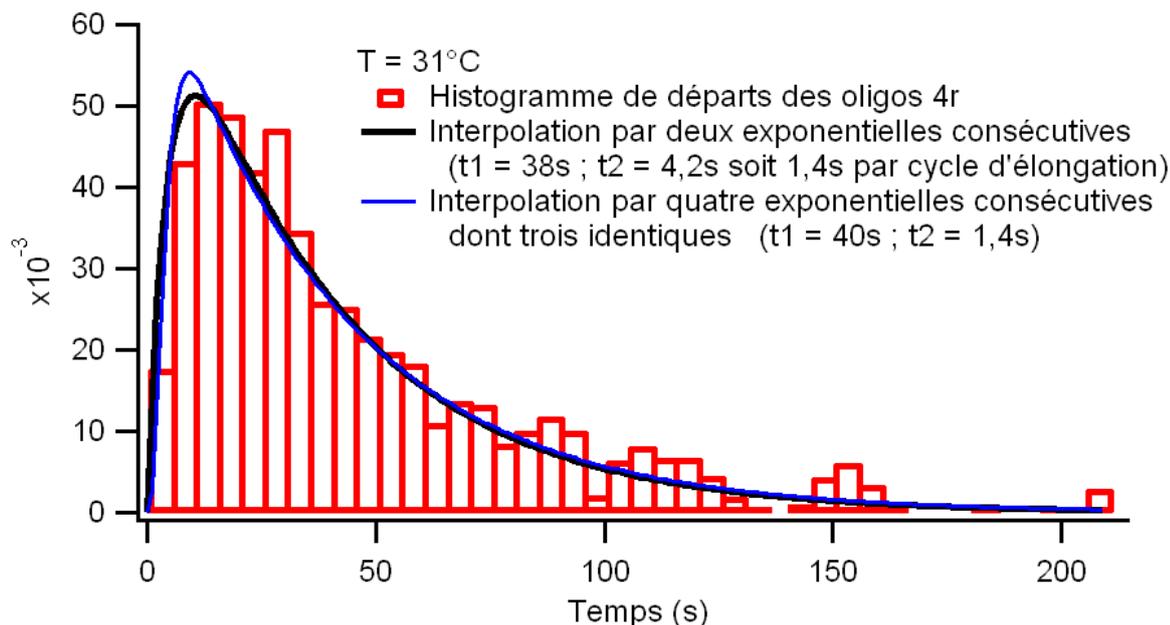


FIGURE 4.15 – Interpolation des temps de départs. Les données sont en rouge (même courbe qu'à la figure 4.13), en bleu l'interpolation par la convolution de quatre exponentielles dont trois à temps caractéristiques identiques, en noir l'interpolation par la convolution de deux exponentielles. Les temps obtenus sont similaires et les courbes proches l'une de l'autre.

représente alors le retard au départ de l'IRES et le temps court de la seconde exponentielle représente les trois cycles d'élongation rapides. Cela n'est pas forcément surprenant et l'on peut avancer plusieurs explications. Tout d'abord, il est probable que l'initiation par IRES, ne nécessitant aucun facteur d'initiation, soit plus stable que l'initiation conventionnelle. Le ribosome peut alors prendre plus de temps pour effectuer la première translocation ([60] montre que l'IRES HCV peut ralentir le ribosome).

Nous avons constaté que modifier la loi de probabilité utilisée pour modéliser la partie rapide de l'élongation n'avait que peu d'influence sur la forme de la courbe. Cela signifie que l'on ne peut se prononcer sur le modèle le plus réaliste pour les cycles d'élongation. Cependant, cela n'a que peu d'influence sur les temps caractéristiques mesurés. Ces données donnent donc un temps long d'une quarantaine de secondes et des temps courts de quelques secondes dès que le modèle utilisé arrive à s'approcher des données. La décroissance exponentielle lente est évaluée sur plusieurs dizaines de points, la valeur du temps caractéristique obtenue est donc relativement fiable. La fonction d'interpolation donne un temps long de $38 (\pm 4)$ s. L'évaluation des événements rapides est très sensible à la valeur du nombre de disparitions sur les trois ou quatre premières images et peu sensible au reste. On peut d'ailleurs le vérifier en traçant une courbe en modifiant la valeur des temps courts : une différence apparaît sur les premières images et la pente de la partie croissante de la courbe tandis que la partie décroissante reste

4.2 Étude de la traduction eucaryote entre l'initiation et un jalon

quasi-inchangée. Évaluer un paramètre sur quelques points seulement implique une précision plus faible. Ici, la fonction d'interpolation donne un temps court de $1,4 (\pm 0,4)$ s. De plus, le début de l'expérience est marqué par l'arrivée des extraits cellulaires avec une incertitude temporelle de 1 à 2 secondes.

Nous avons un ordre de grandeur pour le temps d'un cycle d'élongation qui est de l'ordre de la seconde, ce qui est parfaitement en accord avec les valeurs obtenues à la section 4.1.3 (page 83). Cela confirme ce modèle où le départ de l'IRES est une opération lente devant l'élongation.

4.2.2 Comparaison avec des séquences traduites plus longues

Nous venons d'étudier le départ d'oligos-ATTO censés disparaître après quatre cycles d'élongation. Il est possible de décaler l'oligo sur l'ARNm pour modifier ce nombre de translocations avant départ. Nous avons déjà vu à la section 4.1 que nous pouvons voir partir des oligos placés plus loin sur l'ARN : les oligos 13v. Ces derniers sont détachés après treize cycles d'élongation. Nous avons également effectué des tests avec d'autres ARNm possédant trois codons supplémentaires entre l'IRES et la position de l'oligo 4r. Nous changeons alors son appellation en oligo 7r bien qu'identique au 4r. En effet, l'intérêt d'allonger la séquence d'ARNm au lieu de déplacer l'oligo est que nous avons strictement la même séquence d'hybridation. Les vitesses de déshybridation sans et avec passage du ribosome sont alors les mêmes.

Nous effectuons donc les mêmes expériences que précédemment en remplaçant l'ARNm par un autre allongé de neuf bases. Nous conservons la même méthode d'interpolation, c'est à dire une convolution de deux exponentielles distinctes, l'une représentant le départ de l'IRES, l'autre l'élongation. Nous obtenons (figure 4.16) un temps long de $50 (\pm 4)$ s pour la première translocation, et un court dont l'incertitude est grande devant sa valeur.

On se demande dans quelle mesure une variation de ces valeurs reste compatible avec les données. Pour cela, nous refaisons une interpolation en forçant le temps long à prendre la valeur de 38 s qui est celle que nous avons obtenue avec l'oligo 4r. Nous obtenons la courbe bleue de la figure 4.16 qui reste proche des données. Dans ce cas, la valeur d'un cycle d'élongation (un sixième du temps caractéristique court) est de $0,4 (\pm 0,1)$ s.

L'incertitude que nous avons sur le début de l'expérience entre l'instant d'arrivée des extraits cellulaires et le début de l'acquisition est de l'ordre de 1 à 2 s. De plus, nous avons en début de séquence d'acquisition une hausse du fond de fluorescence due aux extraits cellulaires qui peut éventuellement provoquer une incertitude sur les premières images. Enfin, nous avons vu que nous estimons à 7 le nombre de cycles nécessaires au ribosome pour atteindre et détacher l'oligo 7r mais que ce nombre peut varier selon la position réelle du site hélicase du ribosome (il est envisageable que le ribosome n'ait à faire qu'uniquement 6 cycles d'élongations et non 7). Le temps court étant évalué sur ces premières images, il paraît raisonnable de n'en tirer qu'un ordre de grandeur.

Sans chercher à extraire trop d'information de cette courbe, nous voyons tout de même

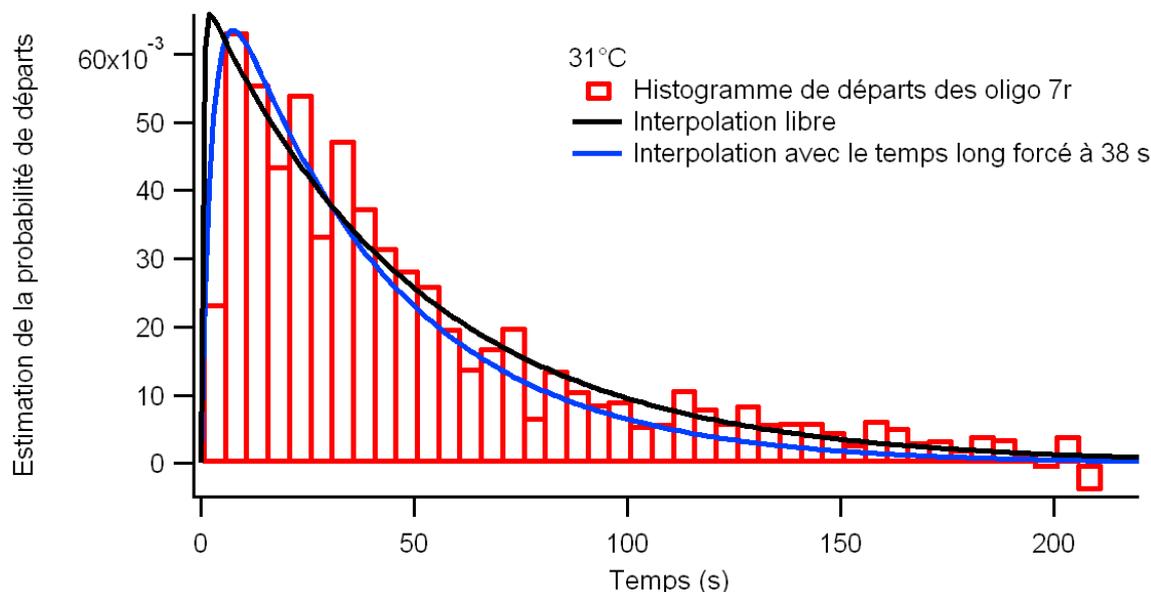


FIGURE 4.16 - Taux de départs des oligos 7r après correction par le contrôle sans IRES. Ces données proviennent de 5 expériences et correspondent à 5755 points analysés. L'interpolation par la convolution de deux exponentielles (courbe noire) donne un temps long de 50 secondes, le temps court est quasiment inexistant. Si on fixe le temps long à 38 s, on obtient la courbe bleue qui reste très proche des données.

qu'en passant de quatre à sept cycles d'élongation avant le départ des oligos, on est loin de doubler les temps de départs. Cela confirme que le ribosome est relativement rapide en phase d'élongation. Le temps moyen n'étant alors pas proportionnel au nombre de translocations, on retrouve un temps additif long indépendant de la longueur de la séquence traduite. Cela confirme notre hypothèse du retard au départ de l'IRES.

Selon les mêmes principes, nous pouvons aussi analyser les temps de départ des oligos 13v que nous avons déjà observés à la section 4.1. Nous n'avons étudié que leurs temps de départ rapportés à celui d'un oligo 4r placé en amont de l'ARNm. En regardant les temps de départs par rapport à l'injection des extraits cellulaires, nous pouvons vérifier si l'on constate toujours un retard au démarrage comme dans le cas des oligos 4r et 7r. Notons que dans ce cas, le ribosome qui atteint l'oligo 13v a déjà déshybridé l'oligo 4r placé avant.

Nous obtenons sur la figure 4.17 les taux de départs de ces oligos. Avec le même modèle à deux événements consécutifs, nous obtenons un temps long de 38 (± 10) s et des cycles d'élongation d'environ 0,9 ($\pm 0,4$) s. Cela correspond bien aux chiffres de l'ATTO 4r avec une incertitude plus grande. Cela s'explique par le plus grand bruit statistique, la courbe de l'oligo 13v étant obtenue à partir de 1315 points, celle de l'oligo 4r avec 7112 points.

Nous résumons dans le tableau 4.1 les différents temps obtenus à partir des données des oligos 4r et 13v.

4.2 Étude de la traduction eucaryote entre l'initiation et un jalon

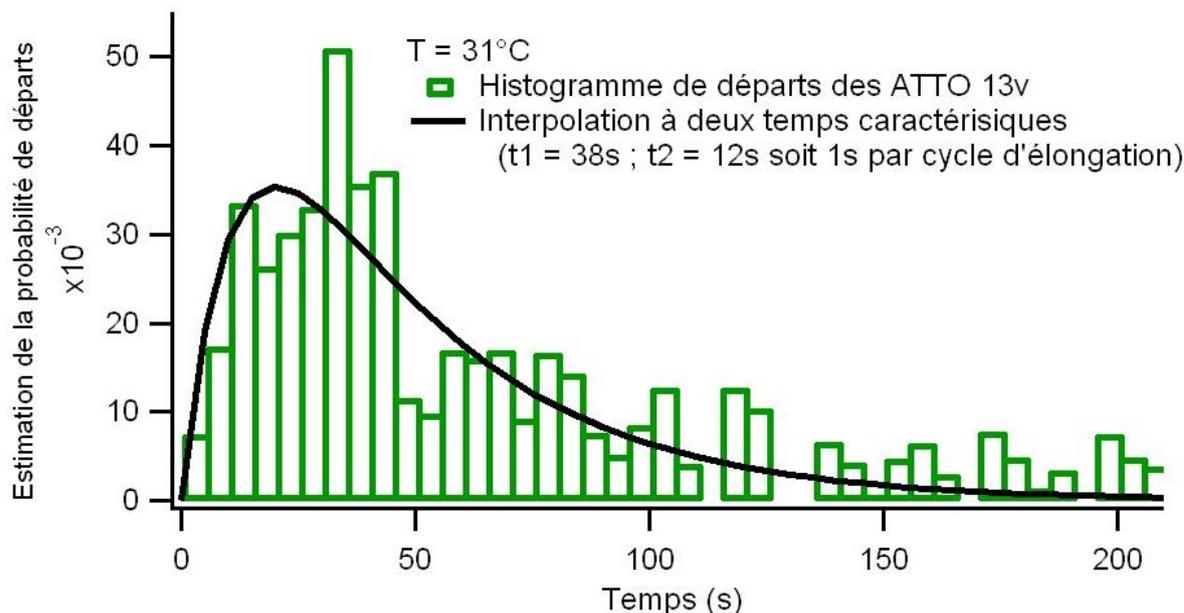


FIGURE 4.17 – Taux de départs des oligos ATTO verts après correction par le contrôle sans IRES. L'interpolation donne un temps long de $38 (\pm 10)$ s et un temps de cycle d'élongation de $0,9 (\pm 0,4)$ s. Les données proviennent de 1315 points sur 7 expériences.

Oligo	Temps de départ de l'IRES (s)	Temps d'un cycle d'élongation (s)
4r	38 (± 4)	1,4 ($\pm 0,4$)
13v	38 (± 10)	0,9 ($\pm 0,4$)
13v - 4r	-	1,3 ($\pm 0,1$)

TABLE 4.1 – Temps caractéristiques des cinétiques de départs dus à la traduction pour les oligos 4r et 13v. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur quel que soit l'oligo dont on étudie le temps de départ. Le temps long est relativement bien déterminé, avec une meilleure précision pour l'étude de l'oligo 4r où l'on a le moins de bruit statistique. La précision du temps court est la meilleure pour l'expérience à deux couleurs car on s'affranchit des incertitudes du début et du délai dû au départ de l'IRES.

La compatibilité des chiffres obtenus pour les différentes expériences valide le modèle proposé. Le ribosome positionné sur l'IRES en début d'expérience prend un certain temps de l'ordre de quarante secondes pour s'affranchir de cette structure. Il se déplace ensuite le long de l'ARNm à une vitesse de $1,3$ s par cycle d'élongation.

Nous envisageons de poursuivre ces expériences en rallongeant la taille de l'ARNm afin de placer le jalon plus loin de l'IRES. Ainsi, le temps d'élongation sera plus grand et l'on aura une meilleure précision sur la durée d'un cycle d'élongation. Nous serons également moins sensibles aux incertitudes sur le temps d'arrivée du RRL et sur la position du site hélicase.

4.3 Conclusion

Nous avons, grâce à nos expériences de suivi de traduction par microscopie de fluorescence, pu faire l'une des premières observations de l'activité de ribosomes de mammifère *in vitro* en molécule unique.

De plus, nous avons pu extraire un temps caractéristique d'élongation pour les traductions observées. Nous avons une vitesse d'élongation de l'ordre de 1,3 s par cycle d'élongation soit 0,78 cycle par seconde. Cette vitesse est en accord avec celles obtenues par Petrov *et al.* [37] de 0,1 à 1 cycle par seconde.

Nous avons également observé un temps long lors des premiers cycles d'élongation. Ce temps s'explique par la dissociation du ribosome et de l'IRES lors du premier cycle d'élongation. En effet, cet IRES est capable de recruter un ribosome eucaryote sans aucun facteur d'initiation ce qui laisse supposer que l'IRES interagit fortement avec le ribosome. Le temps trouvé d'une quarantaine de secondes, nécessaire à la séparation du ribosome et de l'IRES, n'est donc pas surprenant.

Pour compléter ces résultats, il serait intéressant de comparer différents cas proches.

Tout d'abord, nous pouvons éloigner les deux oligos marqués l'un de l'autre pour mesurer des temps correspondants à plus de cycles d'élongation. Plus ces cycles seront nombreux, plus nous pourrions être précis sur la durée d'un cycle. Nous pourrions également comparer des séquences demandant l'incorporation d'acides aminés plus ou moins rares.

Ensuite, nous souhaitons pouvoir approfondir l'étude du temps long au départ de l'IRES. Pour cela, nous pouvons refaire ces mêmes expériences en ne complexant pas le ribosome sur l'IRES mais en procédant à une initiation eucaryote avec tous les facteurs d'initiation purifiés. Sans les facteurs d'élongation le ribosome attendra l'arrivée des extraits cellulaires pour passer en phase d'élongation. Nous verrons alors dans quelle mesure le ralentissement est dû à l'IRES ou à l'injection d'extraits cellulaires sur un ribosome traduisant près d'une surface.

Nous voulons également comparer l'effet de l'IRES CrPV avec celui d'autres IRES. Ces autres IRES ont besoin de certains facteurs de traduction et nous pourrions les classer selon le ralentissement induit sur le début de la traduction. La figure 4.18 montre trois IRES différents nécessitant plus ou moins de facteurs d'initiation.

Ces expériences pourront alors apporter un éclairage nouveau sur le fonctionnement des IRES.

4.3 Conclusion

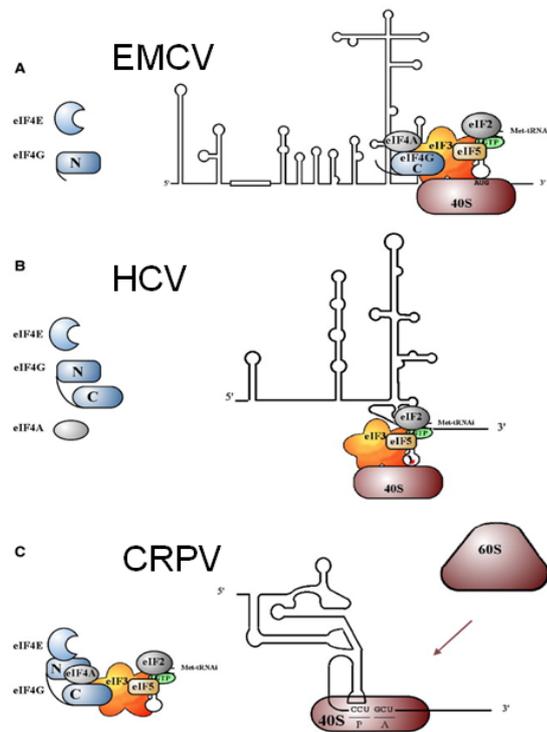


FIGURE 4.18 – Trois IRES différents. Le premier provient de nombreux virus comme par exemple celui de l'encéphalomyocardite (EMCV) et a besoin de l'ARNt-Met chargé, de GTP et des facteurs *eIF2*, *eIF3*, *eIF4A*, *eIF4G-C* et *eIF5*. Le second provient de flavivirus tels le virus de l'hépatite C (HCV) et demande l'ARNt-Met chargé, la GTP et les facteurs *eIF2*, *eIF3*, et *eIF5*. Le troisième est issu de dicistrovirus incluant le CrPV dont nous utilisons l'IRES, ce type d'IRES n'a besoin d'aucun facteur d'initiation. Figure extraite de [61].

Conclusion générale et perspectives

Nous avons décrit dans ce manuscrit les travaux de recherche effectués au cours des trois dernières années au sein de l'équipe *molécule unique* du groupe Biophotonique du Laboratoire Charles Fabry. Notre équipe s'intéresse à l'étude de la cinétique de la traduction, en particulier eucaryote, à l'échelle de la molécule unique. Cette étude s'inscrit dans un domaine de recherche récent, les études sur des ribosomes uniques ayant fait leur apparition au début des années 2000.

Nous avons présenté notre approche pour étudier la traduction eucaryote, et plus particulièrement l'élongation. Pour pouvoir obtenir des informations sur la vitesse d'élongation, nous avons exploité l'activité hélicase des ribosomes leur permettant de séparer deux brins d'ARN complémentaires. Nous hybridons 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.

Ce montage nous a permis d'observer des fluorophores de deux couleurs différentes en temps réel sur plusieurs minutes à partir de l'instant d'arrivée d'extraits cellulaires au niveau de nos ribosomes marquant le début des traductions. Les données générées se présentent sous la forme de films sur lesquels les fluorophores sont visibles en tant que points immobiles pouvant disparaître au cours du temps.

L'analyse de ces données a représenté une part importante du travail. En effet, il s'agissait de détecter des points d'intensité variable avec un fond de fluorescence variable spatialement, de comparer différentes images pour repérer les différents fluorophores colocalisés et enfin de déterminer l'instant de disparition éventuel de chaque fluorophore. Le programme implémenté devait être adaptable à des images de fluorophores différents (intensité, niveaux de bruit et forme de la zone d'excitation différents). Nous avons donc mis au point un programme répondant à ces besoins. Le code du programme pourra être aisément modifié pour s'adapter aux expériences futures de l'équipe.

Ainsi traitées, les données recueillies ces deux dernières années nous ont permis d'obtenir de nouvelles informations sur l'élongation des ribosomes de mammifères. Premièrement nous avons évalué une vitesse d'élongation eucaryote *in vitro* en molécule unique de 0,78 cycle par seconde en accord avec les vitesses mesurées *in vitro* dans la littérature. Cette vitesse pourra

servir de référence lors d'études ultérieures où l'on pourra étudier les variations de la vitesse d'élongation sous certaines conditions. Ensuite, nous avons remarqué l'existence d'un événement cinétiquement limitant au début de nos cycles d'élongation. Ce retard, dont le temps caractéristique est d'environ 38 s, est imputé au départ de la traduction depuis l'IRES CrPV qui interagit fortement avec le ribosome [40]. Ce dernier prend donc plus de temps à effectuer le premier cycle d'élongation.

Nous possédons désormais le moyen d'aborder de nombreuses questions biologiques par une approche de molécule unique. Il sera aisé d'espacer les deux oligos marqués pour pouvoir étudier des séquences nucléiques plus longues.

Nous pouvons en particulier analyser des comportements non canoniques du ribosome sur certaines séquences d'ARNm, à savoir des erreurs programmées du ribosome induites par des séquences ou des structures spécifiques de l'ARNm et/ou de co-facteurs (figure 4.19).

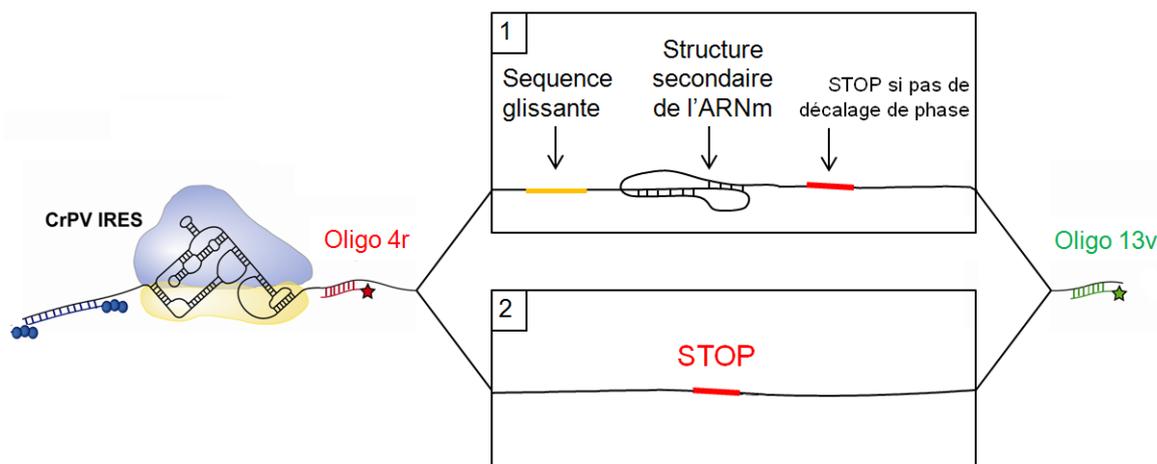


FIGURE 4.19 – Schéma des modifications du système rapporteur en vue de l'étude du décalage de la phase de lecture (1) et du franchissement du codon stop (2). Dans le premier cas, nous insérons une séquence glissante suivie d'une structure secondaire sur l'ARNm pour favoriser le décalage. Si le ribosome décale sa phase de lecture, il ne verra pas le codon stop en aval et pourra déshybrider le second oligo. Dans le second cas, le codon stop a un contexte nucléotidique propice à son franchissement.

Le premier type de comportement non-canonique que nous souhaitons observer est le décalage du cadre de lecture du ribosome [62]. Un tel décalage peut survenir aussi bien vers l'extrémité 5' que 3' de l'ARNm et modifie les codons lus par le ribosome et la séquence de la protéine en cours de traduction. Ces décalages de la phase de lecture sont rares mais peuvent être plus fréquents lors de l'incorporation d'un acide aminé rare et surtout lors du franchissement d'une structure secondaire de l'ARNm. La présence d'une séquence glissante sur laquelle le ribosome peut se translater d'un nucléotide sans perdre trop d'énergie est également un facteur augmentant le risque d'erreur. Dans ce cas, le ribosome ralentit avant de se décaler [63,64].

4.3 Conclusion

Nous nous demandons alors si ce ralentissement est amplifié chez les ribosomes changeant de phase de lecture. Les ribosomes concernés sont minoritaires, les plus grandes efficacités de décalage jamais constatées atteignant des taux proches de 50 % [65]. Dans de nombreux autres cas, la fraction de ribosomes en décalage ne dépasse pas le dixième. Notre système rapporteur, en permettant de comparer des vitesses moyennes d'élongation sur plusieurs cycles, est particulièrement adapté à des mesures de ralentissement.

Un autre comportement rare à étudier est le franchissement de codons stop prématurés. Ceux-ci apparaissent dans le code génétique suite à des mutations et peuvent conduire à des maladies génétiques, car une protéine n'est pas synthétisée correctement. Cependant, il peut arriver que le ribosome n'achève pas la traduction à la lecture de ce stop prématuré mais qu'il le franchisse et poursuive la traduction [66,67]. Il s'agit de la translecture. Le taux de franchissement est dépendant du contexte nucléotidique (les nucléotides proches du codon stop). Nous souhaitons déterminer, dans le cadre de notre collaboration avec l'équipe d'Olivier Namy de l'IGM, le rôle de la cinétique de traduction dans l'efficacité de translecture.

Enfin, nous désirons également utiliser notre montage de microscopie de fluorescence pour étudier l'instant d'arrivée de protéines chaperonnes sur la chaîne polypeptidique en cours de synthèse (image 4.20). Nous savons que des protéines viennent modifier co-traductionnellement la chaîne naissante et l'aider à se replier en se fixant sur le ribosome au niveau du tunnel de sortie de la nouvelle protéine. Cependant, nous ne savons pas si cette arrivée se fait dès la sortie de la nouvelle protéine ou après la traduction d'un certain nombre de codons.

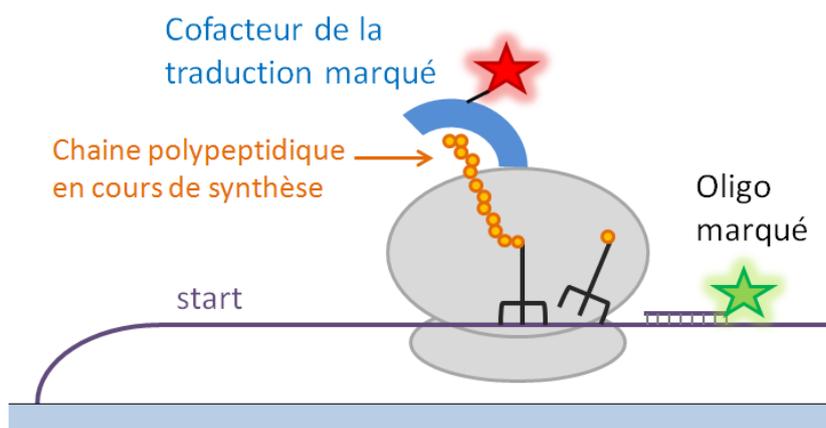


FIGURE 4.20 – Schéma d'une expérience permettant de comparer l'instant d'arrivée d'un cofacteur marqué avec le passage du ribosome à un endroit précis de l'ARNm, déterminé par la déshybridation d'un oligo fluorescent.

Nous avons déjà effectué quelques expériences préliminaires, en collaboration avec l'équipe de Dominique Fourmy du CGM et celle de Carmela Giglione de l'ISV (Institut des Sciences du Végétal), pour tenter de voir si ces protéines chaperonnes marquées se fixaient déjà sur un ribosome initié sur l'ARNm n'ayant pas commencé l'étape d'élongation. Il s'est avéré que

l'affinité entre ces protéines et le ribosome vide (ne contenant pas encore une protéine en cours de synthèse) n'était pas compatible avec notre étude à l'échelle de la molécule unique : il faudrait utiliser $1 \mu M$ de protéines marquées en solution ce qui rendrait le niveau d'intensité du fond trop importante pour pouvoir observer des molécules uniques en surface. Nous ne renonçons pas pour autant car il est connu que l'affinité de ces protéines augmente pour un ribosome en cours de traduction, ce qui constitue la prochaine étape à passer pour progresser sur ce projet.

Chacune de ces études est intéressante mais si nous sommes à présent confiants sur leur faisabilité, elles représentent tout de même un investissement expérimental élevé. Les prochaines expériences à effectuer seront certainement liées à l'étude de la translecture car d'une part il s'agit du centre d'intérêt de nos collaborateurs et, d'autre part, les taux de passage du ribosome au niveau du second oligo en présence ou non du codon stop prématuré seront certainement les données les plus faciles à obtenir.

Protocoles

Protocoles extraits de [3].

Solutions :

Tampon B(NaAc) : 20 *mM* Hepes pH 7,8 ; 250 *mM* NaAc ; 100 *mM* KAc ; 2,5 *mM* MgAc ; 2 *mM* DTT¹ et 0,25 *mM* spermidine.

1 μ M **ARNm (opt ATTO)** (XhoI) ; 10 μ M **oligo-biotine (RNOB)** et 10 μ M **H12 (H12.3A.c, oligo 4r)** et le cas échéant 10 μ M K12 (K12.3A.c, oligo 13v) ; 280 μ M **sous-unités ribosomiques**.

Solution mère de **cycloheximide** (500x) : 50 *mg/ml* dans de l'éthanol soit 178 *mM*. La solution 10x est préparée dans du tampon B (NaAc).

Appariement des oligonucléotides avec l'ARNm :

Mélanger 5 μ L ARNm + 2 μ L H₂O + 1,25 μ L oligo-biotine + 1,25 μ L H12 + 0,5 μ L tampon 10X T4 DNA ligase (Promega) soit 0,5 μ M ARNm, 1,25 μ M oligo-biotine et 1,25 μ M H12. Incuber les 10 μ L à 68 °C pendant 5 *min*, 37 °C pendant 5 *min* et garder dans la glace.

Faire une dilution au 1/100 dans du tampon B (NaAc) : 98 μ L de tampon + 1 μ L hybridation + 1 μ L SuperaseIn (20 *u*/ μ L, NEB). (5 *nM* ARNm, 12,5 *nM* oligo-biotine et 12,5 *nM* H12)

Accroche des sous-unités ribosomiques sur les ARNm :

Mélanger 17,5 μ L tampon B (NaAc) + 5 μ L d'appariement ARNm/oligos + 2,5 μ L sous-unités ribosomiques. Incuber 10 *min* à 37 °C et injecter dans la cellule microfluidique. Laisser incuber 10 *min* avant de rincer avec du tampon B(NaAc) et d'injecter le RRL. (1 *nM* ARNm, 2,5 *nM* oligo-biotine, 2,5 *nM* H12 et 28 *nM* ribosomes)

Dans le cas du contrôle sans ribosome, mélanger 20 μ L tampon B (NaAc) + 5 μ L d'appariement ARNm/oligos.

Dans le cas du contrôle avec cycloheximide, mélanger : 15 μ L tampon B (NaAc) + 5 μ L d'appariement ARNm/oligos + 2,5 μ L sous-unités ribosomiques + 2,5 μ L 10x cycloheximide. Le rinçage de la cellule microfluidique est réalisé avec du tampon B (NaAc)

1. Solution fraîche de DTT

1x cycloheximide.

Préparation du RRL :

Mélanger 17,5 μL de RRL (Promega) + 6 μL H_2O + 1 μL SuperaseIn (20 u/ μL) + 0,5 μL acide aminé-Met (Promega). Incuber 10 *min* à 30 °C avant de l'injecter dans la cellule microfluidique.

Dans le cas du contrôle avec cycloheximide, mélanger : 17,5 μL de RRL (Promega) + 3,5 μL H_2O + 1 μL SuperaseIn (20 u/ μL) + 0,5 μL acide aminé-Met (Promega) + 2,5 μL 10x cycloheximide.

Glossaire

70S - 50S - 30S	Procaryote : ribosome entier - grande sous-unité - petite sous-unité
80S - 60S - 40S	Eucaryote : ribosome entier - grande sous-unité - petite sous-unité
ADN	A cide D éoxyribo N ucléique
ARN _m	A cide R ibo N ucléique m essenger
ARN _r	A cide R ibo N ucléique ribosomique
ARN _t	A cide R ibo N ucléique de transfert
CGM	C entre de G énétique M oléculaire
CrPV	C ricket P aralysis V irus - <i>virus de la paralysie du grillon</i>
FRET	F örster R esonance E nergy T ransfert - <i>transfert d'énergie par résonance de type Förster</i>
GDP/GTP	G uanosine D i P hosphate / G uanosine T ri P hosphate
GFP	G reen F luorescent P rotein - <i>protéine fluorescente verte</i>
IGM	Institut de G énétique et M icrobiologie
IRES	I nternal R ibosome E nter S ite - <i>site interne d'entrée du ribosome</i>
ISV	Institut des S ciences du V égétal
Oligo	Oligonucléotide
PEG	P oly E thylène G lycol
ROXS	R educing and O Xidizing S ystem - <i>système oxydant et réducteur</i>
RRL	R abbit R eticulocyte L ysate - <i>lysate de réticulocytes de lapin</i>
TIRF	T otal I nternal R eflection F luorescence microscopy - <i>microscopie de fluorescence par réflexion totale</i>
ZMW	Z ero M ode W aveguide

Bibliographie

- [1] D. Dulin. *Observation de l'activité traductionnelle d'un ribosome unique par microscopie de fluorescence couplée à un système microfluidique*. PhD thesis, Université Paris XI, 2009. (page 1)
- [2] A. Le Gall. *Pince optique et microscopie de fluorescence pour l'étude de la synthèse des protéines en molécule unique*. PhD thesis, Université Paris XI, 2011. (pages 1, 23, 36 et 47)
- [3] H. Chommy. *Fidélité de la traduction chez les eucaryotes : de la molécule au génome*. PhD thesis, Université Paris XI, 2012. (pages 2, 47 et 103)
- [4] F. Collins, E. Lander, J. Rogers, R. Waterston, and I. Conso. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431(7011) : 931–945, 2004. (page 6)
- [5] R. A. Marshall, C. E. Aitken, M. Dorywalska, and J. D. Puglisi. Translation at the single-molecule level. *Annual Review of Biochemistry*, 77 : 177–203, 2008. (page 9)
- [6] G. E. Palade. A small particulate component of the cytoplasm. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 1(1) : 59, 1955. (page 10)
- [7] B. T. Wimberly, D. E. Brodersen, W. M. Clemons, R. J. Morgan-Warren, A. P. Carter, C. Vonrhein, T. Hartsch, and V. Ramakrishnan. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, 407(6802) : 327–339, 2000. (page 10)
- [8] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, and T. A. Steitz. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, 289(5481) : 905–920, 2000. (page 10)
- [9] F. Schluenzen, A. Tocilj, R. Zarivach, J. Harms, M. Gluehmann, D. Janell, A. Bashan, H. Bartels, I. Agmon, F. Franceschi, et al. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *Cell*, 102(5) : 615–623, 2000. (page 10)
- [10] S. Takyar, R. P. Hickerson, and H. F. Noller. mRNA helicase activity of the ribosome. *Cell*, 120(1) : 49–58, 2005. (pages 10, 11, 12, 20, 28, 45, 75 et 76)
- [11] D. Axelrod. Evanescent excitation and emission in fluorescence microscopy. *Biophysical journal*, 104(7) : 1401–1409, 2013. (page 14)
- [12] S. Uemura, C. E. Aitken, J. Korlach, B. A. Flusberg, S. W. Turner, and J. D. Puglisi. Real-time tRNA transit on single translating ribosomes at codon resolution. *Nature*, 464(7291) : 1012–1017, 2010. (pages 15, 16 et 20)

- [13] W. Moerner and D. P. Fromm. Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy. *Review of Scientific Instruments*, 74(8) : 3597–3619, 2003. (page 15)
- [14] R. Roy, S. Hohng, and T. Ha. A practical guide to single-molecule FRET. *Nature methods*, 5(6) : 507–516, 2008. (page 15)
- [15] J. Hohlbein, K. Gryte, M. Heilemann, and A. N. Kapanidis. Surfing on a new wave of single-molecule fluorescence methods. *Physical biology*, 7(3) : 031001, 2010. (page 15)
- [16] D. W. Piston and G.-J. Kremers. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends in biochemical sciences*, 32(9) : 407–414, 2007. (page 17)
- [17] C. Chen, H. Zhang, S. L. Broitman, M. Reiche, I. Farrell, B. S. Cooperman, and Y. E. Goldman. Dynamics of translation by single ribosomes through mRNA secondary structures. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2013. (pages 17, 18, 19, 21 et 28)
- [18] S. C. Blanchard, H. D. Kim, R. L. Gonzalez, J. D. Puglisi, and S. Chu. tRNA dynamics on the ribosome during translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(35) : 12893–12898, 2004. (page 20)
- [19] S. C. Blanchard, R. L. Gonzalez, H. D. Kim, S. Chu, and J. D. Puglisi. tRNA selection and kinetic proofreading in translation. *Nature structural & molecular biology*, 11(10) : 1008–1014, 2004. (pages 20 et 23)
- [20] T.-H. Lee, S. C. Blanchard, H. D. Kim, J. D. Puglisi, and S. Chu. The role of fluctuations in tRNA selection by the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(34) : 13661–13665, 2007. (page 20)
- [21] R. L. Gonzalez, S. Chu, and J. D. Puglisi. Thiostrepton inhibition of tRNA delivery to the ribosome. *RNA*, 13(12) : 2091–2097, 2007. (page 20)
- [22] R. A. Marshall, M. Dorywalska, and J. D. Puglisi. Irreversible chemical steps control intersubunit dynamics during translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(40) : 15364–15369, 2008. (pages 20 et 23)
- [23] P. V. Cornish, D. N. Ermolenko, D. W. Staple, L. Hoang, R. P. Hickerson, H. F. Noller, and T. Ha. Following movement of the L1 stalk between three functional states in single ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(8) : 2571–2576, 2009. (page 20)
- [24] P. C. Whitford, P. Geggier, R. B. Altman, S. C. Blanchard, J. N. Onuchic, and K. Y. Sanbonmatsu. Accommodation of aminoacyl-tRNA into the ribosome involves reversible excursions along multiple pathways. *RNA*, 16(6) : 1196–1204, 2010. (page 20)
- [25] J. B. Munro, R. B. Altman, C.-S. Tung, J. H. Cate, K. Y. Sanbonmatsu, and S. C. Blanchard. Spontaneous formation of the unlocked state of the ribosome is a multistep process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(2) : 709–714, 2010. (page 20)

BIBLIOGRAPHIE

- [26] C. T. Ly, M. E. Altuntop, and Y. Wang. Single-molecule study of viomycin's inhibition mechanism on ribosome translocation. *Biochemistry*, 49(45) : 9732–9738, 2010. (page 20)
- [27] D. N. Ermolenko and H. F. Noller. mRNA translocation occurs during the second step of ribosomal intersubunit rotation. *Nature structural & molecular biology*, 18(4) : 457–462, 2011. (page 20)
- [28] A. Katranidis, D. Atta, R. Schlesinger, K. H. Nierhaus, T. Choli-Papadopoulou, I. Gregor, M. Gerrits, G. Büldt, and J. Fitter. Fast Biosynthesis of GFP Molecules: A Single-Molecule Fluorescence Study. *Angewandte Chemie*, 48 : 1758–1762, 2009. (pages 20, 21 et 83)
- [29] S. Uemura, R. Iizuka, T. Ueno, Y. Shimizu, H. Taguchi, T. Ueda, J. D. Puglisi, and T. Funatsu. Single-molecule imaging of full protein synthesis by immobilized ribosomes. *Nucleic acids research*, 36(12) : e70–e70, 2008. (page 20)
- [30] A. N. Fedorov and T. O. Baldwin. [1] Protein folding and assembly in a cell-free expression system. *Methods in enzymology*, 290 : 1–17, 1998. (page 21)
- [31] J. Yu, J. Xiao, X. Ren, K. Lao, and X. S. Xie. Probing gene expression in live cells, one protein molecule at a time. *Science*, 311(5767) : 1600–1603, 2006. (page 21)
- [32] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, M. Capel, P. B. Moore, and T. A. Steitz. Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit. *Nature*, 400(6747) : 841–847, 1999. (page 22)
- [33] M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. N. Earnest, J. Cate, and H. F. Noller. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science*, 292(5518) : 883–896, 2001. (page 22)
- [34] P. Chandramouli, M. Topf, J.-F. Ménétret, N. Eswar, J. J. Cannone, R. R. Gutell, A. Sali, and C. W. Akey. Structure of the mammalian 80S ribosome at 8.7 Å resolution. *Structure*, 16(4) : 535–548, 2008. (page 22)
- [35] J.-P. Armache, A. Jarasch, A. M. Anger, E. Villa, T. Becker, S. Bhushan, F. Jossinet, M. Habeck, G. Dindar, S. Franckenberg, et al. Cryo-EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(46) : 19748–19753, 2010. (page 22)
- [36] A. Ben-Shem, N. G. de Loubresse, S. Melnikov, L. Jenner, G. Yusupova, and M. Yusupov. The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*, 334(6062) : 1524–1529, 2011. (page 22)
- [37] A. Petrov and J. D. Puglisi. Site-specific labeling of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes for single-molecule manipulations. *Nucleic acids research*, 38(13) : e143–e143, 2010. (pages 22, 23, 83 et 96)

- [38] T. Budkevich, J. Giesebrecht, R. B. Altman, J. B. Munro, T. Mielke, K. H. Nierhaus, S. C. Blanchard, and C. M. Spahn. Structure and dynamics of the mammalian ribosomal pretranslocation complex. *Molecular cell*, 44(2) : 214–224, 2011. (pages 22 et 25)
- [39] J. B. Munro, R. B. Altman, N. O’Connor, and S. C. Blanchard. Identification of two distinct hybrid state intermediates on the ribosome. *Molecular cell*, 25(4) : 505–517, 2007. (page 22)
- [40] E. Jan and P. Sarnow. Factorless ribosome assembly on the internal ribosome entry site of cricket paralysis virus. *Journal of molecular biology*, 324(5) : 889–902, 2002. (pages 29, 48 et 100)
- [41] T. Barroca, K. Balaa, J. Delahaye, S. Lévêque-Fort, and E. Fort. Full-field supercritical angle fluorescence microscopy for live cell imaging. *Optics letters*, 36(16) : 3051–3053, 2011. (page 31)
- [42] S. De Monredon-Senani et al. *Interaction Organosilanes/Silice de précipitation Du milieu hydro-alcoolique au milieu aqueux*. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 2004. (page 40)
- [43] J. SantaLucia. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide dna nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(4) : 1460–1465, 1998. (page 41)
- [44] J. L. Chen, A. L. Dishler, S. D. Kennedy, I. Yildirim, B. Liu, D. H. Turner, and M. J. Serra. Testing the nearest neighbor model for canonical RNA base pairs: Revision of GU parameters. *Biochemistry*, 51(16) : 3508, 2012. (pages 41 et 44)
- [45] N. von Ahsen, C. T. Wittwer, and E. 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*, 47(11) : 1956–1961, 2001. (pages 41 et 44)
- [46] J. SantaLucia, H. T. Allawi, and P. A. Seneviratne. Improved nearest-neighbor parameters for predicting DNA duplex stability. *Biochemistry*, 35(11) : 3555–3562, 1996. (pages 43 et 44)
- [47] K. J. Breslauer, R. Frank, H. Blöcker, and L. A. Marky. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(11) : 3746–3750, 1986. (pages 43 et 44)
- [48] R. Owczarzy, P. M. Vallone, F. J. Gallo, T. M. Paner, M. J. Lane, and A. S. Benight. Predicting sequence-dependent melting stability of short duplex DNA oligomers. *Biopolymers*, 44(3) : 217–239, 1997. (page 43)
- [49] N. Sugimoto, S.-i. Nakano, M. Yoneyama, and K.-i. Honda. Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes. *Nucleic Acids Research*, 24(22) : 4501–4505, 1996. (page 43)

BIBLIOGRAPHIE

- [50] A. Le Gall, D. Dulin, G. Clavier, R. Méallet-Renault, P. Bouyer, K. Perronet, and N. Westbrook. Improved photon yield from a green dye with a reducing and oxidizing system. *ChemPhysChem*, 12(9) : 1657–1660, June 2011. (page 46)
- [51] J. Vogelsang, R. Kasper, C. Steinhauer, B. Person, M. Heilemann, M. Sauer, and P. Tinnefeld. A Reducing and Oxidizing System Minimizes Photobleaching and Blinking of Fluorescent Dyes. *Angewandte Chemie*, 47 : 5465–5469, 2008. (page 46)
- [52] C. E. Aitken, R. A. Marshall, and J. D. Puglisi. An Oxygen Scavenging System for Improvement of Dye Stability in Single-Molecule Fluorescence Experiments. *Biophysical Journal*, 94 : 1826–1835, 2008. (page 46)
- [53] I. Moll, G. Hirokawa, M. C. Kiel, A. Kaji, and U. Blasi. Translation initiation with 70S ribosomes: an alternative pathway for leaderless mRNAs. *Nucleic Acid Research*, 32(11) : 3354–3363, 2004. (page 48)
- [54] S. Takahashi, R. Akita, H. Matsuno, H. Furusawa, Y. Shimizu, T. Ueda, and Y. Okahata. 70 S ribosomes bind to Shine-Dalgarno sequences without required dissociations.. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 9(6) : 870–3, April 2008. (page 48)
- [55] O. Namy, S. J. Moran, D. I. Stuart, R. J. Gilbert, and I. Brierley. A mechanical explanation of RNA pseudoknot function in programmed ribosomal frameshifting. *Nature*, 441(7090) : 244–247, 2006. (page 48)
- [56] T. V. Pestova and C. U. Hellen. Translation elongation after assembly of ribosomes on the Cricket paralysis virus internal ribosomal entry site without initiation factors or initiator tRNA. *Genes & development*, 17(2) : 181–186, 2003. (pages 48, 85 et 86)
- [57] T. Schneider-Poetsch, J. Ju, D. E. Eyler, Y. Dang, S. Bhat, W. C. Merrick, R. Green, B. Shen, and J. O. Liu. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nature chemical biology*, 6(3) : 209–217, 2010. (pages 49 et 85)
- [58] A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman, and P. R. Selvin. Myosin V Walks Hand-Over-Hand: Single Fluorophore Imaging with 1.5 nm Localization. *Science*, 300(5628) : 2061–2065, 2003. (page 63)
- [59] A. Yildiz, M. Tomishige, R. D. Vale, and P. R. Selvin. Kinesin walks hand-over-hand. *Science*, 303(5658) : 676–678, 2004. (page 63)
- [60] M. E. Filbin, B. S. Vollmar, D. Shi, T. Gonen, and J. S. Kieft. HCV IRES manipulates the ribosome to promote the switch from translation initiation to elongation. *Nature structural & molecular biology*, 20(2) : 150–158, 2012. (page 92)
- [61] L. Balvay, R. S. Rifo, E. P. Ricci, D. Decimo, and T. Ohlmann. Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1789(9) : 542–557, 2009. (page 97)

- [62] P. J. Farabaugh. Programmed translational frameshifting. *Microbiological reviews*, 60(1) : 103, 1996. (page 100)
- [63] P. Somogyi, A. Jenner, I. Brierley, and S. Inglis. Ribosomal pausing during translation of an RNA pseudoknot. *Molecular and cellular biology*, 13(11) : 6931–6940, 1993. (page 100)
- [64] J. D. Lopinski, J. D. Dinman, and J. A. Bruenn. Kinetics of ribosomal pausing during programmed -1 translational frameshifting. *Molecular and cellular biology*, 20(4) : 1095–1103, 2000. (page 100)
- [65] A. M. Flower and C. S. McHenry. The gamma subunit of DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli* is produced by ribosomal frameshifting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(10) : 3713–3717, 1990. (page 101)
- [66] M. Cassan and J.-P. Rousset. UAG readthrough in mammalian cells: effect of upstream and downstream stop codon contexts reveal different signals. *BMC molecular biology*, 2(1) : 3, 2001. (page 101)
- [67] O. Namy, G. Duchateau-Nguyen, I. Hatin, S. Hermann-Le Denmat, M. Termier, and J.-P. Rousset. Identification of stop codon readthrough genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research*, 31(9) : 2289–2296, 2003. (page 101)

Étude cinétique de la traduction eucaryote à l'échelle de la molécule unique

Résumé : La synthèse des protéines est un mécanisme central de la vie cellulaire dont la compréhension est un enjeu du domaine biomédical. 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. Cette thèse présente les premiers résultats en molécule unique sur la traduction par un ribosome eucaryote (mammifère). Nous observons les systèmes traductionnels grâce à des marqueurs fluorescents liés à des oligonucléotides pouvant s'hybrider sur les séquences d'ARN traduites. L'observation de ces marqueurs est faite par microscopie de fluorescence en onde évanescente (TIRF), les ARN étant fixés sur une lamelle de microscope. En lisant l'ARN, le ribosome détache les marqueurs, et leurs instants de départs donnent des informations sur le passage du ribosome à différentes positions sur l'ARN. Cette méthode permet d'obtenir des données cinétiques sur un grand nombre de systèmes traductionnels en parallèle pouvant alors être interpolées par des lois de probabilité. Nous obtenons par cette méthode des mesures de la cinétique *in vitro* de l'élongation eucaryote et nous observons un délai dû à une initiation non-canonique. En effet, nous complexons le ribosome sur l'ARN grâce à une structure 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. Ces résultats ouvrent des perspectives d'étude cinétique dans des cas plus complexes tels le franchissement de structures secondaires de l'ARN.

MOTS CLÉS : Ribosome - Eucaryote - Molécule unique - Microscopie de fluorescence

Abstract: Protein synthesis is a central mechanism of cell life whose understanding is an issue in the biomedical field. Studies in single molecule can observe each reaction system individually and provide access to asynchronous events hardly observable in bulk, such as protein translation. This thesis presents one of the first single molecule study on the eukaryotic (mammalian) translation. We observe the translational systems using fluorescent markers linked to oligonucleotides hybridized to the RNA translated sequences. The observation of these markers is done by total internal reflection fluorescence microscopy, the RNA being attached to a microscope slide. By reading the RNA, the ribosome detaches the markers and their departure times provide information about the position of the ribosome at different times. This method provides kinetic data on a large number of parallel translational systems that can be interpolated by probability laws. By this method we measure the *in vitro* kinetics of eukaryotic elongation and we observe a delay due to a non-canonical initiation, as the ribosome is complexed on a RNA structure (IRES). In our experimental conditions, the incorporation of an amino acid in the nascent protein chain takes about one second while this structure induces a delay in translation of several tens of seconds. These results open up new horizons for kinetic study in more complex cases such as the ribosome reading RNA secondary structures.

KEYWORDS: Ribosome - Eukaryotic - Single molecule - Fluorescence microscopy
