



HAL
open science

Interactions entre l'ARN 23S et les protéines uL24 et uL4 dans l'assemblage de la grande sous-unité du ribosome : mesures de force par piège optique

Laurent Geffroy

► To cite this version:

Laurent Geffroy. Interactions entre l'ARN 23S et les protéines uL24 et uL4 dans l'assemblage de la grande sous-unité du ribosome : mesures de force par piège optique. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris sciences et lettres, 2017. Français. NNT : 2017PSLET020 . tel-02337704

HAL Id: tel-02337704

<https://theses.hal.science/tel-02337704>

Submitted on 29 Oct 2019

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.

THÈSE DE DOCTORAT

de l'Université de recherche Paris Sciences et Lettres
PSL Research University

Préparée à l'École Supérieure de Physique et de Chimie
Industrielles de la Ville de Paris

Interactions between 23S RNA and proteins uL24 and uL4 during the assembly of the large ribosomal subunit: force measurements by optical tweezers

Interactions entre l'ARN 23S et les protéines uL24 et uL4 dans l'assemblage de la grande sous-unité du ribosome: mesures de force par piège optique

Ecole doctorale n°564

PHYSIQUE EN ÎLE-DE-FRANCE

Spécialité PHYSIQUE

Soutenue par Laurent GEFROY
Le 4 décembre 2017

Dirigée par **Ulrich BOCKELMANN**
et **Thierry BIZEBARD**

COMPOSITION DU JURY :

Mme. ROMBY Pascale
Institut de Biologie Moléculaire et
Cellulaire, Rapporteur

Mme. PERRONET Karen
Institut d'Optique, Rapporteur

M. DREYFUS Marc
Institut de Biologie Physico-Chimique,
Président du jury

M. PÉDACI Francesco
Centre de Biochimie Structurale, Membre
du jury

M. CROQUETTE Vincent
École normale supérieure, Membre du
jury

M. BOCKELMANN Ulrich
ESPCI, Membre du jury

Table des matières

Remerciements	5
Introduction	7
I L'assemblage du ribosome d'<i>E. coli</i>	9
I.1 Le ribosome assure la synthèse des protéines	9
I.1.1 Le ribosome : un constituant majeur de la cellule	9
I.1.2 Le ribosome est constitué d'ARN et de protéines organisés en deux sous-unités	9
I.1.3 Le ribosome est l'élément central de la traduction	11
I.2 État de l'art de l'assemblage du ribosome	12
I.2.1 Biogenèse des constituants : synthèse et maturation	12
I.2.2 Assemblage en sous-unités : rôles de l'ARNr, des r-protéines et des facteurs externes	13
I.2.3 Expériences de reconstitution <i>in vitro</i> de la sous-unité 50S d' <i>E. coli</i>	15
a) Un processus en deux étapes	15
b) Première étape : particules intermédiaires $RI_{50}(1)$ et $RI_{50}^*(1)$	15
c) Carte d'assemblage <i>in vitro</i>	16
d) Deux initiateurs de l'assemblage	16
I.2.4 Études <i>in vivo</i> de l'assemblage	18
I.3 Systèmes étudiés dans la thèse	19
I.3.1 Fragment principalement étudié : ARN 23S 281-359	19
I.3.2 Fragment d'ARN 23S 991-1163	21
I.3.3 Problématiques de l'étude	21
II Mesures de force via un double piège optique	23
II.1 Dispositif expérimental	23
II.1.1 Principe de la mesure de force dans un piège optique	24
a) Qu'est-ce qu'un piège optique ?	24
b) Comment mesure-t-on des forces dans un piège optique ?	26
c) Mesure de la position relative de la bille dans le piège	26
II.1.2 Montage expérimental : double piège optique	27
II.2 Mise en place d'une expérience	30
II.2.1 Description de la construction moléculaire	30
II.2.2 Assemblage du complexe billes/molécule	30

II.2.3	Préparation de la cellule optique	31
II.2.4	Passivation des surfaces	31
II.3	Description d'une mesure	33
a)	Paramètres importants	33
b)	Calibration	34
c)	Déduction du signal de force	36
III	Réponse des polymères d'acides nucléiques à un étirement	37
III.1	Caractéristiques des polymères d'acides nucléiques	37
III.1.1	Généralités	37
III.1.2	Caractéristiques mécaniques	39
III.2	Modèles d'élasticité	39
III.2.1	Modèle du polymère semi-rigide (<i>semi-flexible polymer</i>)	40
III.2.2	Modèle du polymère semi-rigide extensible	40
III.2.3	Du modèle à l'expérience : adaptation	41
III.2.4	Ajustement du modèle : cas de l'ADN double brin	41
III.3	Application : intermédiaires de déroulement de l'ARN	42
III.3.1	Analyse d'une courbe typique	42
III.3.2	Ajustement du modèle aux données expérimentales	45
III.3.3	Identification des intermédiaires de dépliement de l'ARN	48
IV	Résultats	51
IV.1	Mesures en présence des r-protéines uL24 et/ou uL4	51
IV.2	Étude préliminaire d'un <i>helper</i> de l'assemblage : SrmB	52
	Conclusion	55
A	Mouvement brownien d'une bille dans un piège harmonique	57
B	Préparation des hybrides ARN/ADN et mesures de force	59
	Bibliographie	61

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier les membres du jury pour leur participation à ma soutenance de thèse. J'ai particulièrement apprécié leurs nombreuses questions et remarques très pertinentes qui ont suivi l'exposé animant ainsi une discussion de qualité.

Je tiens en particulier à souligner le travail de mes deux rapporteurs, Karen Perronet et Pascale Romby. Sans être particulièrement familières de mon travail, elles ont pris le temps d'analyser ma thèse en profondeur.

Un grand merci à Marc Dreyfus pour sa bienveillance, son humour et son partage généreux des connaissances. Merci à Francesco Pédaci pour son expertise sur le piège optique, et à Vincent Croquette pour ses remarques aussi directes qu'instructives.

Je voudrais remercier chaleureusement mes directeurs de thèse Ulrich Bockelmann et Thierry Bizebard sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. J'ai particulièrement apprécié le savoureux mélange de rigueur et de créativité scientifique qui émane de leur collaboration. J'ai beaucoup appris à leur contact.

Merci également aux autres membres du laboratoire passés ou présents avec qui j'ai interagi : Edouard, Mathilde, Ismaïl, Lena, Kokoura, Jyoti et Andreas. Merci pour leur bonne humeur et leur bienveillance quotidienne. Et rendez-vous Aux Marsouins !

J'aimerais également remercier Olivia Du Roure pour avoir accepté de suivre le bon déroulement de ma thèse auprès de l'école doctorale Physique en Île-de-France.

Enfin, je tiens à remercier chaleureusement mes amis et les membres de ma famille pour leur soutien constant.

Introduction

Le ribosome, l'élément central de la traduction, assure la synthèse des protéines chez tous les êtres vivants. Il est composé de nombreux éléments dont de l'ARN et des protéines qui interagissent ensemble pour former une particule fonctionnelle massive organisée en deux sous-unités. La résolution de nombreuses structures du ribosome à l'échelle atomique a permis d'élucider de nombreux mécanismes, et notamment des réarrangements des interactions entre les différents constituants lors de la synthèse du polypeptide. Ces réarrangements assurent une certaine souplesse du ribosome tout en conservant l'intégrité de la structure compacte. Les questions relatives à l'assemblage du ribosome sont par conséquent particulièrement pertinentes et complexes.

Je me suis focalisé sur la problématique de l'assemblage du ribosome bactérien et plus précisément sur les premières étapes de l'assemblage de la grande sous-unité. Ces étapes impliquent des interactions entre les différents éléments constitutifs de la grande sous-unité. J'ai cherché à préciser ces interactions à l'échelle moléculaire par une méthode d'investigation sur molécule unique.

Pour ce faire, j'ai réalisé des mesures de force via un piège optique. J'ai ainsi pu caractériser la stabilité des structures adoptées par un fragment d'ARN comportant des sites de fixation des protéines ribosomiques, en présence ou en absence des protéines.

La mise en œuvre de ces mesures s'inscrit dans le cadre d'une collaboration internationale regroupant des spécialistes des mesures de force et de l'étude du ribosome. Le laboratoire de T. Ueda, de l'université de Tokyo, m'a notamment fourni les protéines ribosomiques uL24 et uL4 purifiées.

La première partie de ce manuscrit porte sur le ribosome et en particulier sur l'assemblage de la grande sous-unité du ribosome d'*E. coli*. Je décrirai notamment le fragment d'ARN étudié. Cette description me conduira à introduire les problématiques de l'étude vis-à-vis de l'état de l'art du domaine.

Dans la deuxième partie, je présenterai le dispositif expérimental ainsi que la mise en œuvre des mesures de force. J'insisterai sur les difficultés que j'ai rencontrées liées à l'adsorption non-spécifique des protéines ribosomiques et la méthodologie que j'ai mise en place pour prévenir ces problèmes.

La troisième partie porte sur le traitement du signal de force. Je décrirai une méthode que j'ai développée au cours de la thèse, qui permet à partir de l'ajustement d'un modèle d'élasticité puis l'utilisation d'un modèle de Markov caché, de détecter les intermédiaires de déroulement de l'ARN. Je montrerai comment cette méthode m'a permis d'établir une cartographie de la stabilité des structures du fragment d'ARN.

Enfin, dans la quatrième partie, je présenterai les résultats des mesures de force sur le fragment d'ARN en absence ou en présence des protéines ribosomiques. La discussion de ces résultats nous conduira à préciser le rôle des protéines ribosomiques dans les premières étapes de l'assemblage de la grande sous-unité du ribosome.

Chapitre I

L'assemblage du ribosome d'*E. coli*

Escherichia coli est une bactérie intestinale des mammifères découverte en 1885 par Theodor Escherich. Elle possède une forme cylindrique (bacille) de longueur caractéristique $4 \mu m$. Il existe plusieurs souches de la bactérie dont certaines sont pathogènes. Dans un milieu riche à $37^{\circ}C$, son cycle de développement dure typiquement 25 minutes. *E. coli* est un modèle de bactérie gram négatif très largement étudié en laboratoire.

I.1 Le ribosome assure la synthèse des protéines

I.1.1 Le ribosome : un constituant majeur de la cellule

Les images d'*E. coli* en microscopie électronique à transmission révèlent la présence de ribosomes dans le cytoplasme en très grand nombre [1]. On distingue les ribosomes libres de ceux associés en polyribosomes lors de la traduction d'un ARN messager (ARNm). Les polyribosomes sont constitués de nombreux ribosomes qui traduisent simultanément l'ARNm à mesure que ce dernier est transcrit à partir de l'ADN.

Le poids sec d'*E. coli* correspond pour 55 % à des protéines, 20 % à de l'ARN (dont 15 % d'ARN ribosomique) et 3 % d'ADN [2]. On estime que 80 à 90 % de l'ARN cellulaire se trouve sous la forme de ribonucléoprotéines [3].

Le nombre de ribosomes par cellule varie suivant la durée du cycle de développement. On estime que pour un cycle de développement de 24 minutes, la concentration des ribosomes peut atteindre $70 \mu M$ [4] représentant ainsi jusqu'à 30 % du poids sec de la bactérie. La biogenèse des ribosomes représente alors jusqu'à 40 % de l'énergie consommée par la bactérie [1].

I.1.2 Le ribosome est constitué d'ARN et de protéines organisés en deux sous-unités

Le ribosome chez *E. coli* est constitué en masse de $2/3$ d'ARN ribosomique (ARNr) et de $1/3$ de protéines ribosomiques (r-protéines) organisés en deux sous-unités [3]. La petite sous-unité 30S est composée d'ARNr 16S (1542 nucléotides) et de 21 r-protéines. La grande sous-unité 50S est composée d'un ARNr 23S (2904 nucléotides), d'un ARNr 5S (120 nucléotides) et de 33 r-protéines [5]. Lors de la traduction, les deux sous-unités sont en interaction pour former une particule de 2,6 MDa qui sédimente à 70S.

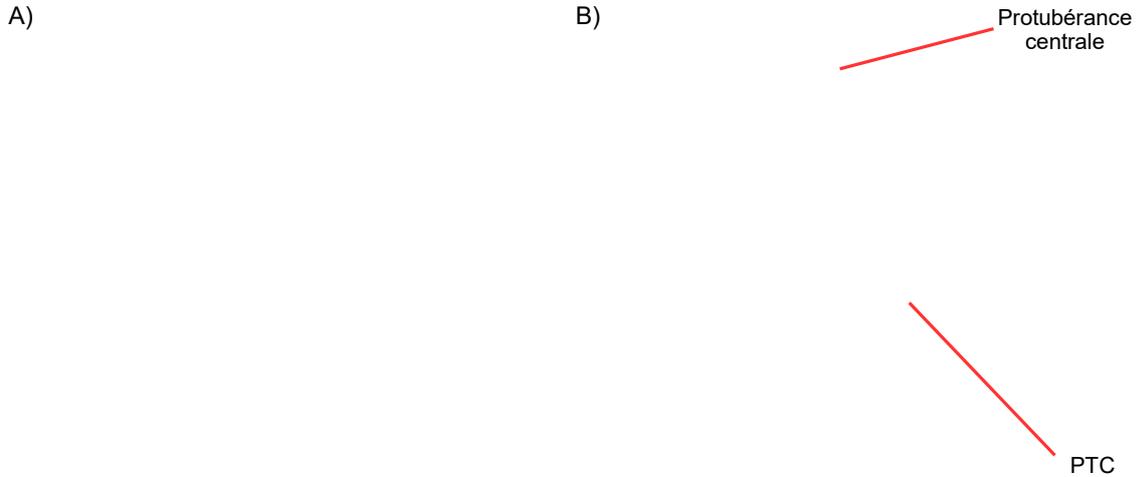


Fig. I.1 Composition de la sous-unité 50S du ribosome de *T. thermophilus*. L'ARNr (noir) forme une structure compacte en interaction avec de nombreuses r-protéines (couleur). A) Vue depuis le cytosol. B) Vue depuis l'interface avec la sous-unité 30S. Figure extraite de [6].

La composition des sous-unités du ribosome a été établie par de nombreuses expériences complémentaires [7]. Plus récemment, les techniques associées à la biologie structurale (diffraction des rayons X, microscopie électronique cryogénique,...) ont permis de déterminer l'arrangement des différents composants du ribosome et plus particulièrement de la sous-unité 50S à l'échelle atomique (Fig. I.1). La structure de la sous-unité 50S montre l'ARNr en interaction avec les r-protéines.

Les r-protéines sont nommées suivant leur poids moléculaire décroissant de L1 à L33 dans le cas de la grande sous-unité 50S. Les ribosomes des différents règnes du vivant (bactérie, archée et eucaryote) présentent de grandes similitudes révélant l'aspect très conservé dans l'évolution. C'est le cas tout particulièrement de certaines r-protéines [8, 6]. La nomenclature internationale des r-protéines souligne leur aspect universel ou particulier à un règne du vivant. Les r-protéines uL24 et uL4 sont deux exemples de protéines universelles, c'est-à-dire présentes dans les ribosomes des organismes appartenant aux trois règnes. En revanche, bL20 est une protéine spécifique aux bactéries [9].

Sur la figure I.1B, on peut distinguer des sous-ensembles morphologiques de l'arrangement des différents constituants. On distingue une structure compacte en forme d'hémisphère avec une protubérance centrale entourée de deux bras (*stalk*) : un *stalk* composé de uL1 et un autre composé du pentamère uL10 · bL12₄ (non-visible sur la structure car trop flexible) en interaction avec uL11 et un fragment d'ARNr 23S. Au cœur de cette structure compacte, on distingue le lieu de la formation de la liaison peptidique (*Peptidyl Transferase Center* - PTC). C'est à partir du PTC que se situe le début du canal d'extrusion du polypeptide néo-synthétisé [5, 6].

Les protéines sont majoritairement localisées autour du *stalk* bL12 et de la fin du canal d'extrusion du polypeptide néo-synthétisé. L'interface avec la sous-unité 30S est particulièrement pauvre en r-protéines [6].

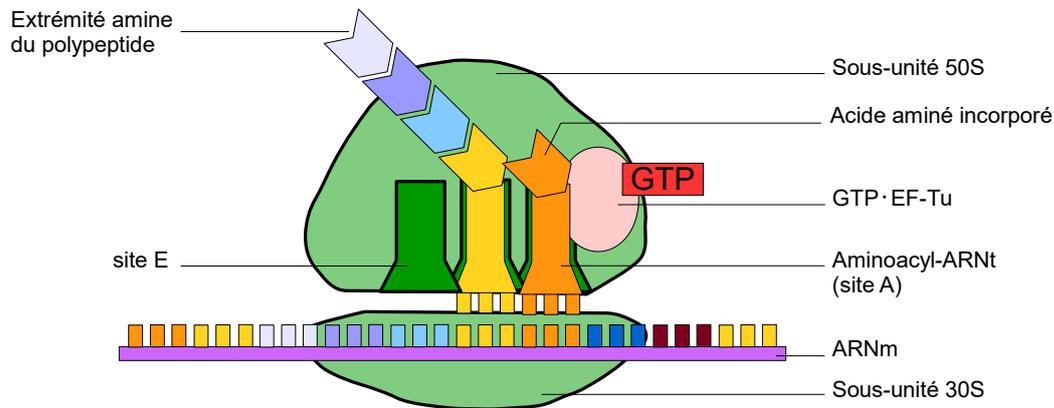


Fig. I.2 Représentation schématique du ribosome en cours de traduction lors de la phase d'élongation.

I.1.3 Le ribosome est l'élément central de la traduction

La traduction désigne l'ensemble des mécanismes à l'origine de la synthèse des protéines.

L'étude de la traduction fait l'objet de très nombreuses revues. Le paragraphe suivant s'appuie sur la revue de M. Kaczanowska et M. Rydén-Aulin [5] pour décrire succinctement les différentes étapes de la traduction chez *E. coli*.

Initiation. L'initiation est l'étape au cours de laquelle la sous-unité 30S reconnaît la séquence *Shine-Dalgarno* (SD) de l'ARNm par une interaction avec la séquence anti-SD à l'extrémité 3' de l'ARNr 16S. Les facteurs d'initiation IF1, IF2 et IF3 contribuent alors à l'association de l'ARN de transfert (ARNt) d'initiation portant l'anticodon complémentaire du codon de démarrage (en général AUG) de l'ARNm. La fin de l'étape d'initiation est marquée par l'association de la sous-unité 50S à la sous-unité 30S. L'initiation serait l'étape cinétiquement limitante de la synthèse de la protéine.

Élongation. Au cours de l'élongation, l' aminoacyl-ARNt complémentaire du codon de l'ARNm est incorporé au niveau du site A vacant, sous la forme d'un complexe ternaire avec le facteur d'élongation EF-Tu et un GTP (cf Fig. I.2). L'hydrolyse du GTP s'accompagne de la formation d'une liaison peptidique entre l'extrémité carboxyle du polypeptide en cours de synthèse et l'extrémité N terminale de l'acide aminé complexé à l' aminoacyl-ARNt du site A. Au cours de cette étape, le polypeptide se lie à l'ARNt au site A, libérant ainsi l'ARNt du site P. L'hydrolyse d'un GTP en présence du facteur d'élongation EF-G permet la translocation de l'ARNt du site P vers le site E, et de l'ARNt lié au polypeptide du site A vers le site P. L'ARNt du site E est ensuite relargué et le ribosome est prêt pour un nouveau cycle d'élongation.

Terminaison. La terminaison de la traduction a lieu lorsqu'un codon stop entre au niveau du site A. Le codon stop est alors reconnu par un facteur de terminaison RF1 (qui reconnaît les codons UAA et UAG) ou RF2 (qui reconnaît les codons UAA et UGA)

qui hydrolyse la liaison entre l'ARNt et le polypeptide au niveau du site P. Le facteur de terminaison RF1 ou RF2 est ensuite relâché du site A par le facteur de terminaison RF3.

Recyclage. Au terme de l'étape de terminaison, le ribosome est lié à l'ARNm et contient l'ARNt déacétylé au niveau du site P. L'intervention d'un facteur de recyclage ainsi que du facteur d'élongation EF-G permet la dissociation des deux sous-unités 30S et 50S du ribosome.

Régulation. Les différentes étapes de la traduction font intervenir de nombreux facteurs externes qui permettent la régulation du processus de synthèse du polypeptide à tous les niveaux. La synthèse des polypeptides s'effectue à la vitesse d'environ 20 acides aminés incorporés par seconde pour un taux d'erreur compris entre 1/3000 et 1/10000 [6].

La biogenèse des éléments constitutifs du ribosome est également un processus régulé par la cellule, notamment la biogenèse des r-protéines [10]. C'est le cas en particulier des r-protéines bL20 et uL4 qui possèdent un site de fixation à l'ARNm dont elles sont issues [11, 12].

Inhibition. L'étude de l'inhibition de la synthèse des protéines au niveau du ribosome fait l'objet de nombreux travaux, guidés notamment par la recherche d'antibiotiques.

Certains macrolides (erythromycine,...) interagissent avec la région du tunnel d'extrusion du polypeptide adjacent au PTC et bloquent le chemin du tunnel inhibant ainsi la synthèse du polypeptide [6].

Assemblage. On a vu précédemment que le ribosome est un constituant très abondant de la cellule qui assure une fonction essentielle. La description succincte des différentes étapes de la traduction souligne l'importance de l'arrangement correct des différents éléments constitutifs du ribosome. Les différents éléments doivent être en interaction suffisamment forte pour permettre le maintien de la structure et suffisamment flexible pour permettre par exemple la translocation lors de l'étape d'élongation. L'assemblage correct du ribosome est par conséquent un prérequis essentiel au bon déroulement de la traduction.

Le processus d'assemblage est très coordonné. Il comprend plusieurs étapes couplées entre elles. On distingue la biogenèse de l'ARNr et des r-protéines, ainsi que leur repliement ; les interactions entre l'ARNr, les r-protéines et les facteurs d'assemblage [13].

1.2 État de l'art de l'assemblage du ribosome

Avant de s'intéresser plus particulièrement à l'assemblage des constituants du ribosome, on se propose de décrire les étapes de leur biogenèse.

1.2.1 Biogenèse des constituants : synthèse et maturation

La biogenèse du ribosome commence par la transcription des ARNr auxquels les r-protéines présentes dans le cytoplasme viendront se fixer.

ARNr 16S, 23S et 5S. Les ARNr 16S, 23S et 5S sont transcrits à partir de 7 opérons très semblables [14] et subissent de nombreuses modifications post-transcriptionnelles [5].

La transcription de l'ARNr s'accompagne de la formation de structures secondaires de l'ARN, de la fixation des r-protéines au niveau des sites spécifiques néo-synthétisés, ainsi que des modifications chimiques de l'ARN. Enfin, plusieurs RNases génèrent les ARNr matures [15].

Parmi les RNases connues, la RNase III joue un rôle important. La RNase III génère les ARNr précurseurs p16S rRNA, p23S rRNA et p5S rRNA. En particulier, la maturation de l'ARNr 23S dépend fortement de la RNase III mais aussi d'autres RNases. Sa maturation finale interviendrait lors de l'étape d'initiation de la traduction [5].

L'ARNr 23S subit 25 modifications chimiques connues (catalysées par des enzymes appropriées). La plupart sont situées au niveau du PTC [16] dont seulement 7 sont nécessaires à la formation d'une sous-unité fonctionnelle *in vitro*. Les modifications chimiques de l'ARNr concernent principalement des nucléotides très conservés et joueraient un rôle dans le repliement fonctionnel de l'ARNr et dans les interactions avec les r-protéines. De plus, certaines modifications chimiques de l'ARNr requièrent la présence de r-protéines [5].

r-protéines. Certaines r-protéines ont la propriété d'être constituées d'extensions intrinsèquement non-structurées dont la structure est induite par les interactions avec l'ARNr. Les r-protéines uL2, uL3, uL4 et uL15 possèdent les extensions les plus longues et complexes. De plus, ces quatre protéines sont parmi les r-protéines les plus conservées dans tous les domaines phylogénétiques, ce qui suggère un rôle essentiel des extensions. Les extensions sont constituées majoritairement d'acides aminés aux résidus glycine, arginine et lysine. Les résidus glycine confèrent de la flexibilité et permettent un haut degré de compactions des protéines. Les résidus basiques quant à eux permettent à l'extension de plonger au cœur du ribosome en neutralisant les charges négatives du squelette phosphate de l'ARNr [8].

L'existence de ces extensions a pour effet de limiter la solubilité de ces protéines libres en solution. Le complexe ribonucléoprotéique formé en présence de l'ARNr est supposé améliorer la solubilité des protéines ribosomiques.

Les r-protéines subissent également des modifications chimiques qui peuvent jouer un rôle significatif dans l'efficacité des interactions au sein du ribosome. Cependant, la suppression de ces maturations post-traductionnelles n'entraîne pas de modifications du phénotype de la cellule. Une exception à cette règle est la méthylation de la protéine ribosomique uL3 dont la suppression s'accompagne d'une accumulation de précurseurs de la sous-unité 50S [5].

1.2.2 Assemblage en sous-unités : rôles de l'ARNr, des r-protéines et des facteurs externes

ARNr. L'ARNr 23S adopte une conformation compacte au sein de la sous-unité 50S du ribosome (cf Fig. I.1). On considère généralement que l'ARNr 23S adopte des structures secondaires rapidement au cours de la transcription et s'organise en domaines. On identifie jusqu'à 7 domaines à partir des données structurales [17].

Les structures tertiaires adoptées par l'ARNr 23S seraient plus lentes à mettre en

place par l'ARNr seul. L'intervention de ligands (r-protéines ou cofacteurs) accélérerait la formation des structures tertiaires.

Parmi les motifs tertiaires fréquemment observés, le motif A-mineur [18] est impliqué dans la fonction catalytique au niveau du PTC. Le ribosome est de ce fait un exemple de ribozyme [19].

r-protéines. Le rôle principal attribué aux r-protéines est de stabiliser les structures conformationnelles adoptées par l'ARNr et de le guider progressivement vers le repliement fonctionnel.

Les extensions des r-protéines stabiliseraient les interactions entre les différents domaines de l'ARNr. Plus généralement, les protéines assurent des ponts entre les différents domaines de l'ARNr. Par exemple, uL22 interagit avec au moins 6 domaines de l'ARNr 23S [6].

Quelques r-protéines sont également connues pour interagir avec des facteurs de traduction. C'est le cas par exemple du *stalk* bL12 avec les facteurs d'élongation EF-Tu et EF-G. De plus, les r-protéines uL22, uL23, uL24 et uL29 forment un anneau à la périphérie du ribosome autour du canal d'extrusion du polypeptide néo-synthétisé. Cet anneau est notamment impliqué dans des voies de signalisation [6].

Il a également été proposé que certaines r-protéines ne seraient pas impliquées directement dans la traduction et/ou l'assemblage, mais permettraient néanmoins d'accélérer le processus [13].

Facteurs externes : rôles des *helpers*. Parmi les facteurs externes favorisant l'assemblage du ribosome, on trouve des hélicases à ARN, des chaperonnes à ARN, des facteurs de maturation ainsi que des GTPases.

Le rôle généralement attribué aux *helpers* est d'accélérer l'assemblage en sous-unité des constituants du ribosome, en diminuant les barrières d'énergie entre des conformations intermédiaires de sous-unités non-fonctionnelles. De plus, les *helpers* peuvent jouer un rôle dans le contrôle qualité de l'assemblage [13].

- **Hélicases à ARN** : ces protéines sont connues pour moduler les structures adoptées par l'ARN. Parmi les nombreuses familles d'hélicases à ARN, on distingue les hélicases à boîte DEAD [20]. Dans la famille des hélicases à boîte DEAD, des études ont montré chez *E. coli*, l'intervention de SrmB, DbpA et DeaD/CsdA lors de la biogenèse du ribosome [21]. Parmi les nombreuses activités enzymatiques de ces protéines, la biogenèse du ribosome ferait intervenir soit une activité hélicase, soit une activité de chaperonnes à ARN, soit enfin une activité impliquée dans le réarrangement des interactions entre l'ARNr et les r-protéines [13].
- **Chaperonnes** : DnaJ, DnaK et GrpE sont des chaperonnes (à protéine) agissant ensemble dans le processus d'assemblage [13].
- **GTPases** : on distingue de très nombreuses GTPases intervenant dans la biogenèse du ribosome. Par exemple ObgE qui interagit directement avec uL13 lors de l'assemblage de la grande sous-unité chez *B. subtilis* [22].

Facteurs externes : rôles des ions. Les ions métalliques Mg^{2+} , K^+ , et dans une moindre mesure Na^+ , sont essentiels pour la formation et la stabilisation des structures compactes d'ARN. Les cations Mg^{2+} interagissent majoritairement avec le squelette phos-

phate et les hétéroatomes des bases azotées. Les cations monovalents quant à eux, interagissent majoritairement avec les bases azotées et les protéines. Les ions métalliques sont de fait très abondants dans le ribosome, particulièrement dans la région environnant le PTC [23].

En conclusion, l'ARNr et les r-protéines jouent un rôle essentiel dans la traduction. Le processus d'assemblage du ribosome requiert une succession de changements conformationnels de l'ARNr et des interactions avec les r-protéines. Le repliement de l'ARN serait stabilisé par les r-protéines, guidant ainsi progressivement l'ARNr vers la configuration fonctionnelle [13, 24]. En raison du grand nombre de composants, la biogenèse du ribosome est coûteuse en énergie. C'est pourquoi la synthèse et l'assemblage des composants du ribosome doit être un processus coordonné et efficace.

1.2.3 Expériences de reconstitution *in vitro* de la sous-unité 50S d'*E. coli*

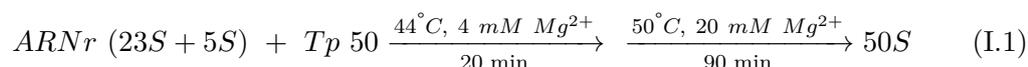
En 1968, une équipe de chercheurs démontre la possibilité de reconstituer une sous-unité 30S fonctionnelle à partir des éléments constitutifs purifiés directement d'*E. coli* [25]. En 1974, une autre équipe démontre cette fois la possibilité de reconstituer la sous-unité 50S [26, 27].

Ces expériences ont permis de reconstituer un ribosome fonctionnel avec un rendement de 50 à 100 % dans un tube à essai à partir du mélange des éléments constitutifs purifiés. Ces expériences démontrent que l'ensemble de l'information nécessaire à l'assemblage du ribosome est contenue dans les séquences primaires des ARNr et des r-protéines [1, 13].

Par la suite, on s'intéresse particulièrement aux expériences de reconstitution *in vitro* de la grande sous-unité 50S.

a) Un processus en deux étapes

L'expérience de reconstitution de la grande sous-unité 50S est effectuée en deux étapes [26, 27, 28]. Le mélange constitué des ARNr 23S et 5S en présence des 33 r-protéines (Tp 50) est incubé successivement selon les conditions décrites dans l'équation I.1.



Le tampon expérimental des deux incubations successives diffère suivant la concentration en cations Mg^{2+} (acétate de magnésium) et contient de plus : 20 mM Tris HCl pH 7.4, 400 mM NH_4Cl , 0.2 mM EDTA et 5 mM 2-mercaptoethanol [28].

Ces expériences de reconstitution *in vitro* ont permis d'isoler des intermédiaires d'assemblage, d'analyser leur composition et d'en déduire les mécanismes en jeu lors de l'assemblage de la grande sous-unité 50S.

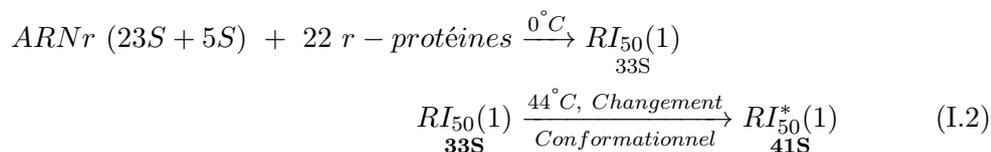
b) Première étape : particules intermédiaires $RI_{50}(1)$ et $RI_{50}^*(1)$

La première étape de la reconstitution *in vitro* de la grande sous-unité 50S s'effectue suivant deux intermédiaires de reconstitution $RI_{50}(1)$ et $RI_{50}^*(1)$ [27]. Ces deux particules ont la même composition, mais diffèrent par leur coefficient de sédimentation. $RI_{50}(1)$

sédimente à 33S contre 41S pour $RI_{50}^*(1)$. Cette différence révèle un changement conformationnel de la particule lors du passage de $RI_{50}(1)$ à $RI_{50}^*(1)$.

Les particules $RI_{50}(1)$ et $RI_{50}^*(1)$ sont composées des ARNr 23S et 5S ainsi que de 22 r-protéines : uL1, (uL2), uL3, uL4, (uL5), bL9, uL10, uL11, bL12, (uL13), uL15, bL17, (uL18), bL20, bL21, uL22, uL23, uL24, (bL26 = bS20), uL29, (bL33) et (bL34) [29, 30, 31]¹.

Des expériences complémentaires montrent que la formation de la particule $RI_{50}(1)$ s'effectue à 0°C. Le changement conformationnel de la particule $RI_{50}(1)$ en $RI_{50}^*(1)$ est une étape importante pour le bon rendement de la reconstitution d'une sous-unité 50S fonctionnelle. C'est ce changement conformationnel de la particule qui requiert l'élévation de température à 44°C (cf. équation I.2).



Parmi l'ensemble des composants de l'intermédiaire $RI_{50}(1)$, l'ARN 23S et les r-protéines uL24, uL22, bL20, uL13 et uL4 jouent un rôle essentiel pour le changement conformationnel $RI_{50}(1) \rightarrow RI_{50}^*(1)$ [32].

c) Carte d'assemblage *in vitro*

L'étude des intermédiaires de reconstitution a également permis de dresser une cartographie de l'assemblage de la sous-unité 50S (Fig. I.3). Elle comprend l'ordre d'incorporation des r-protéines, ainsi que les interactions entre les r-protéines et les ARN 23S et 5S [30, 31].

Sur la carte d'assemblage, on distingue un groupe de r-protéines qui se fixent au niveau de l'extrémité 5' de l'ARN 23S : uL24, uL22, bL21, bL20, uL13 et uL4. Ces r-protéines correspondent également aux premières protéines incorporées *in vivo* dans la grande sous-unité 50S en formation. On les appelle les *early binders*, parmi lesquels on trouve les r-protéines essentielles à la formation de la particule $RI_{50}^*(1)$.

La carte d'assemblage met également en évidence des interactions entre les r-protéines directes ou indirectes. On voit par exemple une interaction directe entre bL20 et uL13. Une interaction indirecte est par exemple visible entre uL5 et uL4, car l'incorporation de uL5 est fortement dépendante de celle de uL2, elle-même fortement dépendante de la fixation de uL4 sur l'ARN 23S. Ces interactions directes ou indirectes soulignent le caractère coopératif de l'incorporation des r-protéines dans la sous-unité 50S en formation.

d) Deux initiateurs de l'assemblage

Ce paragraphe a été rédigé à partir de l'article original de V. Nowotny et K. H. Niehaus [34]. Pour une bibliographie plus récente, le lecteur pourra également consulter [6, 8].

1. Les protéines entre parenthèses sont identifiées en quantité substœchiométrique par rapport à l'ARNr 23S.

Fig. I.3 Carte d'assemblage de la grande sous-unité 50S du ribosome. Les flèches récapitulent les interactions entre les r-protéines et l'ARNr, ainsi que les interactions entre les r-protéines déterminées par les expériences de reconstitution *in vitro*. Les couleurs correspondent aux 6 groupes observés *in vivo*. Le bleu correspond aux premiers précurseurs et le rouge à la sous-unité 50S quasi-assemblée. Figure extraite de [33].

Une grande majorité des protéines de la grande sous-unité peuvent se fixer individuellement à l'ARN 23S (cf Fig. I.3). Le raisonnement suivant permet d'estimer dans ce cas la probabilité de former une particule active.

On suppose que toutes les r-protéines ont une concentration identique largement supérieure à leurs affinités pour l'ARNr et donc que leur fixation est systématique. E désigne le rapport du nombre d'exemplaires d'ARN sur le nombre d'exemplaires d'une protéine donnée. n désigne le nombre de protéines se fixant directement à l'ARN de façon indépendante (protéine indépendante).

S'il y a plus de protéines que d'ARN ($E \leq 1$), on montre que l'on forme une particule fonctionnelle (c'est-à-dire que tous les ARN contiennent toutes les protéines indépendantes) de façon systématique.

In vivo, il y a plus d'ARN que de protéines (cf paragraphe ci-dessous). Dans ce cas, $E \geq 1$, on montre que :

- la probabilité de trouver une protéine indépendante sur un ARN donné est $1/E$
- la probabilité de trouver n protéines indépendantes sur un ARN donné est $1/E^n$ (processus indépendant)
- la probabilité de trouver n protéines indépendantes sur un ARN est E/E^n (il y a E molécules d'ARN avec les protéines indépendantes fixées). C'est aussi la probabilité de trouver une particule fonctionnelle.

Ce modèle simple montre que la probabilité de former la sous-unité 50S décroît fortement avec le nombre de protéines indépendantes. Ce résultat est même d'autant plus marqué que le rapport de molarité ARN/protéines est grand.

Des expériences de reconstitution de la grande sous-unité 50S ont été réalisées pour différents rapports E . Ces expériences ont montré d'une part que contrairement à la prévision, le processus d'assemblage reste relativement efficace. D'autre part, la relation prédite E/E^n qui ajuste le mieux aux données expérimentales est obtenue pour $n=2$. Des expériences complémentaires ont montré le rôle particulier joué par uL24 et uL3 dans le rendement de l'expérience de reconstitution.

Les auteurs de ces expériences ont alors proposé la fonction d'initiateur de l'assemblage de la grande sous-unité 50S attribuée à uL24 et uL3. Ces deux initiateurs diminuent le nombre de protéines qui se fixent de façon indépendante à l'ARN 23S. Ils assurent un rôle de coordination de l'assemblage.

In vivo, les ARN ribosomiques sont en léger excès par rapport à la quantité de r-protéines disponibles, typiquement dans un rapport de molarité ARNr/r-protéine de 1.1/1.

Cet excès d'ARNr par rapport aux r-protéines est même très marqué dans un contexte de stress de la bactérie et peut atteindre 3/1. Or nous avons vu (cf paragraphe I.1.3) que la régulation de la biogenèse des r-protéines nécessite l'existence de r-protéines libres dans le cytoplasme capables de fixer l'ARNm. Le rôle de régulation de la quantité de r-protéines dans le cytoplasme serait attribué à uL3, qui contribuerait à la formation de particules *dead ends* dans des conditions de développement défavorables, libérant ainsi des r-protéines disponibles pour la régulation.

Enfin, le rôle de « sélection » de l'ARN qui conduit à une particule fonctionnelle serait attribué à uL24 qui comme nous l'avons vu, appartient aux *early binders* de l'assemblage.

I.2.4 Études *in vivo* de l'assemblage

La durée de l'assemblage du ribosome *in vivo* est estimée à environ 2 minutes à 37°C [1]. L'assemblage *in vivo* est par conséquent bien plus rapide que l'assemblage *in vitro* réalisé par les expériences de reconstitution.

Deux explications sont généralement invoquées pour rendre compte de cette différence :

- *in vivo*, l'assemblage est co-transcriptionnel (*Assembly gradient*) [13, 35]. En effet, l'image réalisée en microscopie électronique d'un des 7 opérons codant pour les ARNr en cours de transcription révèle l'incorporation simultanée des r-protéines sur l'ARNr en cours de synthèse [36, 24].
- *in vivo*, l'intervention de *helpers* permet d'accélérer le processus d'assemblage notamment en prévenant les pièges cinétiques [37, 24]. Un piège cinétique correspond dans ce cas à une conformation non-native de l'ARNr, qui possède une durée de vie très longue par rapport aux cinétiques en jeu dans le processus d'assemblage.

Les études *in vivo* de l'assemblage du ribosome chez *E. coli* ont permis d'identifier au moins 6 groupes chronologiques de précurseurs de la grande sous-unité 50S. Des particules appartenant à ces 6 groupes ont été isolées et l'étude de leur composition a permis de dresser la carte d'assemblage *in vivo*. La carte d'assemblage ainsi obtenue a ensuite été superposée à celle déterminée par les expériences de reconstitution *in vitro* (Fig. I.3) [33].

Les intermédiaires observés *in vivo* sont en bon accord, au moins pour les premières étapes, avec ceux observés *in vitro* [32, 13].

Les cartes d'assemblage suggèrent de plus qu'il existe plusieurs chemins possibles pour l'assemblage de la grande sous-unité du ribosome. Des expériences de reconstitution *in vitro* ont même montré que bL20 peut assurer le rôle initiateur de uL24 lorsque ce dernier est absent. Ce résultat indique bien que le chemin réactionnel pour former une particule active est redondant. À noter cependant que dans le cas de l'initiation assurée par bL20, l'efficacité de l'assemblage est bien moindre que lorsque uL24 est présent [38]. L'existence de chemins parallèles, lors de l'assemblage de la grande sous-unité vers une particule fonctionnelle, a été démontrée dans le cas de précurseurs contenant déjà les *early binders* [39]. D'une manière générale, il semble que l'existence de chemins parallèles lors de l'assemblage vers une particule fonctionnelle concerne principalement les dernières étapes de l'assemblage [1].

I.3 Systèmes étudiés dans la thèse

L'objectif de la thèse est de caractériser à l'échelle moléculaire les interactions entre les r-protéines et l'ARN 23S en jeu lors des premières étapes de l'assemblage de la grande sous-unité du ribosome. La technique expérimentale utilisée permet une mesure directe de la stabilité mécanique des structures adoptées par l'ARN à l'échelle de la molécule unique. Ces mesures sont ensuite comparées en présence et en absence de r-protéines.

Dans cette section, je vais décrire les fragments d'ARN 23S que j'ai étudiés, et je montrerai le lien avec l'étude de l'assemblage de la grande sous-unité du ribosome. Je conclurai en précisant les problématiques que soulève cette étude.

I.3.1 Fragment principalement étudié : ARN 23S 281-359

Le fragment correspondant aux nucléotides 281 à 359 est essentiel pour l'assemblage du ribosome [41]. Il est situé dans le domaine I au niveau de l'extrémité 5' de l'ARN 23S et contient les hélices H18, H19 et H20. Dans le ribosome, ce fragment est situé à la périphérie, en contact avec le cytosol.

Ce fragment d'ARN est un site de fixation des r-protéines uL24 et uL4 [42], dont les interactions interviennent lors des premières étapes de l'assemblage de la grande sous-unité 50S (cf. Fig. I.3).

Des aliquots purifiés de protéines uL24 (6.4 mM) et uL4 (55 μM) ont été préparés par l'équipe de T. Ueda [43].

uL24 est une protéine de 104 acides aminés (11.2 kDa) codée par le gène *rplX* (cf. UniProtKB code P60624 [44]) appartenant à l'opéron *spc* [45].

C'est une protéine majoritairement globulaire située à la périphérie du ribosome (cf. Fig. I.4A) qui interagit spécifiquement avec le fragment d'ARN (cf. Fig. I.4B). uL24 ne possède pas d'interactions directes avec les autres protéines ribosomiques chez *E. coli* (cf. Fig. I.4C) et *H. marismortui* [8].

Comme on l'a vu précédemment, uL24 est une protéine essentielle à la première étape de l'assemblage *in vitro* de la sous-unité 50S et assure (avec uL3) le rôle d'initiateur de l'assemblage. uL24 est nécessaire à l'obtention de la particule intermédiaire $RI_{50}^*(1)$ mais

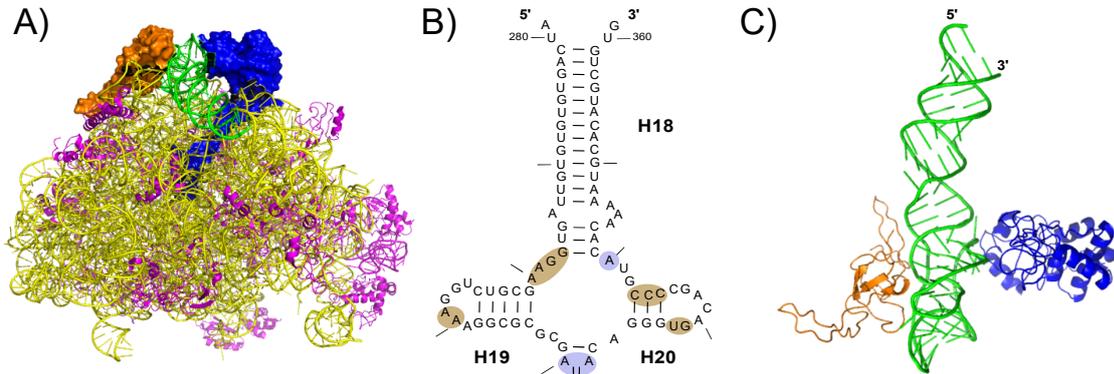


Fig. I.4 Fragment d'ARN 23S en interaction avec uL24 et uL4. A) Position du fragment d'ARN correspondant aux nucléotides 281 à 359 (vert) en interaction avec les protéines uL24 (marron) et uL4 (bleu) dans la grande sous-unité mature (ARNr en jaune et r-protéines en mauve). B) Représentation bi-dimensionnelle du fragment d'ARN montrant la structure secondaire composée des hélices H18, H19 et H20. Les nucléotides entourés en marron (bleu) correspondent aux nucléotides en interaction directe avec uL24 (uL4). C) Représentation tri-dimensionnelle du fragment d'ARN (vert) en interaction avec les protéines uL24 (marron) et uL4 (bleu) dans le ribosome mature d'*E. coli*. Structure extraite du code PDB 4YBB [40] et représentée par l'éditeur PyMOL.

n'est pas indispensable pour assurer sa stabilité conformationnelle. La reconstitution *in vitro* de la sous-unité 50S, à partir de la particule $RI_{50}^*(1)$ déplétée en uL24, est possible. On montre que dans ce cas, on obtient une sous-unité 50S fonctionnelle qui conduit à un ribosome, dont l'efficacité de la traduction n'est pas affectée. Ce résultat suggère que uL24 joue un rôle certes essentiel mais uniquement dans l'assemblage du précurseur $RI_{50}^*(1)$ [46].

Enfin, un rôle proposé pour uL24 est de remodeler le site de fixation de uL22 via l'ARNr 23S [8].

uL4 est une protéine de 201 acides aminés (22.1 *kDa*) codée par le gène *rplD* appartenant à l'opéron *S10* (cf UniProtKB code P60723 [44]).

C'est également une protéine essentielle à la première étape de l'assemblage de la sous-unité 50S. uL4 interagit avec le fragment d'ARN d'intérêt via une partie globulaire de la protéine localisée à la périphérie de la sous-unité 50S (cf Fig. I.4A-B).

uL4 possède également une extension qui plonge au cœur du ribosome et interagit avec différents domaines de l'ARN 23S. Le rapport entre la surface de uL4 en interaction avec l'ARN et la surface totale de uL4 est parmi le plus élevé des protéines ribosomiques (43.7 % contre 34.4 % en moyenne - données pour *H. marismortui* [8]). L'extension de uL4 est notamment un élément constitutif du canal d'extrusion du polypeptide néo-synthétisé et joue un rôle dans l'assemblage du ribosome [47].

Enfin, uL4 est un répresseur transcriptionnel de l'opéron *S10*. Indépendamment, uL4 est aussi un répresseur traductionnel de l'opéron *S10* en interagissant directement avec l'ARNm [44, 12, 48].

I.3.2 Fragment d'ARN 23S 991-1163

Le fragment d'ARN 23S compris entre les nucléotides 991 et 1163 a déjà fait l'objet d'une étude en molécule unique [49]. L'étude a entre autres caractérisé l'interaction entre ce fragment d'ARN et la protéine L20C (partie C terminale de la protéine bL20).

Ce fragment d'ARN interagit également avec uL13. Dans la carte d'assemblage (Fig. I.3), l'incorporation de uL13 succède à celle de bL20.

I.3.3 Problématiques de l'étude

L'étude du fragment d'ARN 23S 991-1163 a déjà fait l'objet d'une étude antérieure à l'échelle de la molécule unique. J'ai utilisé ce fragment pour optimiser les conditions expérimentales de manipulation.

Les expériences sur le fragment d'ARN 23S 281-359, en présence des protéines uL24 et/ou uL4, permettent l'étude à l'échelle de la molécule unique des interactions en jeu lors des toutes premières étapes de l'assemblage de la grande sous-unité 50S. L'étude de ces interactions permettra de préciser le rôle éventuel des protéines uL24 et uL4 dans le repliement et/ou la stabilisation mécanique du fragment d'ARN. Je m'intéresserai également à la fréquence de l'interaction avec l'ARN pour différentes concentrations en r-protéines. J'en déduirai des constantes d'affinité et tenterai de donner une mesure quantitative de l'aspect coopératif de la fixation des r-protéines uL24 et uL4. Enfin, j'essaierai de mettre en évidence le rôle particulier de uL24 en tant qu'initiateur de l'assemblage *in vitro* de la sous-unité 50S.

Chapitre II

Mesures de force via un double piège optique

L'investigation des processus biologiques en jeu dans la cellule, et en particulier ceux impliqués dans la traduction, est permise via de très nombreuses techniques expérimentales complémentaires. Ces études ont permis notamment de déterminer les structures des ARNr et des r-protéines, ainsi que leurs repliements et leurs interactions au sein du ribosome [7]. Parmi ces techniques expérimentales, la diffraction des rayons X a contribué significativement à l'élucidation de la structure tri-dimensionnelle du ribosome [50]. La résolution des structures du ribosome par diffraction des rayons X lors des différentes étapes de la traduction a permis d'élucider de nombreux mécanismes en jeu au sein du ribosome.

Depuis les années 1990, de nouvelles techniques expérimentales ont été développées permettant la manipulation des acides nucléiques à l'échelle de la molécule unique, et ouvrant la voie à des études dynamiques des processus biologiques à l'échelle moléculaire [51]. De nombreuses configurations expérimentales ont été imaginées et mises en œuvre, parmi lesquelles on distingue le piège magnétique [52], le piège optique [53] et plus récemment le piège acoustique [54]. Ces techniques ont pour point commun de permettre d'exercer des forces au niveau de molécules uniques permettant à la fois leur manipulation et leur investigation.

La mise en œuvre de ces techniques, particulièrement pour l'étude des acides nucléiques, s'est avérée très fructueuse dans l'élucidation de nombreux mécanismes cellulaires à l'échelle moléculaire [55]. A titre d'exemple, on citera l'étude sur molécule unique du ribosome [56] qui a notamment montré que le ribosome est un moteur moléculaire capable de développer 13 picoNewtons ($1 \text{ pN} = 10^{-12} \text{ N}$).

Par la suite, je décrirai la technique que j'ai utilisé au cours de la thèse, à savoir la mesure de force via un double piège optique.

II.1 Dispositif expérimental

Dans le cas du double piège optique, la molécule d'intérêt est attachée à deux billes micrométriques au niveau de ses extrémités. Ce sont les billes micrométriques que l'on piège. Dans un premier temps, je vais décrire comment on est capable de manipuler des

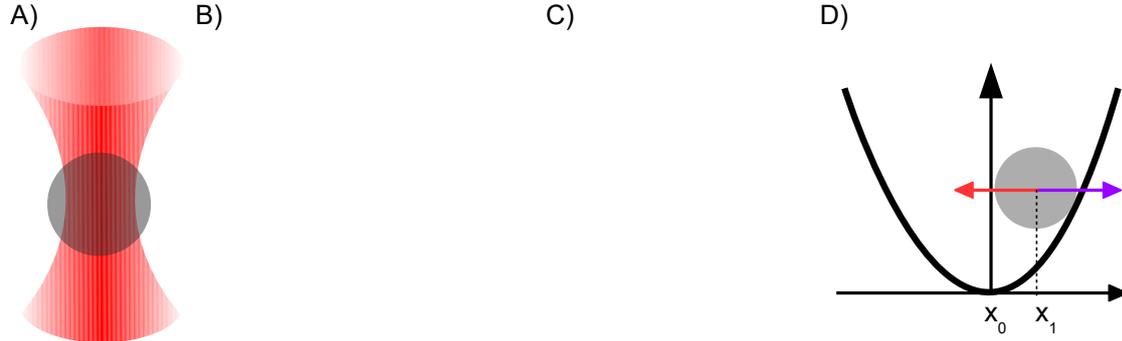


Fig. II.1 Principe du piège optique. A) Bille micrométrique piégée au point focal d'un faisceau laser. B) a et b représentent deux rayons dont on suit la propagation au travers d'une bille micrométrique d'indice optique supérieur à celui du milieu environnant. Au niveau des interfaces, les rayons sont déviés selon les relations de Snell-Descartes. \vec{F}_a et \vec{F}_b représentent les forces exercées sur la bille dû au transfert de quantité de mouvement des rayons incidents a et b . Le profil d'intensité gaussien du faisceau incident résulte en une quantité de mouvement incidente plus importante pour la trajectoire a que b et par conséquent, $\|\vec{F}_a\| > \|\vec{F}_b\|$. La somme $\vec{F}_a + \vec{F}_b$ peut être écrite selon deux directions orthogonales $F_{scat} + F_{grad}$. Ce raisonnement sur deux rayons particuliers montre l'existence d'une force de rappel F_{grad} exercée sur la bille qui tend à la maintenir au centre du faisceau. La force axiale F_{scat} tend à pousser la bille dans la direction de propagation du faisceau. C) Même raisonnement pour une bille placée légèrement en aval du point focal d'une lentille convergente. F_{scat} pointe vers le point focal f de la lentille. Figure extraite de [57]. D) La bille dans le piège « voit » un potentiel harmonique [58] autour de sa position d'équilibre x_0 en absence de contrainte externe. Un déplacement latéral de la bille sous l'effet d'une contrainte externe (flèche violette) s'accompagne d'une force de rappel élastique (flèche rouge). La contrainte externe est compensée par la force de rappel définissant une nouvelle position d'équilibre x_1 pour la bille.

billes de taille micrométrique dans un piège optique et comment on peut mesurer les forces nécessaires au piégeage. Puis je décrirai le montage expérimental correspondant au double piège optique que j'ai utilisé au cours de ma thèse, et son application à l'étirement du fragment d'ARNr d'intérêt.

II.1.1 Principe de la mesure de force dans un piège optique

a) Qu'est-ce qu'un piège optique ?

Un piège optique est un dispositif expérimental permettant la manipulation d'une bille de taille micrométrique (diamètre noté ϕ dans la suite) à l'aide d'un faisceau laser. Le faisceau laser, focalisé par un objectif de microscope (l'objectif du piège) à grande ouverture numérique, crée un fort champ électromagnétique au niveau du point focal de l'objectif. Ce champ exerce des forces sur la bille et la confine autour d'une position d'équilibre.

Le laser utilisé dans cette thèse, $Nd : YVO_4$, émet un faisceau de longueur d'onde

$\lambda=1064$ nm. Par conséquent, la taille du faisceau au niveau du point focal de l'objectif du piège est du même ordre de grandeur que le diamètre de la bille piégée ($\lambda \simeq \phi$ comme illustré dans la figure II.1A). Dans ces conditions, on ne peut pas calculer exactement la force exercée par le faisceau laser sur la bille. On peut cependant comprendre l'origine de la force en se plaçant soit dans l'approximation de l'optique géométrique ($\lambda \ll \phi$), soit dans le régime optique de Rayleigh ($\lambda \gg \phi$).

Régime de l'approximation de l'optique géométrique. Dans ce régime, la propagation des rayons lumineux dans un milieu isotrope d'indice optique homogène se fait en ligne droite. Au niveau d'une interface, le faisceau est dévié suivant les relations de *Snell-Descartes*. Les rayons lumineux ainsi tracés décrivent la propagation des photons du faisceau. Les photons transportent une quantité de mouvement, par conséquent, la déviation d'un rayon lumineux au niveau des interfaces entre le milieu environnant et la bille s'accompagne d'un transfert de quantité de mouvement des photons à la bille. Le transfert de quantité de mouvement résultant peut être décomposé suivant une force axiale F_{scat}^{\rightarrow} et une force orthogonale F_{grad}^{\rightarrow} [57, 59].

La figure II.1B-C décrit un cas pratique de deux situations pour lesquelles on montre que les forces F_{scat}^{\rightarrow} et F_{grad}^{\rightarrow} maintiennent la bille dans une position d'équilibre au niveau du point focal de l'objectif.

Régime optique de Rayleigh. Ce régime optique permet de dériver une expression pour les forces F_{scat} et F_{grad} introduites précédemment.

$$F_{scat} = \frac{I_0 \sigma n_m}{c} \quad \text{avec} \quad \sigma = \frac{2\pi^5 \phi^6}{3 \lambda^4} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 \quad (\text{II.1})$$

$$F_{grad} = \frac{\pi \alpha}{4c n_m^2} \nabla I_0 \quad \text{avec} \quad \alpha = n_m^2 \phi^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \quad (\text{II.2})$$

$m = n_b/n_m$ est le rapport de l'indice de réfraction de la bille sur celui du milieu environnant.

\mathbf{F}_{scat} correspond au changement par unité de temps de la quantité de mouvement incidente. Pour un faisceau incident de puissance P dans un milieu environnant d'indice de réfraction n_m , $F_{scat} = \frac{n_m P}{c}$ où c est la vitesse de la lumière dans le vide. Pour une bille non-absorbante, la puissance incidente est égale à la puissance diffusée. En introduisant la section efficace de diffusion et l'intensité du faisceau incident $P = \sigma I_0$, on en déduit l'expression de F_{scat} donnée par l'équation II.1.

\mathbf{F}_{grad} résulte de l'interaction du dipôle induit avec le champ électrique E . Le moment dipolaire p est proportionnel à la polarisabilité du dipôle α et au champ électrique E . L'énergie U du dipôle s'exprime par conséquent $U \sim pE \sim \alpha E^2 \sim \alpha I_0$. La force F_{grad} s'écrit donc $F_{grad} \sim \nabla U \sim \alpha \nabla I_0$. Quantitativement, F_{grad} est donné par l'équation II.2.

A partir de ces relations, on peut estimer l'influence des paramètres sur la qualité du piège. Premièrement, on voit que la bille doit être composée d'un matériau ayant un indice optique différent de celui du milieu environnant ($m \neq 1$). De plus, l'indice optique

du matériau de la bille influence peu la raideur du piège par rapport au diamètre de la bille.

On a vu comment on est capable de confiner une bille de taille micrométrique en utilisant un faisceau laser focalisé par un objectif de microscope à grande ouverture numérique. Tout écart de la bille autour de sa position d'équilibre s'accompagne d'une force de rappel décomposable selon deux directions orthogonales $F_{grad}^{\vec{}} + F_{scat}^{\vec{}}$.

b) Comment mesure-t-on des forces dans un piège optique ?

Par la suite, j'utiliserai le piège optique pour mesurer les forces exercées sur un fragment d'ARN d'intérêt relié à la bille piégée (je montrerai comment dans la section suivante). C'est-à-dire que l'expérience consistera au niveau du piège optique, à exercer une contrainte extérieure sur la bille piégée et d'en déduire la force de rappel du piège conduisant à la nouvelle position d'équilibre de la bille (cf Fig. II.1D).

Le dispositif expérimental est conçu de sorte à imposer une contrainte extérieure selon la direction perpendiculaire à la propagation du faisceau. La force de rappel correspond dans ce cas uniquement à $F_{grad}^{\vec{}}$.

Cette méthode requiert la calibration du piège optique. C'est-à-dire que pour déduire la force F_{grad} exercée sur la bille depuis sa position dans le piège, l'expérimentateur doit connaître la raideur du piège k . En pratique, la calibration du piège consiste à mesurer la position de la bille dans le piège sous l'effet d'une contrainte extérieure connue.

En conclusion, pour mesurer la force et calibrer le piège, il faut un système de détection de la position de la bille. Le plus communément employé est une mesure indirecte qui consiste à observer comment le faisceau incident à l'origine du piège optique est diffracté par la bille piégée. La calibration du piège optique est expliquée à la fin de ce chapitre à partir d'une mesure expérimentale.

c) Mesure de la position relative de la bille dans le piège

La figure de diffraction de la bille dans le piège est collectée par un objectif de microscope (l'objectif de collecte ou condenseur).

Projection. La figure de diffraction est ensuite projetée sur un détecteur de position conjugué avec la pupille arrière de l'objectif de collecte (*back focal plane detection*). L'image résultante sur le détecteur est une tâche d'Airy dont la position dépend de la position de la bille dans le piège.

L'intérêt de ce mode de projection est qu'on observe en bonne approximation la transformée de Fourier de l'objet dans le piège au niveau du détecteur. Donc toute translation du piège, en particulier due aux dérives temporelles, n'affecte pas l'intensité du signal sur le détecteur [60, 61].

Mesure de la position de la figure de diffraction. La mesure de la position de la figure de diffraction peut être réalisée par une photodiode quatre quadrants. Chaque quadrant génère une tension électrique proportionnelle à l'intensité de l'image incidente.

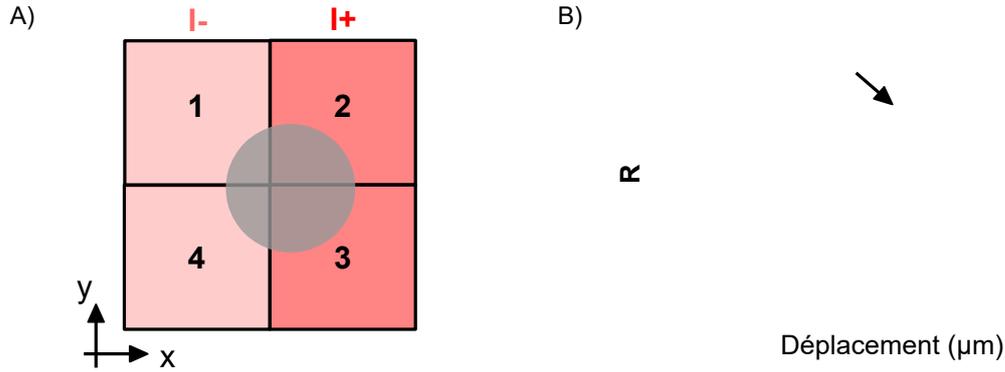


Fig. II.2 Mesure de la position de la figure de diffraction. A) Représentation des quadrants du détecteur numérotés de 1 à 4. $R = \frac{I_+ - I_-}{I_+ + I_-}$ quantifie la position du spot dans la direction x . $rI_+ = V_2 + V_3$ ($rI_- = V_1 + V_4$) correspond à l'intensité du signal dans la partie droite (gauche) du détecteur (r est la résistance électrique associée aux quadrants). B) R en fonction de l'écart x relatif à la position d'équilibre de la bille dans le piège. La flèche indique qualitativement la réponse du détecteur au cas décrit en A). Figure extraite de [58].

On mesure les tensions électriques générées sur chaque quadrant, d'où on déduit la position de l'image sur la photodiode.

On montre qu'il existe une relation linéaire entre la position de l'image sur le détecteur R et la position de la bille dans le piège sur une certaine gamme de déplacement (cf Fig. II.2) [58]. Par conséquent, il existe également une relation de proportionnalité entre la force de rappel et la tension générée par le capteur (équation II.3).

$$\left. \begin{array}{l} R(x) = \rho x \\ F(x) = kx \end{array} \right\} F(x) = \frac{k}{\rho} R(x) \quad (\text{II.3})$$

Conclusion. La force est une fonction linéaire du signal de tension délivré par le capteur. Le coefficient de proportionnalité est le rapport entre la raideur du piège k et la sensibilité du détecteur ρ . Il faut donc réaliser à la fois la calibration du piège optique mais aussi du système de détection pour en déduire la force comme nous le verrons à la fin du chapitre.

II.1.2 Montage expérimental : double piège optique

Le montage utilisé dans cette thèse est constitué de deux pièges optiques (Fig. II.3). Un des pièges est maintenu à une position fixe et est utilisé pour la mesure de la force. L'autre piège est mobile et permet d'imposer un étirement de la construction moléculaire à l'origine de la contrainte extérieure.

Les pièges fixe et mobile sont issus de la même source laser. Le laser utilisé dans cette thèse, $Nd : YVO_4$, émet un faisceau de longueur d'onde $\lambda=1064$ nm, de

C1

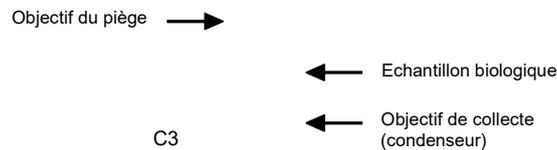


Fig. II.3 Description du montage optique. Le faisceau correspondant au piège mobile est réfléchi par un miroir piloté par une cale piézoélectrique, de sorte à imposer l'angle d'incidence du faisceau au niveau de la pupille arrière de l'objectif du piège. Figure extraite de [62].

polarisation rectiligne et délivrant une puissance de 2W. On utilise une longueur d'onde dans l'infrarouge pour limiter l'échauffement de l'échantillon lors de la mesure de force.

Le faisceau est séparé suivant deux chemins optiques par un cube séparateur en polarisation sélectionnant deux polarisations rectilignes orthogonales. Ces deux faisceaux sont à l'origine des deux pièges optiques. L'intérêt de générer les deux pièges à partir de la même source laser est de limiter les sources de dérive. Pour la même raison, le reste du montage est optimisé pour réduire le chemin optique et notamment les chemins optiques qui diffèrent selon le piège fixe ou mobile.

Après recombinaison des faisceaux fixe et mobile au niveau du cube C2, un télescope permet d'assurer un bon remplissage de la pupille arrière de l'objectif du piège par les faisceaux incidents.

Enfin, le cube C3 permet de ne sélectionner que la lumière provenant du piège fixe lors de la mesure de force.

Particularités du piège mobile. La polarisation des faisceaux est altérée lors du passage dans les objectifs de microscope, de sorte que la recombinaison des deux faisceaux, polarisés perpendiculairement avant les objectifs, conduit à une figure d'interférence en sortie des objectifs de microscope. Pour limiter cet effet parasite, le faisceau correspondant au piège mobile est décalé de ± 80 MHz par rapport à la fréquence optique du laser [63]. Le décalage est réalisé par un modulateur acousto-optique qui agit comme un réseau de diffraction accordable en fréquence. Le faisceau incident émerge du modulateur acousto-optique suivant plusieurs ordres de diffraction. La fréquence des ordres $\pm m$ de diffraction correspond à la fréquence de l'onde incidente $\pm mF$, où $F = 80$ MHz est la radio-fréquence de fonctionnement du modulateur acousto-optique.

De plus, la réflexion du faisceau sur un miroir mobile piloté par une cale piézoélectrique permet d'imposer le déplacement du piège lors de la mesure. Comme discuté précédemment, le déplacement du piège mobile est réalisé perpendiculairement à la direction de propagation du faisceau fixe de sorte de mesurer la force de rappel F_{grad} . Enfin, le déplacement du piège lors de la mesure de force doit correspondre à la direction de la mesure de tension au niveau du détecteur.

Objectifs du piège et de collecte. L'objectif du piège est un objectif à immersion à huile ($n=1.5$) permettant une grande ouverture numérique (1.4). Cet objectif a par conséquent une distance de travail très réduite ($\sim 170 \mu\text{m}$). Cette configuration permet notamment de piéger des billes d'indice optique faible comme les billes de silice : 1.43-1.46 contre 1.59-1.60 pour le polystyrène (mesuré à 589 nm). Pour limiter les aberrations sphériques, les mesures de force sont effectuées à proximité ($5 \mu\text{m}$) de la surface de la cellule contenant l'échantillon biologique [59].

L'objectif de collecte est un objectif à immersion à eau ($n=1.33$) d'ouverture numérique (1.2). On collecte par conséquent beaucoup de photons en sortie du piège améliorant le rapport signal sur bruit au niveau du capteur de position. En pratique, le choix de l'objectif de collecte, et donc la distance de travail (~ 1 mm), est adaptée à l'épaisseur de la cellule optique contenant l'échantillon biologique (~ 0.5 mm).

Remarques. La détection en mode pupille arrière (*back focal plane*) a été discutée précédemment. Par souci de pédagogie, j'ai introduit le principe de fonctionnement du détecteur en considérant une diode quatre quadrants. En pratique, on utilise un détecteur PSD qui possède les mêmes caractéristiques électroniques qu'une photodiode quatre quadrants avec des propriétés optiques meilleures [59].

De plus, l'ensemble du montage est disposé sur une table optique anti-vibration et protégé de la poussière et des courants d'air par une protection mécanique. Enfin, la salle est maintenue à une température constante.

J'ai décrit le principe de la mesure de force dans un piège optique ainsi que le dispositif expérimental. Dans la section suivante, je décrirai la préparation de l'échantillon biologique et de la cellule optique.

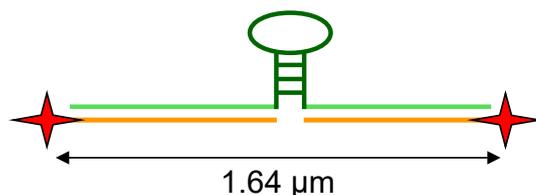


Fig. II.4 Construction moléculaire utilisée pour les mesures de force. L'ARN (vert) est hybridé de part et d'autre du fragment d'intérêt (vert foncé) par des poignées d'ADN (orange). Les poignées d'ADN portent des résidus biotine (rouge).

II.2 Mise en place d'une expérience

La mesure de force nécessite la préparation de constructions moléculaires contenant le fragment d'ARN d'intérêt. Les différentes étapes de la synthèse de la construction moléculaire sont décrites en détail dans la publication [62] et disponible en annexe B.

II.2.1 Description de la construction moléculaire

La construction moléculaire est illustrée dans la figure II.4. La molécule d'ARN comprend l'opéron *rrnB*. Elle est hybridée de part et d'autre du fragment d'intérêt par des poignées d'ADN. Ces poignées facilitent la manipulation de la molécule lors du piégeage tout en assurant l'ancrage de la molécule au niveau des billes.

Poignées d'ADN. Chaque poignée d'ADN est complémentaire d'un fragment de la molécule d'ARN et contient un résidu biotine. La biotine est une petite molécule (244 Da) que l'on a accroché de façon covalente à une base azotée de la poignée d'ADN au niveau de l'une des extrémités. La biotine possède une forte affinité pour la streptavidine.

Hybridation ARN/ADN. Il est possible d'obtenir des hybrides ARN/ADN à partir des molécules d'ADN (double brin) et d'ARN (simple brin) dont les séquences sont complémentaires. On utilise la propriété que les hybrides ARN/ADN sont thermodynamiquement plus stables que les duplexes ADN/ADN de composition identique.

Une fois formés, les hybrides ARN/ADN ont une stabilité limitée dans le temps. J'ai travaillé à partir de solutions d'hybrides fraîchement préparées (1 à 2 mois après l'étape d'hybridation, aliquotées et stockées à -20°C , trois décongélations successives maximum).

II.2.2 Assemblage du complexe billes/molécule

L'hybride ARN/ADN est attaché au niveau des extrémités à un couple de billes permettant sa manipulation dans le double piège optique. On utilise des billes décorées en surface par des streptavidines.

La streptavidine est une protéine (53 kDa) organisée en tétramères. Le couple biotine/streptavidine possède une forte affinité et permet de résister à des forces de plusieurs dizaines de pN pendant plusieurs minutes. La fixation par la streptavidine d'un résidu biotine se fait via des interactions non-covalentes et ne nécessite par conséquent pas d'étape

d'activation, une simple incubation à température ambiante de quelques minutes suffit. Ces propriétés remarquables font du couple biotine/streptavidine un couple de choix dans le design de ces expériences.

On se place dans des conditions d'un excès de billes par rapport aux molécules, de sorte que l'attachement de plusieurs molécules par un même couple de billes soit un événement très improbable. En pratique, on choisit la concentration de billes qui permet une manipulation aisée lors de l'expérience de mesures de force et on adapte la concentration de la solution de molécules de façon empirique.

La solution de complexe billes/molécule est ensuite incubée dans le tampon expérimental avant d'être déposée dans une cellule optique pour l'expérience d'étirement. Le tampon expérimental utilisé est très proche de celui employé pour la première étape de la reconstitution *in vitro* de la grande sous-unité du ribosome :

20 mM hepes (pH 7.6), 400 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 % (w/v) PEG₅₀₀₀.

II.2.3 Préparation de la cellule optique

La cellule optique consiste en un canal (2.2 cm × 0.1 cm × 120 μm) formé par deux bandes de *parafilm* fondu entre deux lamelles de microscope (épaisseur ~ 150 μm). L'échantillon biologique est déposé dans le canal via le cône de la pipette. La solution est aspirée dans le canal par capillarité. Ce phénomène est d'autant plus efficace que le revêtement du canal est très mouillant comme nous le verrons dans le paragraphe suivant. Enfin, la cellule optique est scellée pour prévenir l'évaporation de l'échantillon [62].

La cellule optique ainsi préparée est ensuite placée entre les objectifs de piège et de collecte du piège optique.

II.2.4 Passivation des surfaces

Les dimensions de la cellule optique, ainsi que la géométrie de l'expérience d'étirement, rendent compte d'un rapport surface/volume élevé. Or les expériences menées dans cette thèse sont réalisées la plupart du temps en présence des protéines ribosomiques à des concentrations de plusieurs μM. Il en résulte que des techniques de passivation de surface ont dû être employées pour mener ces mesures dans de bonnes conditions. Il existe de nombreuses méthodes dans la littérature, je me suis particulièrement inspiré des méthodes décrites dans la référence [64].

Passivation des lamelles de microscope. Ces conditions expérimentales pertinentes vis-à-vis de l'intérêt biologique de l'étude sont cependant défavorables à la stabilité de la solution de billes. Si rien n'est fait, on observe rapidement l'agrégation des billes au niveau de la surface de la lamelle de microscope, ce qui réduit fortement les chances d'effectuer des mesures d'étirement. C'est pourquoi, les lamelles sont traitées en surface par un film hydrophile de PEG₅₀₀₀ (PolyEthylène Glycol, 5000 Da) pour limiter les interactions non-spécifiques des billes comme décrit dans la figure II.5A-B. Ce traitement est très efficace dans nos conditions expérimentales et prévient le problème d'agrégation des billes au niveau de la surface de la lamelle de microscope.

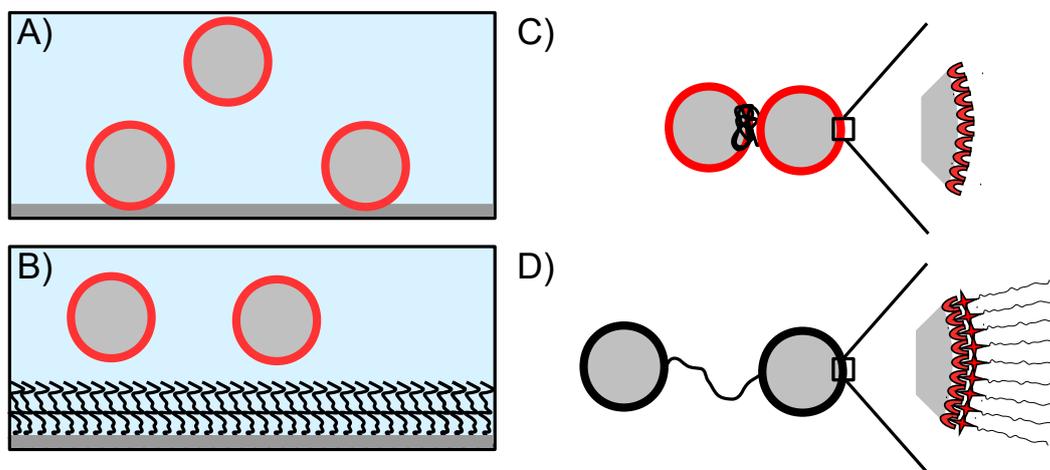


Fig. II.5 Techniques de passivation employées. A) Dans nos conditions expérimentales et en l'absence de traitement de surface, on observe rapidement l'adsorption non-spécifique des billes au niveau de la surface de la lamelle de microscope. B) La passivation des surfaces des lamelles de microscope au PEG réduit significativement l'adsorption non-spécifique des billes. C) En présence des protéines ribosomiques, on observe l'agrégation des billes. L'agrégation est d'autant plus favorable qu'une construction moléculaire relie des billes deux à deux. D) La présence de PEG portant un résidu biotine à l'une des extrémités dans la solution expérimentale permet de prévenir l'agrégation des billes deux à deux. On interprète ce résultat comme une modification des propriétés physico-chimiques de la surface des billes due à la fixation du PEG.

Passivation des complexes billes/molécule. Dans nos conditions expérimentales, et en l'absence de passivation de la surface des billes, j'ai observé l'agrégation des billes deux à deux favorisée par la présence des protéines ribosomiques en solution. En particulier, les couples de billes reliées par des molécules sont d'avantage susceptibles de s'agréger deux à deux.

Un effort particulier a été nécessaire au cours de la thèse pour développer des techniques prévenant ce problème. J'ai essayé plusieurs approches dont une s'est avérée particulièrement efficace, à savoir le blocage des billes au PEG, dont le principe est décrit dans la figure II.5C-D. La mise en œuvre pratique peut être effectuée de plusieurs façons différentes. Une approche très simple consiste à incuber les complexes billes/molécule à température ambiante pendant 15 min dans une solution à 0.1 % (w/v) de PEG₅₀₀₀ contenant un résidu biotine à l'une des extrémités avant l'ajout des protéines ribosomiques dans le tampon expérimental. Les streptavidines libres au niveau de la surface des billes sont alors saturées en molécules de PEG, assurant un film hydrophile efficace pour prévenir l'adsorption non-spécifique des protéines ribosomiques.

Conclusion. La mise en œuvre de ces techniques de passivation m'a permis de réaliser les mesures de force dans de bonnes conditions. Le revêtement hydrophile de PEG est connu pour réduire les interactions non-spécifiques des protéines avec les surfaces (majoritairement dominées par des interactions hydrophobes). J'ai montré que les protéines

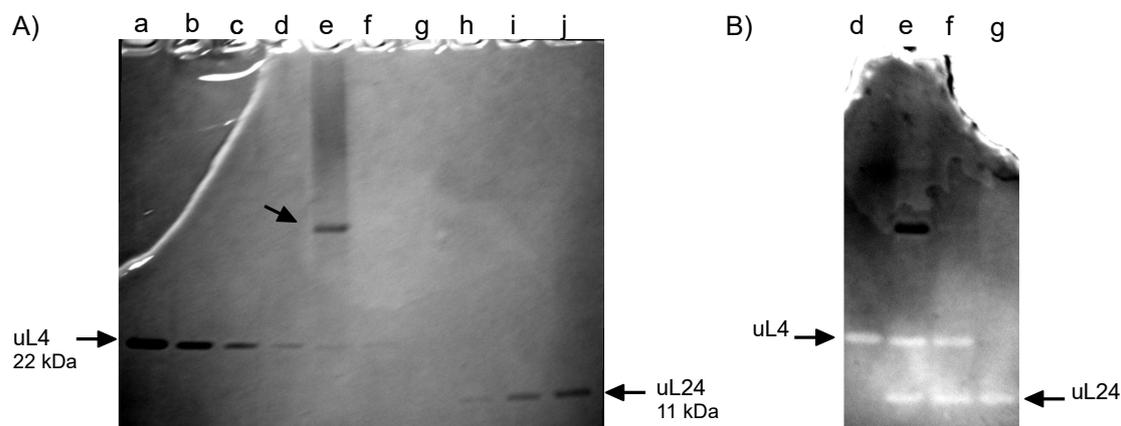


Fig. II.6 Gel de polyacrylamide. A) Révélation au bleu de Coomassie. a-d : uL4 (400 ng, 200 ng, 100 ng, 50 ng) ; g-j : uL24 (50 ng, 100 ng, 200 ng, 400 ng) ; e : contenu de la cellule optique (épaisseur de parafilm : 240 μm) après incubation (1h30) d'une solution contenant uL4 (120 ng) et uL24 (60 ng) dans les mêmes conditions que la mesure de force ; f : idem en l'absence de billes et d'hybride ARN/ADN. La flèche en biais pointe une bande à ~ 50 kDa (extrapolation logarithmique), que l'on attribue à la streptavidine. L'incubation des billes dans les conditions dénaturantes du gel semble libérer les streptavidines attachées à la surface des billes. B) Révélation du même gel aux sels d'argent (SilverQuestTM Silver Staining Kit - ThermoFisher). J'ai accidentellement déchiré le gel au cours des manipulations successives. Cette méthode de révélation plus sensible permet de visualiser la présence des protéines uL4 et uL24 dans les pistes e et f.

ribosomiques restent en solution même après une incubation d'une heure dans la cellule optique en déposant le contenu de la cellule sur un gel de polyacrylamide (Fig. II.6).

II.3 Description d'une mesure

a) Paramètres importants

Lors de l'expérience d'étirement, certains paramètres peuvent faire la différence dans le rendement de l'expérience.

Distinction des complexes billes/molécule. Outre ses avantages, l'utilisation d'un hybride portant des résidus biotine aux deux extrémités présente l'inconvénient de devoir distinguer les couples de billes seulement agrégées des couples reliés par une molécule (un seul type de bille utilisé). Avec l'habitude, il est possible de faire la distinction assez rapidement en observant attentivement le mouvement brownien des billes. Les billes seulement agrégées diffusent en un bloc et leur mouvement est fortement corrélé. Malgré l'utilisation d'un tampon adapté pour limiter l'agrégation des billes en suspension, une partie non-négligeable des billes ($\sim 10\%$) sont agrégées deux à deux.

Éloignement des billes environnantes. Une de mes premières surprises pendant la thèse fut de constater l'efficacité avec laquelle les billes en silice de 1 μm de diamètre sont

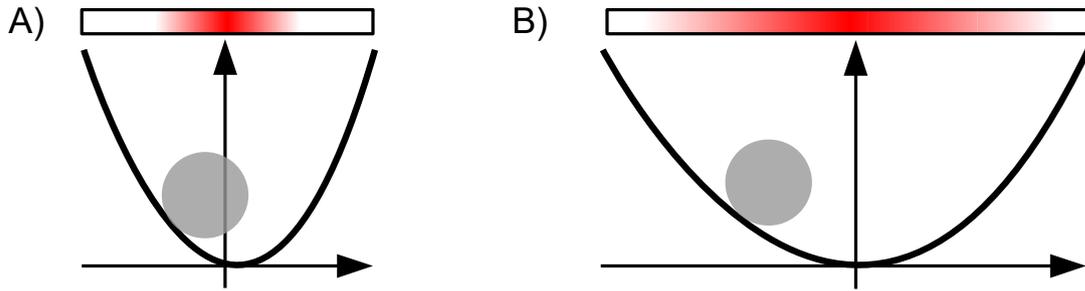


Fig. II.7 Principe de la calibration : l'amplitude des fluctuations de la position de la bille dans le piège (rouge, encadré) est d'autant plus grande que le potentiel vu par la bille est faible pour les mêmes fluctuations de la force extérieure. A) Potentiel fort : la bille est confinée autour de sa position d'équilibre (indiquée par une flèche). B) Potentiel faible : la bille explore une grande gamme de positions.

piégées dans notre montage. Il est par conséquent important d'éloigner au préalable les billes présentes dans l'environnement proche de la mesure. On assure ainsi la réalisation d'une mesure propre facilement interprétable dans la suite.

Dès lors que ces conditions sont réunies, on piège un couple de billes reliées par une molécule et on effectue plusieurs expériences d'étirement/relâchement successives jusqu'à observer la rupture de la construction moléculaire. On effectue alors la calibration du piège optique.

b) Calibration

Une fois la dissociation du complexe billes/molécule observée, on cherche à déterminer les caractéristiques du piège dans lequel on a effectué la mesure de force. La calibration du piège optique est effectuée pour chaque complexe billes/molécule. On donne ci-dessous l'exemple d'une calibration effectuée sur un complexe pour illustrer le propos.

Principe. La calibration consiste à enregistrer le signal de la bille libre dans le piège. Lors de la calibration, le piège mobile est éloigné du piège fixe. L'analyse des fluctuations du signal renseigne sur la raideur du piège [65, 66, 67]. En effet, l'amplitude des fluctuations de la position de la bille piégée est d'autant plus grande que le potentiel harmonique du piège est de faible intensité comme illustré dans la figure II.7. Les fluctuations du signal résultent du mouvement brownien des billes dont on dispose d'un modèle reliant les fluctuations de force aux fluctuations de position [68].

Mise en œuvre. On utilise un analyseur de spectre qui mesure la répartition de la puissance du signal en fonction de la fréquence (typiquement de 0.1 à 25 kHz dans notre cas). La densité spectrale de puissance de la tension délivrée par le détecteur de position $G_V(f)$ est alors ajustée par le modèle du mouvement brownien (cf annexe A).

On extrait la fréquence de coupure f_0 , dont on en déduit la raideur du piège.

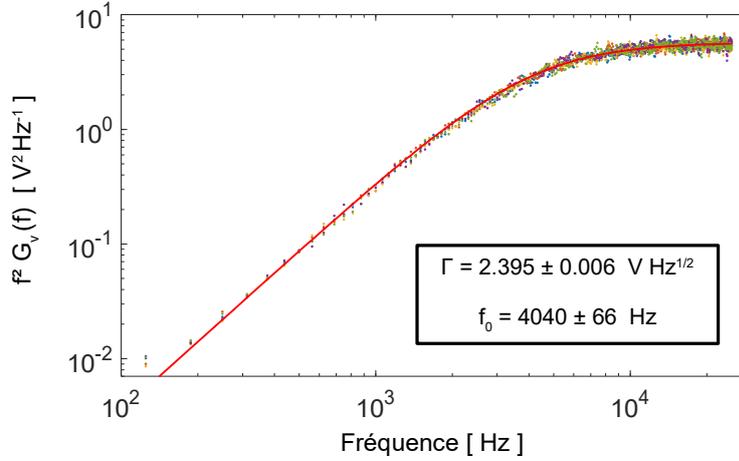


Fig. II.8 Courbe expérimentale de calibration du piège optique. Les couleurs correspondent à différentes mesures réalisées successivement sur la même bille (5 mesures). L'ajustement du modèle (cf. équation II.4 - courbe rouge) permet d'en déduire un jeu de paramètres (moyenne \pm erreur sur la moyenne).

L'asymptote à haute fréquence du spectre $G_V(f)$ (cf équation A.7) multipliée par le carré de la fréquence permet d'en déduire la sensibilité du détecteur :

$$f^2 G_V(f) = \frac{\Gamma^2}{1 + (\frac{f_0}{f})^2} \xrightarrow{f \rightarrow +\infty} \Gamma^2 \quad \text{où} \quad \Gamma^2 = \frac{D\rho^2}{\pi^2} \quad (\text{II.4})$$

Incertitude sur les coefficients mesurés. On effectue plusieurs acquisitions de spectre (N acquisitions) pour améliorer la précision sur la détermination de la fréquence de coupure f_0 , ainsi que de l'asymptote haute fréquence Γ (Fig. II.8). L'incertitude associée décroît en $\frac{1}{\sqrt{N}}$.

On en déduit la raideur du piège k ainsi que la sensibilité du détecteur ρ . Cette méthode suppose que le coefficient de diffusion de la bille soit connu :

$$D = \frac{k_B T}{\gamma} \sim \frac{k_B T}{\eta \phi g(\frac{\phi}{2h})}$$

où k_B est la constante de Boltzmann, T la température absolue, γ le coefficient de frottement, ϕ le diamètre de la bille, η la viscosité du fluide environnant et $g(\frac{\phi}{2h})$ une correction qui dépend de la hauteur h de la bille par rapport à la lamelle.

En pratique, l'incertitude sur le diamètre de la bille et/ou la viscosité du fluide environnant dominant la précision sur la détermination du coefficient de diffusion.

L'application numérique dans le cas d'une bille de $0.96 \pm 0.10 \mu\text{m}$ dans de l'eau à $29 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ (viscosité estimée à $0.87 \pm 0.09 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) située à $5 \pm 1 \mu\text{m}$ de la surface donne pour le coefficient de diffusion : $D = 0.50 \pm 0.08 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$.

Dans le cas de la mesure correspondant à la figure II.8, on en déduit la valeur de ρ depuis l'équation II.4 et l'ajustement de Γ : $\rho = 10.6 \pm 1.0 \text{ V}\mu\text{m}^{-1}$.

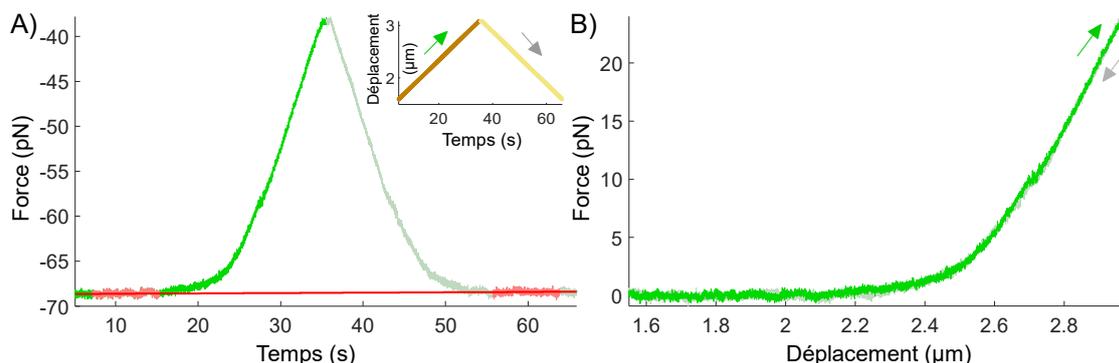


Fig. II.9 Exemple de mesure de force réalisée sur l'hybride ARN/ADN doté d'un fragment d'ARN d'intérêt pour un étirement de 50 nm/s. A) Signal converti via le coefficient de conversion *tension* \rightarrow *force*. Ligne de base (rouge) ajustée aux points expérimentaux (rouge clair). En haut à droite, la rampe de déplacement imposée. C) Signal de force corrigé.

De même, on en déduit la raideur du piège optique (équation A.2) :

$$k = 210 \pm 32 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}.$$

c) Déduction du signal de force

Une fois la calibration réalisée, on déduit le signal de force du signal d'amplitude en tension via le coefficient de conversion *tension* \rightarrow *force* (cf équation II.3). Dans l'exemple considéré ci-dessus : $\tau = \frac{k}{\rho} = 19.8 \pm 3.6 \text{ pN V}^{-1}$.

Pour déterminer l'origine du signal de force, on utilise les points de la mesure correspondant aux faibles déplacements (i.e. la molécule n'est pas sous tension) pour en déduire la ligne de base. De plus, l'existence éventuelle d'une dérive du signal pendant l'acquisition peut être modélisée par la même occasion en considérant une composante temporelle dans l'expression de la ligne de base recherchée. La dérive temporelle, de faible amplitude pour des mesures réalisées dans des conditions optimales peut en bonne approximation être modélisée par une fonction affine du temps $F(t) = at + b$. Cette approximation est d'autant plus valable que la mesure est de courte durée (≤ 1 minute).

En pratique, on effectue donc un ajustement sur cette fenêtre pour en déduire les coefficients a et b du modèle linéaire. On extrapole ensuite le modèle à l'ensemble de la mesure que l'on soustrait au signal de force.

Conclusion du chapitre II. J'ai décrit le principe du piège optique ainsi que la façon dont on met en place une expérience d'étirement sur un fragment d'ARN d'intérêt. De plus, j'ai détaillé le principe de la calibration et son application à une mesure.

Dans le chapitre suivant, je décrirai la réponse à un étirement des hybrides ARN/ADN ainsi préparés. Je montrerai notamment comment j'ai utilisé un modèle d'élasticité pour extraire de façon dynamique une information structurale des courbes de force.

Chapitre III

Réponse des polymères d'acides nucléiques à un étirement

L'objet de ce chapitre est de présenter une méthode qui permet d'analyser les courbes de force obtenues lors des expériences d'étirement des hybrides ARN/ADN introduites dans le chapitre précédent. Dans un premier temps, je présenterai succinctement les caractéristiques des polymères d'acides nucléiques (dont font partie les hybrides ARN/ADN) pour la compréhension de leur comportement mécanique. Dans un deuxième temps, je présenterai le modèle du ver (*Worm Like Chain - WLC*) dont on verra qu'il permet de décrire les mesures de force présentées dans cette thèse. Enfin, je montrerai comment l'application du modèle du ver au cas des hybrides ARN/ADN dotés du fragment d'ARN d'intérêt 281-359 (cf chapitre I) permet d'établir une cartographie de la stabilité des structures adoptées par le fragment d'ARN.

III.1 Caractéristiques des polymères d'acides nucléiques

III.1.1 Généralités

Les polymères d'acides nucléiques assurent des fonctions essentielles dans la cellule.

L'ADN (Acide DesoxyriboNucléique) est le support du code génétique. Il est constitué par la répétition des nucléotides Adénosine (A), Guanosine (G) (bases purines), Cytosine (C), Thymine (T) (bases pyrimidines) reliés par des liaisons phosphodiester qui définit la séquence (structure primaire) du code génétique (cf Fig. III.1A).

L'ADN est organisé en double hélice, structure secondaire dans laquelle deux brins sont hybridés de façon antiparallèles via des liaisons hydrogènes entre nucléotides complémentaires (A et T, G et C) formant des paires de bases. De plus, des interactions de Van der Waals entre nucléotides voisins (*stacking*) stabilisent la structure en double hélice. La double hélice d'ADN la plus couramment observée *in vivo* est de type *B* (cf Fig. III.1B).

Le génome bactérien est organisé sous la forme d'un unique chromosome circulaire. Des fragments de génome plus petits, les plasmides, confèrent à la bactérie des propriétés particulières notamment en période de stress.

L'ARN (Acide RiboNucléique) est un polymère constitué des nucléotides A, G, U et

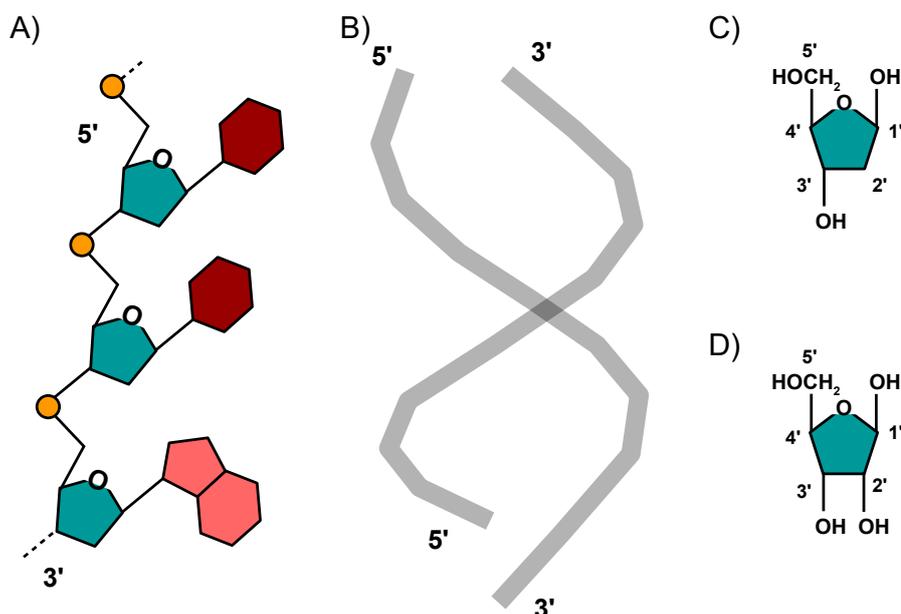


Fig. III.1 A) Schéma d'un brin d'ADN constitué par la succession de nucléotides. Un groupement phosphate (orange) assure une liaison phosphodiester entre les extrémités 3' et 5' des nucléosides. Les nucléosides sont formés d'un pentose (bleu) et d'une base azotée (rouge). On distingue les bases pyrimidines (rouge foncé) des bases purines (rouge clair). B) Un tour de double hélice d'ADN de type B (10 paires de base - 3.4 nm, pour un diamètre de 2 nm). Le sens de rotation est dextrogyre, les paires de bases sont organisées perpendiculairement à l'axe de la double hélice. Structure extraite du code PDB 5J3G [69] et représentée par l'éditeur NGL. Le squelette de la double hélice est représenté en gris. C) Pentose de l'ADN. D) Pentose de l'ARN. Le carbone 2' porte un groupement hydroxyle (-OH).

C, où U désigne l'uracile. Dans le cas de l'ARN, le ribose porte un groupement hydroxyle (-OH) au niveau du carbone 2' (cf Fig. III.1C-D).

L'ARN intervient à tous les niveaux de l'expression génique et en particulier lors de la traduction via l'ARN ribosomique, l'ARN messager et l'ARN de transfert.

In vivo, on trouve majoritairement l'ARN sous la forme simple brin. L'ARN adopte également différentes structures.

Les structures secondaires en double hélice, sont formées par le repliement de la molécule sur elle-même. La structure en double hélice adoptée par l'ARN est de type A. Son diamètre est estimé à $d = 2.2$ nm [70].

L'ARN adopte également des structures tertiaires et plusieurs motifs récurrents ont été mis en évidence. Les cations, notamment le magnésium, sont connus pour stabiliser ces structures. En raison du grand nombre de paramètres à prendre en considération, les techniques actuelles de prédiction des structures tertiaires de l'ARN sont peu fiables [71, 72].

Le repliement de l'ARN assure des fonctions très importantes dans la cellule. Le ribosome est un exemple de *ribozyme* dans la mesure où, comme on l'a vu dans le chapitre I,

l'ARNr 23S est directement impliqué dans la formation de la liaison peptidique du polypeptide en cours de synthèse.

Enfin, *in vivo*, on trouve également de l'ARN hybridé à une molécule complémentaire d'ADN pour former des structures secondaires. C'est le cas par exemple au niveau de l'ARN polymérase en cours de transcription [73].

III.1.2 Caractéristiques mécaniques

Un point commun aux polymères d'acides nucléiques est leur capacité à adopter des structures qui leur confèrent des propriétés mécaniques particulières. Les modèles d'élasticité ont été élaborés pour rendre compte des propriétés mécaniques des polymères à partir d'un nombre limité de paramètres.

La longueur cristallographique L est la longueur du polymère que l'on obtient à partir des données structurales. Dans le cas de la double hélice, c'est le produit de la distance séparant deux paires de bases consécutives l_t par le nombre de paires de base. Pour l'hybride ARN/ADN, structuré en hélice de type A , la littérature propose plusieurs valeurs de l_t comprises entre 0.28 et 0.30 nm [74, 75, 76].

La molécule d'ARN utilisée dans cette thèse a une longueur de 5662 nucléotides à laquelle il faut soustraire la longueur du fragment d'intérêt pour déterminer la longueur de l'hybride ARN/ADN correspondant¹. J'ai ainsi estimé la longueur cristallographique de l'hybride ARN/ADN : $L_0 = 1.64 \pm 0.02 \mu\text{m}$.

Pour l'hélice de type B , la distance entre deux paires de bases consécutives est estimée à 0.34 nm [70]. Une molécule d'ADN de 4.8 kilobases (kb) aura donc la même longueur cristallographique que l'hybride ARN/ADN de 5.6 kb considéré dans cette thèse.

Pour le fragment d'ARN d'intérêt, sous la forme simple brin, la littérature s'accorde sur la valeur $l_t = 0.59 \text{ nm}$ [77, 78]. Dans le cas du fragment d'ARN 23S compris entre les nucléotides 281 et 359, on estime la longueur cristallographique de la forme simple brin à $79 \times 0.59 = 46.6 \text{ nm}$.

La longueur de persistance A est la longueur au-delà de laquelle le polymère a oublié son orientation initiale sous l'effet de l'agitation thermique $k_B T$.

La littérature fournit la longueur de persistance à partir de plusieurs techniques expérimentales et dans le cas de la double hélice d'ADN ou de l'hybride ARN/ADN, une valeur communément admise est 50 nm (cette valeur dépend des conditions expérimentales et notamment de la concentration en sel).

Dans le cas de l'ARN simple brin, la longueur de persistance communément adoptée est $A = 1 \text{ nm}$ [79, 80, 78].

III.2 Modèles d'élasticité

L'hybride ARN/ADN considéré ($L \gg A$) adopte spontanément une forme de pelote en solution. Cette pelote est bien décrite par une marche aléatoire de $L/2A$ pas de longueur

1. On doit en toute rigueur tenir compte également de la taille des fragments correspondant aux résidus biotine et streptavidine.

$2A$ (longueur de Kuhn du polymère), pour laquelle le second moment de la distribution de la distance bout à bout du polymère vaut $2AL$.

L'application numérique ($A \simeq 50$ nm, $L \simeq 1.64$ μ m) permet d'estimer les fluctuations de la longueur bout à bout de la molécule égale à 0.4 μ m. Cette longueur est du même ordre de grandeur que le diamètre des billes (0.96 μ m) utilisées pour attacher l'hybride ARN/ADN au niveau des extrémités.

III.2.1 Modèle du polymère semi-rigide (*semi-flexible polymer*)

Dans le cas d'une force extérieure non-nulle F , la distance bout à bout X du polymère est bien décrite par la relation suivante (équation III.1) [81] :

$$F = \frac{k_B T}{4A} \left(\frac{1}{(1 - X/L)^2} - 1 + 4 \frac{X}{L} \right) \quad (\text{III.1})$$

Cette relation décrit l'élasticité du polymère à partir de l'étude de la courbure de sa chaîne [82]. Elle est valable dans le régime pour lequel la distance bout à bout est inférieure à la longueur cristallographique du polymère. Dans la littérature, cette relation est utilisée pour décrire le comportement élastique de l'ADN et l'ARN [83, 79].

Cette relation nous indique qu'il faut développer une force $F^* \sim k_B T/A$ pour dérouler significativement la pelote. La force F^* nécessaire est bien plus faible dans le cas double brin ($F_{db}^* \simeq 0.1$ pN) que dans le cas simple brin ($F_{sb}^* \simeq 4$ pN).

De plus, pour une force appliquée $F \gg k_B T/A$, le polymère atteint un état quasiment tout étiré ($X \sim L$).

Les forces considérées dans cette thèse (< 20 pN) sont par conséquent telles que dans le cas de l'ARN simple brin, la relation précédente (équation III.1) s'applique effectivement. Dans le cas de l'hybride ARN/ADN en revanche, les forces appliquées nécessitent aussi de prendre en compte la déformation de la double hélice pour rendre compte de l'élasticité de la molécule.

III.2.2 Modèle du polymère semi-rigide extensible

Lorsqu'on exerce une force bien supérieure à la force nécessaire pour dérouler la pelote ($F \gg k_B T/A \simeq 0.1$ pN dans le cas de l'hybride ARN/ADN), la molécule est dans un état presque tout étiré. Que se passe-t-il si on étire encore plus fortement ? La réponse tient dans l'article de T. Odijk [84].

En bon physicien, vous ne serez pas choqué si on fait l'approximation qu'un polymère d'acide nucléique presque tout étiré peut être modélisé par un bâtonnet de module d'Young Y et de diamètre $d=2$ nm. Dans ce cas, pour une longueur de persistance $A=50$ nm, le module d'Young correspondant $Y \sim k_B T A d^{-4}$ est estimé à 100 MPa.

Le module élastique K reliant la force à l'extension relative du polymère ($F = K\epsilon$) est relié au module d'Young ($K \sim Y d^2$) et vaut approximativement 1000 pN.

Dans ce cas, la contribution de la déformation de la structure en double hélice compense la modification de la courbure du polymère pour une force caractéristique

$$F^* \sim \left(\frac{k_B T K^2}{A}\right)^{1/3} \simeq 10 \text{ pN.}$$

Dans ce régime de force, on doit donc également tenir compte de la déformation de la structure en double hélice. J'utiliserai donc le modèle suivant (équation III.2) qui tient compte du module élastique K de la double hélice pour décrire la réponse élastique de l'hybride ARN/ADN.

$$X = L\left(1 - \sqrt{\frac{k_B T}{4AF} + \frac{F}{K}}\right) \quad (\text{III.2})$$

En conclusion, on dispose d'un modèle pour décrire la réponse élastique de l'hybride ARN/ADN (équation III.2) et d'un modèle pour décrire la réponse élastique de l'ARN simple brin (équation III.1). Ces deux modèles expriment une relation entre la force extérieure et la distance bout à bout du polymère.

III.2.3 Du modèle à l'expérience : adaptation

Dans le cas du dispositif expérimental utilisé dans cette thèse, le paramètre imposé est la distance entre les pièges optiques. Deux considérations sont donc à prendre en compte pour ajuster le modèle aux données expérimentales.

Le diamètre des billes qui peut varier d'une bille à l'autre. On incorpore donc dans le modèle le diamètre des billes sous la forme d'un paramètre libre ϕ . Le fabricant annonce dans le cas des billes en silice de $0.96 \mu\text{m}$ une incertitude sur le diamètre de 10 %.

La raideur mesurée dans le régime haute force, notée k , est la raideur résultante des pièges fixe (k_F) et mobile (k_M) en série avec la construction moléculaire (K/L) : $k^{-1} = k_F^{-1} + k_M^{-1} + (K/L)^{-1}$.

III.2.4 Ajustement du modèle : cas de l'ADN double brin

La figure III.2 est un exemple de courbe force/déplacement obtenue pour un ADN double brin du phage lambda de 4.7 kb sur une gamme de force de 0 à 25 pN. Les données expérimentales sont ajustées par le modèle du polymère semi-rigide extensible. Le modèle consiste en l'équation III.3 d'une variable à une dimension F , et de 4 paramètres ϕ , L , A et k .

$$X = \phi + L\left(1 - \sqrt{\frac{k_B T}{4AF}}\right) + \frac{F}{k} \quad (\text{III.3})$$

L'équation III.3 diverge lorsque la force s'annule. Par conséquent, j'ai ajusté le modèle sur les données expérimentales qui ne présentent pas de points où la force s'annule. En pratique, j'ai imposé un seuil à 2 pN.

Pour l'ajustement, une première approche consiste à réécrire l'équation III.3 sous la forme d'une équation non-linéaire en la variable, mais linéaire en ses paramètres. Pour ce type de modèle, il existe des méthodes numériques de résolution (factorisation LU, décomposition en valeurs principales, etc...). Une deuxième approche consiste à employer des méthodes numériques de résolution d'équation non-linéaires en leurs paramètres, utilisant

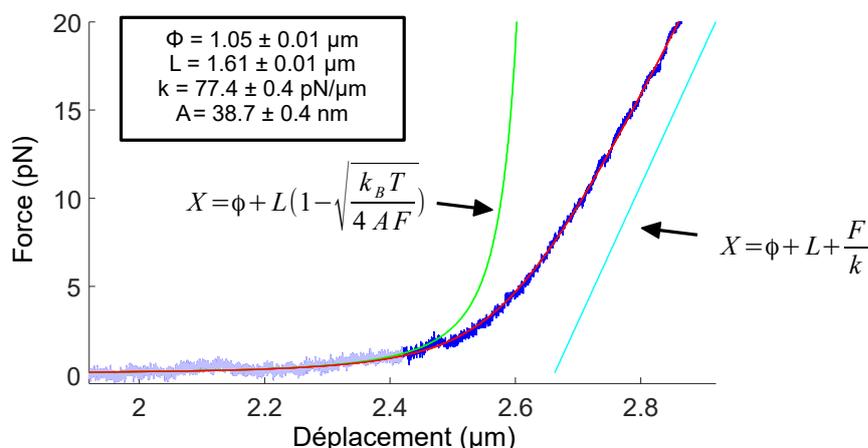


Fig. III.2 Modèle d'élasticité (équation III.3) ajusté sur des données expérimentales obtenues pour un fragment d'ADN double brin (courbe rouge). Les paramètres ajustés sont donnés en encart. Les courbes verte et cyan correspondent respectivement à l'asymptote basse force et haute force. Un seuil à 2 pN permet de distinguer les données utilisées pour l'ajustement du modèle (bleu foncé) du reste des données (bleu clair).

l'algorithme de Levenberg-Marquardt pour ajuster au mieux le modèle correspondant à l'équation III.3 aux données expérimentales [85].

Ces différentes méthodes convergent dans ce cas précis vers le même jeu de paramètres. Par la suite, j'ai utilisé la deuxième approche.²

Dans la section suivante, je montrerai comment les modèles ci-dessus peuvent être appliqués à la détermination des intermédiaires de déroulement du fragment d'ARN d'intérêt.

III.3 Application : intermédiaires de déroulement de l'ARN

III.3.1 Analyse d'une courbe typique

La figure III.3A présente un exemple de courbe force/déplacement obtenue pour l'hybride ARN/ADN contenant le fragment d'ARN d'intérêt. La courbe présente le même comportement dans les limites des forces faibles ($F < 5$ pN) et des forces élevées ($F > 15$ pN) que la courbe correspondant à l'ADN double brin (cf Fig. III.2). En revanche, la région de force intermédiaire ($5 < F < 15$ pN) est marquée par un signal de force en dents-de-scie (gros plan dans la figure III.3B), correspondant à l'ouverture du fragment d'ARN d'intérêt.

Forces en jeu. Comme discuté précédemment, le fragment d'ARN d'intérêt de l'hybride ARN/ADN adopte spontanément des structures en se repliant sur lui-même. Parmi les structures possibles, la double hélice est particulièrement stable.

2. Ces approches ont été réalisées en utilisant les fonctions disponibles sous Matlab.

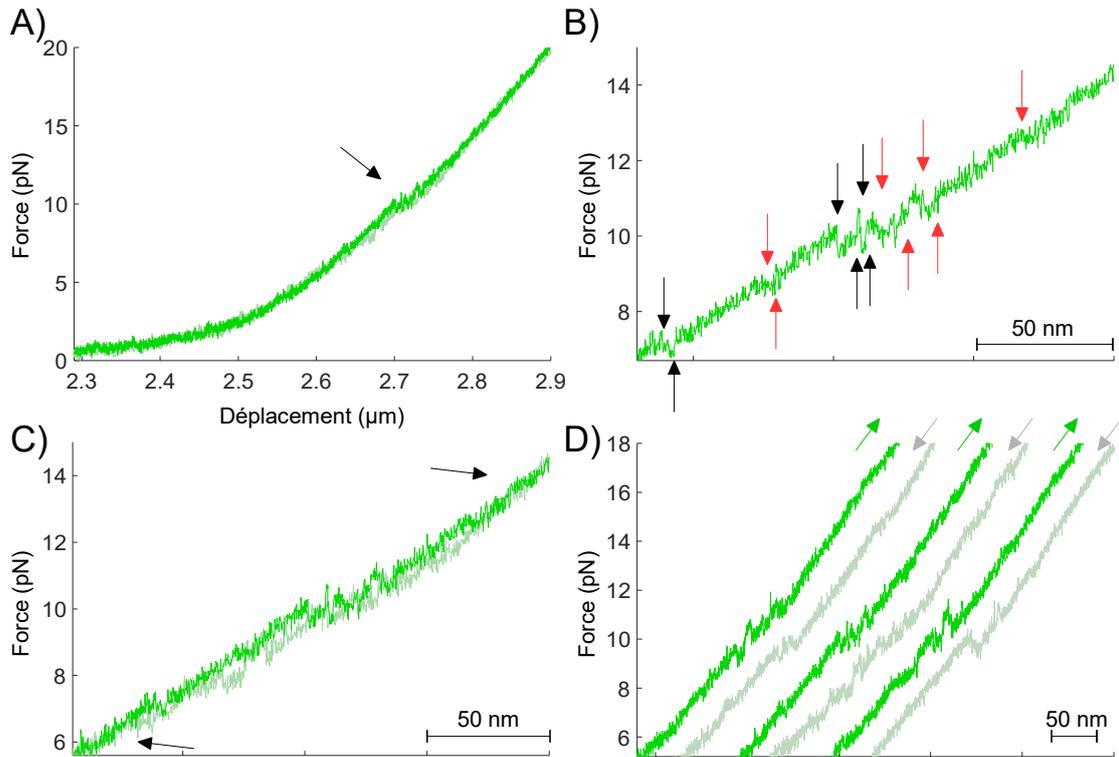


Fig. III.3 Réponse de l'hybride ARN/ADN contenant le fragment d'ARN d'intérêt pour un étirement de 50 nm/s. A) Courbe expérimentale force/déplacement. La flèche pointe les transitions du signal de force associées au dépliement de l'ARN d'intérêt. B) Gros plan sur les transitions. Les flèches noires et rouges pointent les transitions de force localisables respectivement sans et avec ambiguïté. Les flèches pointant vers le haut ou le bas correspondent respectivement au dépliement puis au repliement du fragment d'ARN d'intérêt. C) Courbes force/déplacement correspondant à l'éloignement puis au rapprochement du piège mobile respectivement en vert puis vert gris. Les flèches pointent les intervalles de force sans transitions correspondant à l'ARN d'intérêt complètement déplié (haute force) et complètement replié (basse force). D) Courbes force/déplacement réalisées pour plusieurs cycles d'éloignement/rapprochement du piège mobile. Les courbes ont été décalées suivant l'axe des abscisses pour faciliter la lecture.

L'énergie d'une liaison hydrogène est typiquement de 1 kcal/mol ou 6 pN.nm. La distance typique d'une liaison hydrogène ($O \cdots H$) est comprise entre celle de la liaison covalente ($O - H$) 0.1 nm et celle de la somme des rayons de *Van der Waals* des deux atomes pris séparément 0.26 nm, et peut être estimée à 0.18 nm [86].

On en déduit une force typique de rupture de la liaison hydrogène $\simeq 30$ pN. On retrouve ici l'ordre de grandeur des forces en jeu dans l'ouverture des structures de l'ARN.

Une estimation rigoureuse des forces en jeu doit tenir compte de nombreux paramètres. Des mesures de force sur des acides nucléiques de séquences connues ont été utilisées pour déterminer les paramètres thermodynamiques de la double hélice d'ADN [87]. Malgré ces efforts, il n'existe pas de modèle permettant de déduire directement la séquence à partir du signal de force mesuré.

Amplitude des transitions. Le signal de force en dents-de-scie montre une succession de sauts de force d'amplitude $\simeq 0.5$ pN pour un bruit $\simeq 0.2$ pN. Le rapport signal sur bruit de ces transitions est suffisant pour les repérer à l'œil nu comme on peut s'en convaincre sur la figure III.3B (flèches noires).

Une autre classe de transitions mettent en jeu des sauts de force d'amplitude proche du niveau de bruit. J'en ai repéré quelques unes sur la figure III.3B (flèches rouges). C'est pour identifier ces transitions que j'ai proposé une méthode d'analyse reposant sur l'utilisation des modèles d'élasticité.

Dépliage progressif du fragment d'ARN d'intérêt. Les transitions successives sont la signature du dépliement progressif des structures adoptées par le fragment d'ARN d'intérêt, la force extérieure étant appliquée à la base du fragment d'intérêt.

Réversibilité des transitions. Les transitions décrites dans le paragraphe précédent sont réversibles en accord avec le caractère spontané de l'acquisition des structures par le fragment d'ARN.

Lors de l'étirement, on observe une succession de transitions correspondant au dépliement (Fig. III.3B - flèches vers le bas) suivi du repliement (flèches vers le haut) du fragment d'ARN d'intérêt. Ces transitions successives dans un sens puis dans l'autre révèlent la coexistence d'états intermédiaires de dépliement de l'ARN sur l'intervalle de force considéré. L'existence de ces transitions est une signature du caractère « proche de l'équilibre thermodynamique » de l'expérience de dépliement du fragment d'ARN d'intérêt [49].

Le caractère réversible des expériences d'étirement est aussi illustré par la superposition des courbes force/déplacement obtenues lors de l'éloignement et du rapprochement du piège mobile (Fig. III.3C). On montre que la courbe de rapprochement se superpose à la courbe d'étirement dans les régions de force encadrant les transitions d'intérêt. On montre ainsi que suite à une expérience d'étirement, le fragment d'intérêt se replie spontanément en un temps caractéristique de la seconde.

Enfin, en comparant des courbes force/déplacement obtenues successivement sur la même molécule, on montre que les signaux de force sont comparables (Fig. III.3D), bien que les courbes ne se superposent pas rigoureusement du fait de la nature stochastique des transitions. Cette propriété démontre que les structures adoptées spontanément par le fragment d'ARN d'intérêt sont reproductibles d'une expérience à l'autre.

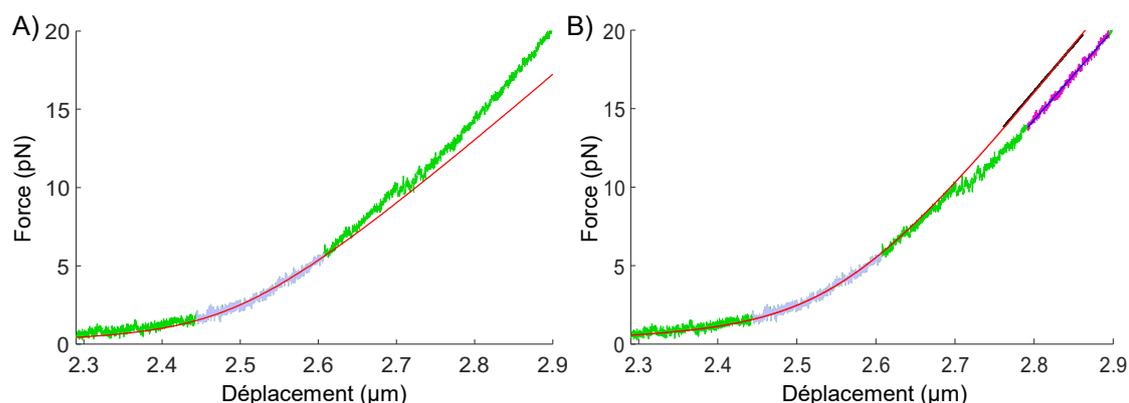


Fig. III.4 Courbe expérimentale force/déplacement pour l'hybride ARN/ADN contenant le fragment d'ARN d'intérêt. A) La courbe rouge représente le meilleur ajustement du modèle d'élasticité pour les points expérimentaux en gris. B) Idem. L'ajustement tient compte également des points expérimentaux en mauve, bien décrits par une droite (bleue), et utilisés pour extrapoler la courbe force/déplacement de l'hybride ARN/ADN (noire).

Hystérèse entre le dépliement et le repliement de l'ARN. Comme illustré dans la figure III.3C, la superposition de la courbe de rapprochement et d'éloignement montre une légère hystérèse au niveau de la région de force correspondant au signal en dents-de-scie. L'hystérèse a fait l'objet d'une étude détaillée dans le cas d'une structure modèle : le *hairpin*. Cette étude a souligné entre autres l'influence de la vitesse d'étirement dans l'hystérèse [74]. La faible hystérèse observée dans cette thèse (vitesse d'étirement de 50 nm/s) est en accord avec le caractère « proche de l'équilibre thermodynamique » des expériences de dépliement/repliement du fragment d'ARN d'intérêt.

Par la suite, je vais me concentrer sur les courbes d'étirement.

III.3.2 Ajustement du modèle aux données expérimentales

Dans la section précédente, j'ai montré que l'équation III.3 permet de décrire les courbes force/déplacement obtenues pour une molécule d'ADN. J'ai notamment montré que l'ajustement du modèle doit être réalisé sur un intervalle de force positif uniquement.

On souhaite ajuster ce même modèle aux courbes force/déplacement obtenues pour l'hybride ARN/ADN contenant un fragment d'ARN d'intérêt. Dans ce cas, les points expérimentaux impliqués dans le signal en dents-de-scie ne sont pas utilisables pour ajuster le modèle, puisqu'ils correspondent à l'hybride ARN/ADN et à une partie du fragment d'ARN d'intérêt sous la forme simple brin.

On restreint donc l'intervalle aux points expérimentaux non-impliqués dans le signal en dents-de-scie (points gris Fig. III.4A). On montre que dans ce cas, l'ajustement du modèle ne décrit pas la courbe expérimentale, en particulier dans la région des hautes forces ($F > 8$ pN).

Déduction de la courbe complètement repliée. Pour améliorer l'ajustement du

modèle, j'ai cherché une méthode permettant d'augmenter le nombre de points expérimentaux exploitables pour l'ajustement dans l'intervalle de force $F > 8$ pN.

Les points expérimentaux dans l'intervalle de force $15 \text{ pN} < F < 20 \text{ pN}$ ne présentent plus de transitions de force en dents-de-scie et la portion de courbe force/déplacement est bien modélisée par le segment $F_{as} = kx + cste$ (cf Fig. III.4B). Ces points correspondent à la construction moléculaire pour laquelle le fragment d'ARN d'intérêt est complètement déroulé, c'est-à-dire sous la forme simple brin. J'ai utilisé le modèle d'élasticité correspondant à l'équation III.1 avec les paramètres $L_c = 46.6$ nm et $A = 1$ nm (cf paragraphe III.1.2) pour calculer la courbe force/déplacement correspondant au fragment d'ARN d'intérêt. Pour chaque point de l'intervalle défini par F_{as} , j'ai alors soustrait au déplacement expérimental (x_{exp}) le déplacement calculé de l'équation III.1 (x_{WLC}) pour la force correspondante (équation III.4)³.

$$\forall F \in F_{as}, x_{extr}(F) = x_{exp}(F) - x_{WLC}(F) + d \quad (\text{III.4})$$

Par cette méthode, j'en ai déduit une extrapolation des points expérimentaux en l'absence du fragment d'ARN d'intérêt, c'est-à-dire correspondant à la seule contribution de l'hybride ARN/ADN. L'utilisation de ces points extrapolés associés aux points expérimentaux à basse force permet d'ajuster le modèle de façon robuste (cf Fig. III.4B).

Pertinence de l'ajustement du modèle. Cette méthode permet de déduire un jeu de paramètres pour lequel la courbe modèle décrit très bien la courbe expérimentale (cf Fig. III.4B).

En revanche, les paramètres déterminés sont parfois très différents des valeurs connues dans la littérature. C'est le cas en particulier de la longueur de persistance. J'interprète ce résultat comme une complexité du modèle trop grande par rapport aux données expérimentales effectivement disponibles pour l'ajustement. J'ai donc cherché à introduire une contrainte sur la détermination des paramètres.

Ajustement contraint : 4 paramètres dont 3 libres. Pour assurer que la recherche d'un jeu de paramètre optimal converge vers un jeu de paramètres pertinent d'un point de vue physique, j'ai choisi d'introduire une relation (équation III.5) entre les quatre paramètres ϕ , L_0 , A_0 et k . Cette relation permet de substituer la longueur de persistance A_0 par le produit de la longueur cristallographique L_0 et de la raideur apparente de la mesure k .

$$f_t = \frac{k_B T}{4A_0 L_0 k} = 2.1 \cdot 10^{-4} \quad (\text{III.5})$$

f_t est une constante dont la valeur numérique est en accord avec les valeurs de L_0 et A_0 proposées dans la littérature, ainsi que la valeur moyenne de k observée dans nos expériences.

L'introduction d'une relation entre les 4 paramètres du modèle assure une contrainte qui réduit le nombre de paramètres libres du modèle à 3. Il existe plusieurs méthodes

3. J'ai tenu compte du diamètre de la double hélice d'ARN (d) dans l'équation III.4. Une meilleure approximation consisterait à considérer un modèle de bâtonnet rigide de longueur d dont l'orientation dépend de la force.

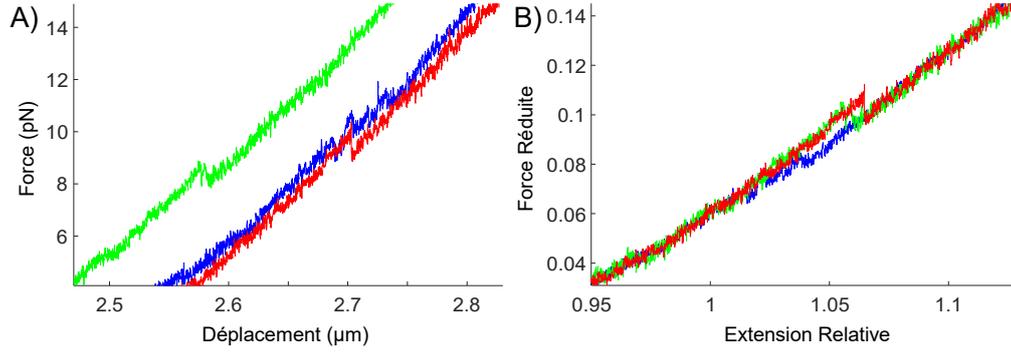


Fig. III.5 Mesures de force pour un déplacement imposé obtenues sur trois constructions moléculaires distinctes. A) Dans la représentation force/déplacement, l'incertitude sur le diamètre des billes limite la reproductibilité de l'expérience. B) Dans la représentation force réduite/extension, la transformation des données permet d'être insensible à la variabilité sur le jeu de paramètres (ϕ, L_0, A_0, k) déterminé.

pour introduire des contraintes dans l'ajustement d'un modèle aux données (méthode de la substitution, méthode des gaussiennes « étroites », méthode du Lagrangien,...) [88]. J'ai choisi la méthode de la substitution pour sa facilité à mettre en œuvre. Son implémentation s'avère suffisante dans ce cas particulier pour trouver un bon ajustement du modèle aux données expérimentales avec un jeu de paramètres pertinent d'un point de vue physique.

Par cette méthode, on détermine les paramètres suivants pour l'ensemble des courbes (254 mesures, moyenne \pm écart-type) : $\phi = 0.96 \pm 0.26 \mu\text{m}$, $L_0 = 1.59 \pm 0.28 \mu\text{m}$, $k = 63 \pm 7 \text{ pN}/\mu\text{m}$ et $A_0 = 50 \pm 11 \text{ nm}$.

Représentation des courbes et interprétation. On peut faire mieux apparaître la reproductibilité de l'expérience en représentant les points expérimentaux dans un graphique *force réduite* $f_r = \frac{F}{kL_0}$ - *extension* $x = \frac{X-\phi}{L_0}$.

Dans cette représentation, les points décrits par l'équation III.3 se superposent sur la courbe maîtresse donnée par l'équation III.6, quelque soit le jeu de paramètres (ϕ, L_0, A_0, k) .

$$x = 1 - \sqrt{\frac{f_t}{f}} + f \quad (\text{III.6})$$

La figure III.5 montre les données expérimentales dans la représentation *force réduite* - *extension*. Dans cette représentation, l'interprétation des courbes est cependant moins aisée. Les transitions sont toujours visibles mais les valeurs en ordonné ne sont pas directement comparables.

En conclusion, cette représentation peut être utile pour contrôler que le jeu de paramètres ajusté décrit bien les données expérimentales. L'identification des intermédiaires et la discussion relative à leur stabilité n'est cependant pas possible dans cette représentation. Par la suite, je vais tirer profit de la méthode d'ajustement du modèle décrite ci-dessus pour implémenter une méthode d'identification des intermédiaires de dépliement de l'ARN.

III.3.3 Identification des intermédiaires de dépliement de l'ARN

La méthode consiste à utiliser le modèle d'élasticité correspondant à l'équation III.1 pour calculer la courbe force/déplacement d'un ARN simple brin de longueur cristallographique arbitraire.

Incorporation de la contribution de l'ARN simple brin. Pour une force donnée, on ajoute la contribution $X_{WLC}(L_{c_i})$ d'un ARN simple brin de longueur cristallographique arbitraire L_{c_i} à la contribution de l'hybride ARN/ADN $X_{ARN/ADN}$ (équation III.7).

$$X_{L_{c_i}}(F) = X_{ARN/ADN}(F) + X_{WLC}(F, L_{c_i}) \quad (\text{III.7})$$

On génère un faisceau de courbes modèles pour un pas de 0.1 nm ($= L_{c_{i+1}} - L_{c_i}$) d'ARN simple brin mimant ainsi le relâchement progressif de l'ARN structuré sous la forme simple brin (Fig. III.6A).

Longueur d'ARN relâchée en fonction du déplacement. Chaque point de la courbe expérimentale est ensuite attribué à la courbe modèle du faisceau la plus proche. On identifie ainsi pour chaque point expérimental, la longueur cristallographique d'ARN simple brin la plus probable.

$$\forall F, \text{ on cherche } L_{c_i} \text{ tel que } |F_{exp} - F_{WLC}(L_{c_i})| \text{ soit minimal} \quad (\text{III.8})$$

Par cette méthode, on extrait de la courbe force/déplacement une courbe *longueur cristallographique relâchée d'ARN/déplacement* ou plus simplement *longueur relâchée d'ARN/déplacement* (Fig. III.6B). Cette courbe contient toute l'information sur les états intermédiaires de dépliement de l'ARN lors de l'expérience d'étirement.

Recherche des intermédiaires par un modèle de Markov caché. La courbe *longueur relâchée d'ARN/déplacement* ressemble à un signal que l'on peut obtenir dans une expérience de FRET sur molécule unique (*Fluorescence Resonance Energy Transfer* - par exemple voir [89]). Pour ces expériences de fluorescence, de nombreuses méthodes ont été développées pour identifier les états intermédiaires dans un signal bruité. J'ai donc appliqué l'une de ces méthodes : la recherche des intermédiaires par un modèle de Markov caché à partir de l'algorithme *vbFRET* [90] aux courbes *longueur relâchée d'ARN/déplacement*. Les intermédiaires extraits de la courbe expérimentale sont visibles sur la figure III.6B-C.

Un processus de Markov est un processus aléatoire pour lequel l'état du système à l'instant $i+1$ ne dépend que de l'état du système à l'instant i et des coefficients de passage. Dans ce formalisme, les états discrets du système sont connus et on ajuste le modèle aux données expérimentales pour déterminer les coefficients de passage.

Un modèle de Markov caché est un processus de Markov pour lequel ni les états discrets, ni même leur nombre ne sont connus à l'avance. L'ajustement du modèle aux données expérimentales permet de déterminer à la fois les états discrets du modèle et les coefficients de passage entre ces états [91].

Il existe plusieurs algorithmes disponibles qui ajustent un modèle de Markov caché aux données expérimentales [89]. Tous ces algorithmes permettent de déterminer un nombre

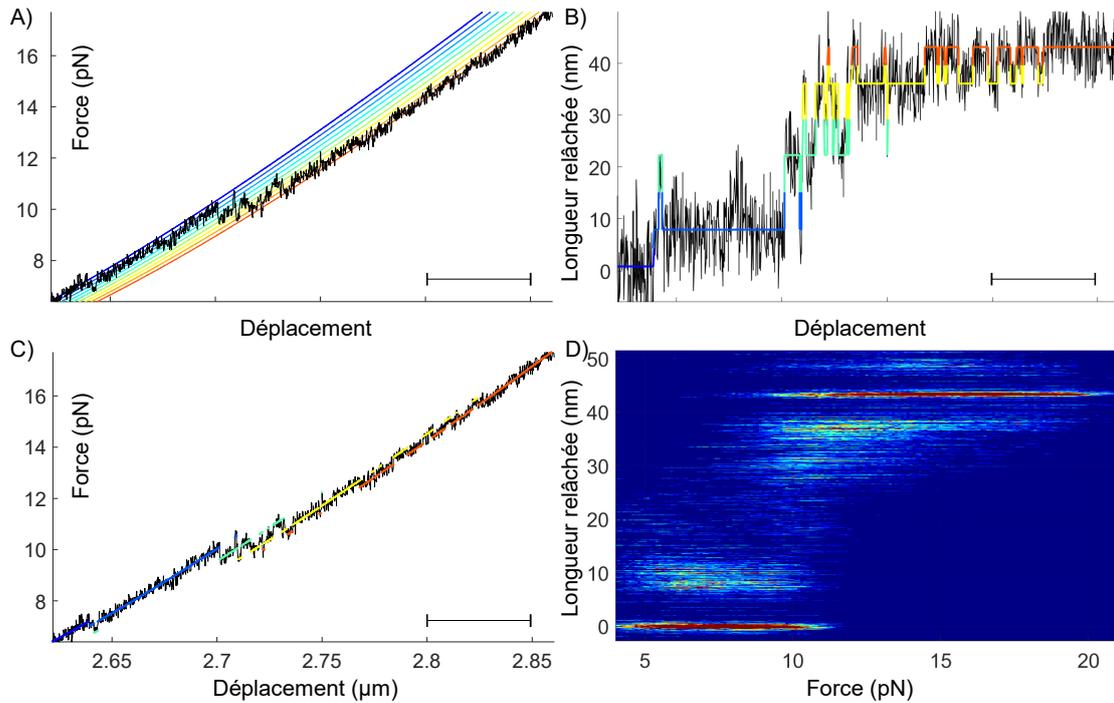


Fig. III.6 Méthode d'identification des intermédiaires de dépliement de l'ARN. A) Superposition de la courbe expérimentale force/déplacement (noire) et du faisceau de courbes modèles (arc-en-ciel) mimant le dépliement progressif de l'ARN. La courbe bleue foncée correspond à l'ajustement du modèle décrivant l'élasticité de l'hybride ARN/ADN. Le pas représenté est ici de 5 nm. B) Longueur relâchée d'ARN visitée par la molécule en fonction de la distance entre les pièges (courbe noire). La courbe en arc-en-ciel correspond aux états intermédiaires de dépliements déterminés par un modèle de Markov caché définissant une trajectoire idéale. Chaque état correspond à une couleur particulière. C) Représentation des états intermédiaires de dépliement de l'ARN sur la courbe force/déplacement. D) Superposition des trajectoires idéales (longueur relâchée d'ARN en fonction de la force) obtenues sur l'ensemble des données réalisées en absence de protéines ribosomiques (254 mesures, 50 nm/s). Les points rouges et bleus représentent respectivement les cas avec beaucoup et peu de trajectoires. Les barres représentent un déplacement de 50 nm.

fini d'états discrets, en plus des coefficients de passage et de la position de ces états. J'ai utilisé l'algorithme *vbFRET* qui présente l'intérêt de converger rapidement vers un modèle qui possède un nombre minimal d'états discrets et qui décrit bien les données expérimentales [90].

Avantages et limites de la méthode. La méthode décrite ci-dessus permet d'extraire les états intermédiaires de dépliement de l'ARN à partir du signal expérimental de force. Elle utilise pour cela un modèle de Markov caché. Cette analyse est reproductible d'une courbe à l'autre et permet de détecter des états intermédiaires dont l'assignation à l'œil est sujette à discussion.

La méthode utilise également un modèle WLC à un paramètre, la longueur de persistance, pour décrire l'élasticité de l'ARN simple brin d'une longueur cristallographique arbitraire. J'ai utilisé une longueur de persistance de 1 nm pour l'ARN simple brin car c'est la valeur la plus couramment utilisée dans la littérature. Une meilleure approximation consisterait à étalonner cette grandeur dans nos conditions expérimentales [92].

Superposition des tracés idéaux. J'ai montré l'intérêt de la méthode pour une courbe en particulier. Les expériences réalisées plusieurs fois sur plusieurs molécules permettent de s'affranchir de la nature stochastique du signal et d'identifier les états intermédiaires de déploiements robustes. L'ensemble des trajectoires idéales peuvent être superposées dans un histogramme représentant la longueur relâchée d'ARN en fonction de la force (Fig. III.6D). Dans cette représentation, les états intermédiaires (couleurs chaudes) sont directement observables. Ils sont caractérisés par la longueur d'ARN relâchée et leur stabilité mécanique peut être lue en abscisse.

Conclusion du chapitre III. J'ai décrit une méthode permettant d'extraire les intermédiaires de déroulement du fragment d'ARN d'intérêt des courbes force/déplacement. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un modèle d'élasticité permettant de décrire le dépliement progressif du fragment d'ARN lors de l'expérience d'étirement. L'ajustement du modèle aux données expérimentales permet d'en déduire l'évolution au cours de l'expérience d'étirement d'une grandeur structurale. Cette grandeur, à savoir la longueur cristallographique d'ARN relâchée, décrit de façon dynamique l'état conformationnel du fragment d'ARN. L'analyse du tracé dynamique par un modèle de Markov caché permet d'identifier de façon reproductible des états intermédiaires dans un contexte de rapport signal sur bruit faible.

On dispose donc d'une méthode d'analyse des courbes force/déplacement qui permet d'identifier les intermédiaires de dépliement et de caractériser leur stabilité mécanique. Ces intermédiaires sont définis par la longueur cristallographique d'ARN relâchée et sont par conséquent directement assignables sur la structure bi-dimensionnelle (ou tri-dimensionnelle) du fragment d'ARN.

Dans le chapitre suivant, je vais utiliser cette méthode pour analyser les mesures de force réalisées en présence ou en absence des r-protéines uL24 et/ou uL4.

Chapitre IV

Résultats

L'objet de ce chapitre est de présenter les résultats des mesures de force réalisées sur le fragment d'ARN. Ce fragment est constitué des hélices H18, H19 et H20 du domaine I de l'ARN ribosomique 23S contenant les sites de fixation des protéines uL24 et uL4 (cf chapitre I).

Dans la première partie, je présenterai les principaux résultats de la thèse, ceux obtenus en présence des protéines uL24 et/ou uL4.

Dans la deuxième partie, je présenterai des résultats préliminaires réalisés en présence des protéines ribosomiques uL24 et uL4 ainsi que l'ARN hélicase à boîte DEAD SrmB.

IV.1 Mesures en présence des r-protéines uL24 et/ou uL4

Toutes les mesures de force ont été effectuées à 50 nm/s. Les mesures de force effectuées en absence des protéines uL24 et uL4 montrent que le fragment d'ARN est structuré et présente un signal de force caractéristique en dents-de-scie autour de 10 pN. Les mesures réalisées en présence des protéines uL24 et/ou uL4 (8 μ M chaque) montrent que leur fixation s'accompagne d'une stabilisation mécanique de l'ARN. L'analyse des signaux de force par un modèle de Markov caché montre que les protéines stabilisent les structures de l'ARN au niveau de la jonction des trois hélices H18, H19 et H20. Nos observations concordent avec un mécanisme de type pinces moléculaires pour uL24 et uL4.

Dans nos conditions expérimentales, l'étude de la stabilité de cette structure d'ARN permet de lui assigner une force caractéristique de déroulement. On mesure 14.6 pN en présence de uL24 et 13.0 pN en présence de uL4. La stabilité mécanique du fragment d'ARN en présence des deux protéines uL24 et uL4 est supérieure et peut être estimée à 15.8 pN. On montre ainsi que les deux pinces moléculaires agissent en concert, c'est-à-dire que le complexe formé par les deux pinces sur l'ARN renforce l'effet des pinces individuelles.

De plus, l'étude de la fréquence de fixation des protéines uL24 et/ou uL4, réalisée pour différentes concentrations en r-protéines, montre que l'affinité de uL24 (uL4) est 5.5 (7) fois plus élevée lorsque uL4 (uL24) est déjà fixée à l'ARN. On en conclut que la fixation des protéines uL24 et uL4 sur le fragment d'ARN est coopérative.

La fonction biologique d'une pince moléculaire est de stabiliser la structure qu'elle

reconnaît. Nos mesures montrent un système constitué de deux pinces moléculaires qui stabilisent le même fragment d'ARN. La présence simultanée des deux pinces moléculaires induit une sur-stabilisation de l'ARN, ce qui montre que le complexe formé par les deux pinces assure mieux la fonction biologique que chacune des pinces prises séparément. De façon intéressante, la fixation des deux pinces moléculaires est coopérative. Le système biologique est par conséquent doublement optimal pour assurer la stabilisation mécanique du fragment d'ARN.

Ces propriétés sont particulièrement pertinentes dans le contexte de l'assemblage du ribosome dans lequel le fragment d'ARN étudié est essentiel. On propose deux interprétations possibles à la stabilisation mécanique mise en évidence. Premièrement, on suggère un rôle des pinces dans la stabilisation des structures de l'ARN ribosomique en cours de transcription pour résister aux forces exercées par l'ARN polymérase. Deuxièmement, ces pinces moléculaires peuvent jouer un rôle en restreignant l'ensemble des conformations possibles de l'ARN ribosomique et favoriser le repliement vers la forme native de l'ARN.

Ce travail était sur le point d'être soumis à un éditeur au moment de l'écriture de cette thèse. Pour cette raison, il a le format d'un article.

IV.2 Étude préliminaire d'un *helper* de l'assemblage : SrmB

SrmB est une des cinq protéines appartenant à la famille des protéines à boîte DEAD (*DEAD-box*) identifiées chez *E. coli*. Ces protéines sont impliquées dans la biogenèse du ribosome, la dégradation des ARN messagers et probablement dans l'initiation de la traduction. Elles sont non-essentiels dans des conditions de croissance standard (37°C) mais deviennent importantes à basse température (< 30°C) [21].

Des études menées *in vitro* ont montré que SrmB est une protéine dont les activités ATPase et hélicase sont non-spécifiques vis-à-vis de l'ARN [93]. En revanche, SrmB interagit spécifiquement *in vivo* et *in vitro* avec le complexe ribonucléoprotéique formé par uL24, uL4 et un fragment de l'ARNr 23S contenant au moins les sites de fixation des r-protéines uL24 et uL4. Ce fragment est localisé dans le domaine I de l'ARNr 23S [94].

Des expériences de génétique ont permis de préciser le rôle de SrmB dans la biogenèse du ribosome. SrmB facilite l'incorporation de uL13 au niveau du domaine II de l'ARNr 23S. Le site de fixation de SrmB serait celui identifié précédemment, fonctionnant comme un site « d'ancrage » pour une action à distance [95, 96].

J'ai effectué des expériences préliminaires à partir d'une préparation de SrmB réalisée par T. Bizebard. J'ai cherché, par mesure de force, à mettre en évidence une interaction entre SrmB et le complexe ribonucléoprotéique formé par le fragment d'ARN, uL24 et uL4.

Les mesures de force ont été réalisées selon la même méthodologie que l'étude principale sur uL24 et/ou uL4. Toutes choses égales par ailleurs, le tampon expérimental contient en plus de l'ATP (2 mM) et du TCEP (0.5 mM).

Les mesures ont été réalisées en présence de uL24, uL4 et SrmB (5 μ M chaque).

Les courbes force/déplacement obtenues présentent les mêmes intermédiaires de dérou-

lement de l'ARN en présence ou en absence des protéines uL24, uL4 et SrmB (Fig. IV.1B).

Là encore, je me suis intéressé à la stabilité mécanique de l'intermédiaire stabilisé par les protéines uL24 et/ou uL4 (sommet de l'hélice H18). J'ai remarqué que plusieurs courbes expérimentales (17%) présentent une force maximale atteinte par cet intermédiaire supérieure à 15.8 pN. De plus, 4% des mesures atteignent une force maximale supérieure à 18.3 pN (c'est-à-dire un écart-type au dessus de la force moyenne de stabilisation des protéines uL24 et uL4 ensemble). Un exemple de courbe est représenté dans la figure IV.1A.

Cette observation suggère un rôle de stabilisation mécanique du complexe formé par l'ARN et les protéines uL24 et uL4 en présence de SrmB. Ce résultat est compatible avec l'observation *in vitro* d'une interaction directe entre SrmB et les protéines uL24 et uL4.

Si l'on se réfère à l'étude principale, on peut extrapoler la fréquence de fixation des r-protéines uL24 et uL4 (5 μ M chaque) à $58 \pm 2\%$. On prévoit par conséquent 29% des mesures présentant une force supérieure à 15.8 pN. Autrement dit, l'effet décrit ci-dessus peut à ce stade de l'analyse tout aussi bien être décrit par la distribution de force des protéines uL24 et uL4 ensemble. Une étude portant sur plus de mesures permettrait de confirmer ou non cette tendance en mesurant plus précisément les fréquences observées des événements à haute force.

Test d'activité. De plus, j'ai mesuré l'activité ATPase de la préparation de SrmB (selon le protocole décrit dans la référence [93]) dans le tampon expérimental utilisé pour les mesures de force (cf paragraphe II.2.2). J'ai comparé cette mesure avec celle obtenue dans la référence [93].

On montre que l'activité ATPase de SrmB est beaucoup plus faible (facteur 100) dans le tampon utilisé pour les mesures de force par rapport au tampon de référence.

Ce résultat suggère plutôt de réaliser les mesures de force en présence de SrmB dans le même tampon expérimental que celui de la référence [93] pour lequel l'activité ATPase de SrmB est bien meilleure.

Enfin, de nombreuses expériences complémentaires peuvent être réalisées. Par exemple, les mêmes mesures de force peuvent être réalisées en présence d'un analogue non-hydrolysable de l'ATP.

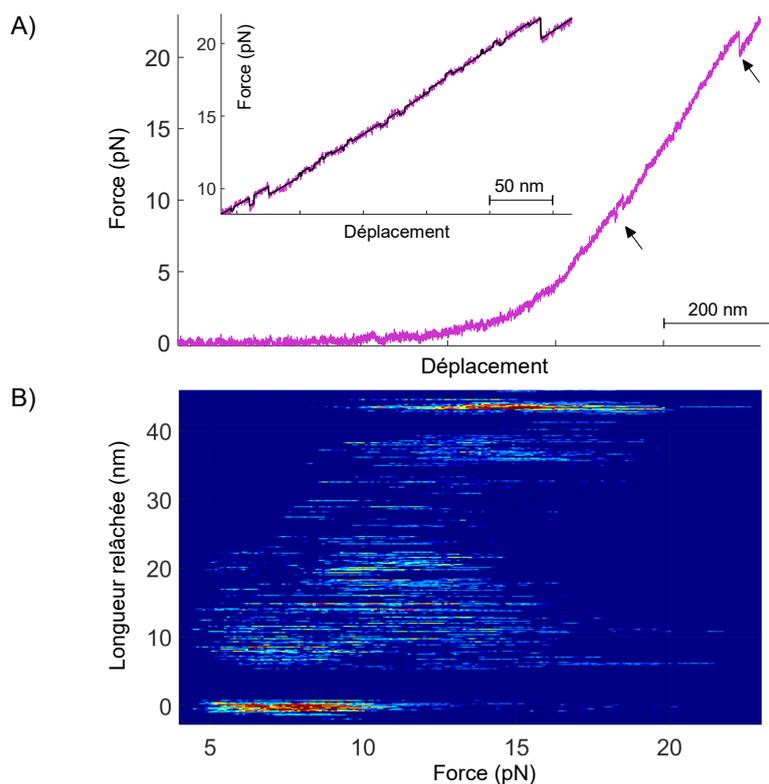


Fig. IV.1 Expériences réalisées en présence de uL24, uL4 et SrmB. A) Exemple de courbe force/déplacement. Les flèches indiquent les principaux sauts de force. En haut à gauche, gros plan sur la région correspondant au dépliement du fragment d'ARN et superposition de la courbe idéale déterminée par le modèle de Markov caché. B) Cartographie de la stabilité des intermédiaires détectés pour l'ensemble des mesures effectuées en présence de uL24, uL4 et SrmB (59 mesures).

Conclusion

J'ai réalisé des mesures de force à l'échelle de la molécule unique avec un piège optique. Cette technique expérimentale m'a permis d'étudier les mécanismes à l'échelle moléculaire en jeu dans les premières étapes de l'assemblage de la grande sous-unité du ribosome d'*E. coli*.

Les mesures de force sur le fragment d'ARN 23S 991-1163 m'ont permis de reproduire et optimiser le protocole expérimental pour la préparation des fragments d'ARN d'intérêt dans une configuration qui permet la mesure de force via un double piège optique. Ces mesures m'ont également permis de mettre au point des techniques de traitement de surface qui se sont avérées nécessaires au bon rendement de la manipulation en présence des protéines ribosomiques uL24 et/ou uL4.

L'étude par mesure de force du fragment constitué des hélices H18, H19 et H20 du domaine I de l'ARN ribosomique 23S en présence des protéines uL24 et/ou uL4 m'a permis de sonder directement les interactions en jeu lors des toutes premières étapes de l'assemblage de la grande sous-unité 50S. En effet, les r-protéines uL24 et uL4 sont deux des cinq protéines essentielles à la première étape de la reconstitution *in vitro* de la grande sous-unité du ribosome d'*E. coli*.

J'ai montré le rôle des r-protéines uL24 et uL4 dans la stabilisation mécanique du fragment d'ARN. La présence simultanée des deux protéines sur le fragment d'ARN, favorisée par le caractère coopératif de la fixation, induit une sur-stabilisation de l'ARN. On suggère de plus que la stabilisation mécanique de l'ARN mise en évidence dans ce travail conditionne l'efficacité du repliement de l'extrémité 5' de l'ARNr 23S. Le rôle de stabilisation des protéines uL24 et uL4 est donc essentiel à l'assemblage de la grande sous-unité 50S du ribosome.

Dans le prolongement de mon travail de recherche principal, j'ai également réalisé des mesures préliminaires en présence de uL24, uL4 et d'un *helper* de l'assemblage : la protéine à boîte DEAD SrmB. J'ai cherché, toujours par des mesures de force, à mettre en évidence une interaction directe entre ces trois protéines. Des expériences complémentaires doivent être menées et concernent notamment les conditions de tampon expérimentales.

Annexe A

Mouvement brownien d'une bille dans un piège harmonique

Cette annexe a été rédigée d'une part à partir de l'article de M. C. Wang et G. E. Uhlenbeck sur la théorie du mouvement brownien [68] et d'autre part à partir des articles de K. Svoboda et S. M. Block [65] et K. C. Neuman et S. M. Block [59] sur son application à la calibration du piège optique.

L'écoulement autour d'un objet microscopique soumis au mouvement brownien (dans notre cas de diamètre $\phi \simeq 1 \mu\text{m}$ et de coefficient de diffusion $D \simeq 1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) est caractérisé par une vitesse $U \sim D/\phi \simeq 1 \mu\text{m} \text{s}^{-1}$. On obtient pour le nombre de Reynolds : $Re \sim D/\nu$ où $\nu = 10^6 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ est la viscosité cinématique de l'eau. Le mouvement du fluide environnant autour de la bille s'effectue donc à bas nombre de Reynolds ($Re \simeq 10^{-6} \ll 1$).

Bilan des forces :

— force élastique de rappel du piège de raideur k : $F_{trap} = -kx$

— force de friction hydrodynamique : $F_{hydro} = -\gamma v$

où $\gamma = 3\pi\eta\phi g(\frac{\phi}{2h})$ est le coefficient de friction hydrodynamique, h la hauteur de la bille par rapport à la lamelle. $g(\phi/2h)$ est un coefficient de correction tenant compte des interactions hydrodynamiques entre la bille et la lamelle de microscope vérifiant l'équation A.1 (loi de Faxen).

$$g(d) = \frac{1}{1 - \frac{9}{16}d + \frac{1}{8}d^3 - \frac{45}{256}d^4 - \frac{1}{16}d^5} \quad (\text{A.1})$$

— force de Langevin $F_L = \sqrt{2k_B T \gamma} \eta(t)$ où k_B est la constante de Boltzmann et T la température absolue. $\eta(t)$ est un processus gaussien aléatoire qui vérifie les propriétés suivantes :

$$\langle \eta(t) \rangle = 0 \quad \text{et} \quad \langle \eta(t)\eta(t') \rangle = \delta(t - t')$$

Notations. Dans la suite, on adoptera les notations suivantes [68] pour calculer la densité spectrale de puissance de $x(t)$, $G_x(f)$:

$$G_x(f) = \lim_{T_{mesure} \rightarrow +\infty} \frac{2}{T_{mesure}} |\tilde{x}(f)|^2$$

où $\tilde{x}(f)$ est la transformée de Fourier de $x(t)$, définie par $\tilde{x}(f) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t) e^{-2i\pi ft} dt$

Équation de la dynamique.

$$\frac{m}{\gamma} \frac{d^2 x(t)}{dt^2} + \frac{dx(t)}{dt} + 2\pi f_0 x(t) = \sqrt{2D} \eta(t) \quad \text{avec} \quad f_0 = \frac{k}{2\pi\gamma} \quad (\text{A.2})$$

où m est la masse de la bille (densité $d_b = 2$ pour des billes de silice). On a également utilisé la relation d'Einstein $D = k_B T / \gamma$ reliant le coefficient de diffusion de la bille au coefficient de frottement du fluide environnant.

Le terme $\frac{m}{\gamma} \sim \frac{d_b \phi^2}{\nu} \simeq 10^{-6}$ s. Ce terme est négligeable pour une fréquence d'échantillonnage inférieure à 20 kHz. Le terme inertiel de l'équation A.2 ne contribue significativement pas aux fluctuations de positions mesurées [67].

Densité spectrale des fluctuations de position. Pour calculer la densité spectrale de $x(t)$, on calcule la transformée de Fourier de $x(t)$ à partir de l'équation A.2, on en déduit :

$$|\tilde{x}(f)|^2 = \frac{D}{2\pi^2} \frac{|\tilde{\eta}(f)|^2}{f_0^2 + f^2} \quad (\text{A.3})$$

Soit,

$$G_x(f) = \frac{D}{2\pi^2} \frac{G_\eta(f)}{f_0^2 + f^2} \quad (\text{A.4})$$

Enfin, on calcule la densité spectrale du processus gaussien $\eta(t)$ [68] :

$$G_\eta(f) = 4 \int_0^{+\infty} d\tau \langle \eta(t)\eta(t+\tau) \rangle \cos(2\pi f\tau) = 2 \quad (\text{A.5})$$

On obtient finalement l'expression pour la densité spectrale de $x(t)$:

$$G_x(f) = \frac{D/\pi^2}{f_0^2 + f^2} \quad (\text{A.6})$$

Densité spectrale des fluctuations de tension. Le signal mesuré est la densité spectrale de puissance de la tension délivrée par le capteur de position $G_V(f)$. Puisque la tension délivrée par le détecteur est proportionnelle à la position relative de la bille dans le piège, il en va de même pour les densités spectrales de puissance $G_V(f) = \rho^2 G_x(f)$ où ρ est la sensibilité du détecteur.

$$G_V(f) = \frac{\Gamma^2}{f_0^2 + f^2} \quad \text{où} \quad \Gamma^2 = \frac{D\rho^2}{\pi^2} \quad (\text{A.7})$$

Annexe B

Préparation des hybrides ARN/ADN et mesures de force

Cette annexe contient la publication correspondant à la référence [62]. Le protocole suivi dans cette thèse pour la préparation des hybrides ARN/ADN y est détaillé précisément dans le cas de l'étude du fragment d'ARN d'intérêt 991-1163 (cf chapitre I). Les constructions moléculaires correspondant à l'étude du fragment d'ARNr 23S 281-359 sont obtenues de façon similaire à partir des « poignées » d'ADN adéquates.

La publication contient de plus des aspects techniques importants sur le double piège optique utilisé dans cette thèse. Ces informations sont complémentaires avec le propos du chapitre II.

Bibliographie

- [1] K. H. NIERHAUS ; «The assembly of prokaryotic ribosomes.» ; *Biochimie* **73**, p. 739–55 (1991). 9, 15, 18, 19
- [2] R. PHILLIPS, J. KONDEV, J. THERIOT & H. GARCIA ; *Physical biology of the cell* (Garland Science) (2012). 9
- [3] A. TISSIÈRES, J. WATSON, D. SCHLESSINGER & B. HOLLINGWORTH ; «Ribonucleo-protein particles from *Escherichia coli*» ; *Journal of Molecular Biology* **1**, p. 221 – 233 (1959). ISSN 0022-2836. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283659800292>. 9
- [4] K. H. NIERHAUS ; «Mg²⁺, K⁺, and the ribosome» ; *Journal of bacteriology* **196**, p. 3817–3819 (2014). 9
- [5] M. KACZANOWSKA & M. RYDÉN-AULIN ; «Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*» ; *Microbiology and molecular biology reviews* **71**, p. 477–494 (2007). 9, 10, 11, 13
- [6] R. NIKOLAY, D. VAN DEN BRUCK, J. ACHENBACH & K. H. NIERHAUS ; *Ribosomal Proteins : Role in Ribosomal Functions* (John Wiley Sons, Ltd) (2015); ISBN 9780470015902. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470015902.a0000687.pub4>. 10, 12, 14, 16
- [7] H. G. WITTMANN ; *Structure of Ribosomes*; p. 1–27 (Springer New York, New York, NY) (1986); ISBN 978-1-4612-4884-2. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4884-2_1. 10, 23
- [8] D. KLEIN, P. MOORE & T. STEITZ ; «The Roles of Ribosomal Proteins in the Structure Assembly, and Evolution of the Large Ribosomal Subunit» ; *Journal of Molecular Biology* **340**, p. 141 – 177 (2004). ISSN 0022-2836. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283604003845>. 10, 13, 16, 19, 20
- [9] N. BAN, R. BECKMANN, J. H. CATE, J. D. DINMAN, F. DRAGON, S. R. ELLIS, D. L. LAFONTAINE, L. LINDAHL, A. LILJAS, J. M. LIPTON, M. A. MCALEAR, P. B. MOORE, H. F. NOLLER, J. ORTEGA, V. G. PANSE, V. RAMAKRISHNAN, C. M. SPAHN, T. A. STEITZ, M. TCHORZEWSKI, D. TOLLERVEY, A. J. WARREN, J. R. WILLIAMSON, D. WILSON, A. YONATH & M. YUSUPOV ; «A new system for naming ribosomal proteins» ; *Current Opinion in Structural Biology* **24**, p. 165 – 169 (2014). ISSN 0959-440X. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X14000037> ; folding and binding / Nucleic acids and their protein complexes. 10

- [10] J. M. ZENGEL & L. LINDAHL ; «Diverse mechanisms for regulating ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli*» ; *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **47**, p. 331–370 (1994). 12
- [11] M. GUILLIER, F. ALLEMAND, F. DARDEL, C. A. ROYER, M. SPRINGER & C. CHIARUTTINI ; «Double molecular mimicry in *Escherichia coli* : binding of ribosomal protein L20 to its two sites in mRNA is similar to its binding to 23S rRNA» ; *Molecular Microbiology* **56**, p. 1441–1456 (2005). ISSN 1365-2958. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04644.x>. 12
- [12] L. P. FREEDMAN, J. M. ZENGEL, R. H. ARCHER & L. LINDAHL ; «Autogenous control of the S10 ribosomal protein operon of *Escherichia coli* : genetic dissection of transcriptional and posttranscriptional regulation.» ; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, p. 6516–20 (1987). 12, 20
- [13] Z. SHAJANI, M. SYKES & J. WILLIAMSON ; «Assembly of Bacterial Ribosomes.» ; *Annual review of biochemistry* **80**, p. 501–526 (2011). 12, 14, 15, 18, 19
- [14] J. BROSIUS, T. J. DULL, D. D. SLEETER & H. F. NOLLER ; «Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*» ; *Journal of Molecular Biology* **148**, p. 107 – 127 (1981). ISSN 0022-2836. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283681905088>. 13
- [15] J. R. WILLIAMSON ; «After the ribosome structures : how are the subunits assembled?» ; *RNA (New York, N.Y.)* **9**, p. 165–7 (2003). 13
- [16] W. A. DECATUR & M. J. FOURNIER ; «rRNA modifications and ribosome function.» ; *Trends in biochemical sciences* **27**, p. 344–51 (2002). 13
- [17] A. S. PETROV, C. R. BERNIER, E. HERSHKOVITS, Y. XUE, C. C. WATERBURY, C. HSIAO, V. G. STEPANOV, E. A. GAUCHER, M. A. GROVER, S. C. HARVEY, N. V. HUD, R. M. WARTELL, G. E. FOX & L. D. WILLIAMS ; «Secondary structure and domain architecture of the 23S and 5S rRNAs» ; *Nucleic Acids Research* **41**, p. 7522–7535 (2013). [+http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt513](http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt513) ; [/oup/backfile/content_public/journal/nar/41/15/10.1093_nar_gkt513/2/gkt513.pdf](http://oup/backfile/content_public/journal/nar/41/15/10.1093_nar_gkt513/2/gkt513.pdf). 13
- [18] P. NISSEN, J. A. IPPOLITO, N. BAN, P. B. MOORE & T. A. STEITZ ; «RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit : The A-minor motif» ; *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, p. 4899–4903 (2001). <http://www.pnas.org/content/98/9/4899.abstract> ; <http://www.pnas.org/content/98/9/4899.full.pdf>. 14
- [19] H. F. NOLLER ; «RNA Structure : Reading the Ribosome» ; *Science* **309**, p. 1508–1514 (2005). ISSN 0036-8075. <http://science.sciencemag.org/content/309/5740/1508> ; <http://science.sciencemag.org/content/309/5740/1508.full.pdf>. 14
- [20] O. CORDIN, J. BANROQUES, N. K. TANNER & P. LINDER ; «The DEAD-box protein family of {RNA} helicases» ; *Gene* **367**, p. 17 – 37 (2006). ISSN 0378-1119. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111905006359>. 14
- [21] I. IOST, T. BIZEBARD & M. DREYFUS ; «Functions of DEAD-box proteins in bacteria : Current knowledge and pending questions» ; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1829**, p. 866 – 877 (2013). ISSN 1874-9399. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874939913000230> ; sI : The Biology of {RNA} helicases - Modulation for life. 14, 52

- [22] R. A. BRITTON; «Role of GTPases in Bacterial Ribosome Assembly»; *Annual Review of Microbiology* **63**, p. 155–176 (2009). <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073225>; pMID : 19575570; <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073225>. 14
- [23] D. J. KLEIN, P. B. MOORE & T. A. STEITZ; «The contribution of metal ions to the structural stability of the large ribosomal subunit.»; *RNA (New York, N.Y.)* **10**, p. 1366–79 (2004). 15
- [24] J. H. DAVIS & J. R. WILLIAMSON; «Structure and dynamics of bacterial ribosome biogenesis»; *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **372** (2017). ISSN 0962-8436. <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/372/1716/20160181>; <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/372/1716/20160181.full.pdf>. 15, 18
- [25] P. TRAUB & M. NOMURA; «Structure and function of E. coli ribosomes. V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins.»; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **59**, p. 777–84 (1968). 15
- [26] K. H. NIERHAUS & F. DOHME; «Total reconstitution of functionally active 50S ribosomal subunits from Escherichia coli.»; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**, p. 4713–7 (1974). 15
- [27] F. DOHME & K. H. NIERHAUS; «Total reconstitution and assembly of 50 S subunits from Escherichia coli Ribosomes in vitro.»; *Journal of molecular biology* **107**, p. 585–99 (1976). 15
- [28] K. H. NIERHAUS & F. DOHME; «Total reconstitution of 50 S subunits from Escherichia coli ribosomes.»; *Methods in enzymology* **59**, p. 443–9 (1979). 15
- [29] O. MARQUARDT, H. E. ROTH, G. WYSTUP & K. H. NIERHAUS; «Binding of Escherichia coli ribosomal proteins to 23S RNA under reconstitution conditions for the 50S subunit.»; *Nucleic acids research* **6**, p. 3641–50 (1979). 16
- [30] R. RÖHL & K. H. NIERHAUS; «Assembly map of the large subunit (50S) of Escherichia coli ribosomes.»; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, p. 729–33 (1982). 16
- [31] M. HEROLD & K. H. NIERHAUS; «Incorporation of six additional proteins to complete the assembly map of the 50 S subunit from Escherichia coli ribosomes.»; *The Journal of biological chemistry* **262**, p. 8826–33 (1987). 16
- [32] S. SPILLMANN, F. DOHME & K. H. NIERHAUS; «Assembly in Vitro of the 50 S subunit from Escherichia coli ribosomes : Proteins essential for the first heat-dependent conformational change»; *Journal of Molecular Biology* **115**, p. 513 – 523 (1977). ISSN 0022-2836. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283677901681>. 16, 19
- [33] S. S. CHEN & J. R. WILLIAMSON; «Characterization of the ribosome biogenesis landscape in E. coli using quantitative mass spectrometry.»; *Journal of molecular biology* **425**, p. 767–79 (2013). 17, 18
- [34] V. NOWOTNY & K. H. NIERHAUS; «Initiator proteins for the assembly of the 50S subunit from Escherichia coli ribosomes.»; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, p. 7238–42 (1982). 16

- [35] C. DE NARVAEZ & H. SCHAUP; «In vivo transcriptionally coupled assembly of Escherichia coli ribosomal subunits»; *Journal of Molecular Biology* **134**, p. 1 – 22 (1979). ISSN 0022-2836. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002228367990411X>. 18
- [36] S. L. GOTTA, O. MILLER & S. L. FRENCH; «rRNA transcription rate in Escherichia coli.»; *Journal of bacteriology* **173**, p. 6647–6649 (1991). 18
- [37] J. R. WILLIAMSON; «After the ribosome structures : How are the subunits assembled?»; *Rna* **9**, p. 165–167 (2003). 18
- [38] F. J. FRANCESCHI & K. H. NIERHAUS; «Ribosomal protein L20 can replace the assembly-initiator protein L24 at low temperatures»; *Biochemistry* **27**, p. 7056–7059 (1988). 19
- [39] J. H. DAVIS, Y. Z. TAN, B. CARRAGHER, C. S. POTTER, D. LYUMKIS & J. R. WILLIAMSON; «Modular assembly of the bacterial large ribosomal subunit»; *Cell* **167**, p. 1610–1622 (2016). 19
- [40] J. NOESKE, M. R. WASSERMAN, D. S. TERRY, R. B. ALTMAN, S. C. BLANCHARD & J. H. CATE; «High-resolution structure of the Escherichia coli ribosome»; *Nature structural & molecular biology* **22**, p. 336–341 (2015). 20
- [41] R. H. SKINNER, M. J. STARK & A. E. DAHLBERG; «Mutations within the 23S rRNA coding sequence of E. coli which block ribosome assembly.»; *The EMBO journal* **4**, p. 1605–8 (1985). 19
- [42] U. STELZL & K. H. NIERHAUS; «A short fragment of 23S rRNA containing the binding sites for two ribosomal proteins, L24 and L4, is a key element for rRNA folding during early assembly»; *RNA* **7**, p. 598–609 (2001). 19
- [43] «Ueda Lab.»; <http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/molbio/uedalab.en/index.html>. 19
- [44] «UniProtKB»; <http://www.uniprot.org/uniprot>. 19, 20
- [45] L. MATTHEAKIS, L. VU, F. SOR & M. NOMURA; «Retroregulation of the synthesis of ribosomal proteins L14 and L24 by feedback repressor S8 in Escherichia coli.»; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, p. 448–52 (1989). 19
- [46] S. SPILLMANN & K. H. NIERHAUS; «The ribosomal protein L24 of Escherichia coli is an assembly protein.»; *Journal of Biological Chemistry* **253**, p. 7047–7050 (1978). 20
- [47] M. G. LAWRENCE, M. SHAMSUZZAMAN, M. KONDOPAKA, C. PASCUAL, J. M. ZENGEL & L. LINDAHL; «The extended loops of ribosomal proteins uL4 and uL22 of Escherichia coli contribute to ribosome assembly and protein translation»; *Nucleic Acids Research* **44**, p. 5798–5810 (2016). [+http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkw493](http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkw493); [/oup/backfile/content_public/journal/nar/44/12/10.1093_nar_gkw493/1/gkw493.pdf](http://oup/backfile/content_public/journal/nar/44/12/10.1093_nar_gkw493/1/gkw493.pdf). 20
- [48] M. WORBS, R. HUBER & M. C. WAHL; «Crystal structure of ribosomal protein L4 shows RNA-binding sites for ribosome incorporation and feedback control of the S10 operon.»; *The EMBO journal* **19**, p. 807–18 (2000). 20

- [49] P. MANGEOL, T. BIZEBARD, C. CHIARUTTINI, M. DREYFUS, M. SPRINGER & U. BOCKELMANN; «Probing ribosomal protein–RNA interactions with an external force»; *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, p. 18 272–18 276 (2011). <http://www.pnas.org/content/108/45/18272.abstract>; <http://www.pnas.org/content/108/45/18272.full.pdf>. 21, 44
- [50] M. EHRENBERG; «The Nobel Prize in Chemistry 2009 - Advanced Information»; (2009)http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2009/advanced.html. 23
- [51] U. BOCKELMANN; «Single-molecule manipulation of nucleic acids»; *Current Opinion in Structural Biology* **14**, p. 368 – 373 (2004). ISSN 0959-440X. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X04000624>. 23
- [52] T. R. STRICK, J.-F. ALLEMAND, D. BENSIMON, A. BENSIMON & V. CROQUETTE; «The Elasticity of a Single Supercoiled DNA Molecule»; *Science* **271**, p. 1835–1837 (1996). ISSN 0036-8075. <http://science.sciencemag.org/content/271/5257/1835>; <http://science.sciencemag.org/content/271/5257/1835.full.pdf>. 23
- [53] S. B. SMITH, Y. CUI & C. BUSTAMANTE; «Overstretching B-DNA : The Elastic Response of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA Molecules»; *Science* **271**, p. 795–799 (1996). ISSN 0036-8075. <http://science.sciencemag.org/content/271/5250/795>; <http://science.sciencemag.org/content/271/5250/795.full.pdf>. 23
- [54] D. KAMSMA, R. CREYGHTON, G. SITTERS, G. J. WUITE & E. J. PETERMAN; «Tuning the Music : Acoustic Force Spectroscopy (AFS) 2.0»; *Methods* **105**, p. 26 – 33 (2016). ISSN 1046-2023. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202316301256>; single molecule probing by fluorescence and force detection. 23
- [55] C. BUSTAMANTE, W. CHENG & Y. X. MEJIA; «Revisiting the Central Dogma One Molecule at a Time»; *Cell* **144**, p. 480 – 497 (2011). ISSN 0092-8674. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867411001073>. 23
- [56] T. LIU, A. KAPLAN, L. ALEXANDER, S. YAN, J.-D. WEN, L. LANCASTER, C. E. WICKERSHAM, K. FREDRICK, H. NOLLER, J. TINOCO, Ignacio & C. J. BUSTAMANTE; «Direct measurement of the mechanical work during translocation by the ribosome»; *eLife* **3**, p. e03406 (2014). ISSN 2050-084X. <https://doi.org/10.7554/eLife.03406>. 23
- [57] A. ASHKIN; «Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime»; *Biophysical journal* **61**, p. 569–582 (1992). 24, 25
- [58] F. GITTES & C. F. SCHMIDT; «Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers»; *Optics letters* **23**, p. 7–9 (1998). 24, 27
- [59] K. C. NEUMAN & S. M. BLOCK; «Optical trapping»; *Review of Scientific Instruments* **75**, p. 2787–2809 (2004). <http://dx.doi.org/10.1063/1.1785844>; <http://dx.doi.org/10.1063/1.1785844>. 25, 29, 57
- [60] P. MANGEOL; «Interaction entre la protéine ribosomique L20 et l’ARN 23S : sondage direct par piège optique»; (2009). 26
- [61] «Optical Trapping Lab - Grup de Biofotònica - Tutorials»; (2009)<http://biopt.ub.edu/tutorials>. 26

- [62] L. GEFFROY, P. MANGEOL, T. BIZEBARD & U. BOCKELMANN; *RNA Unzipping and Force Measurements with a Dual Optical Trap*; p. 25–41 (Springer New York, New York, NY) (2018); ISBN 978-1-4939-7271-5. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7271-5_2. 28, 30, 31, 59
- [63] P. MANGEOL & U. BOCKELMANN; «Interference and crosstalk in double optical tweezers using a single laser source.»; *The Review of scientific instruments* **79**, p. 083 103 (2008). 29
- [64] P. M. FORDYCE, M. T. VALENTINE & S. M. BLOCK; «Advances in surface-based assays for single molecules»; *Single-molecule techniques : A laboratory manual.*(Selvin, P. & Ha, T. ed) p. 431–460 (2008). 31
- [65] K. SVOBODA & S. M. BLOCK; «Biological applications of optical forces.»; *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **23**, p. 247–85 (1994). 34, 57
- [66] M. W. ALLERSMA, F. GITTES, M. J. DECASTRO, R. J. STEWART & C. F. SCHMIDT; «Two-Dimensional Tracking of ncd Motility by Back Focal Plane Interferometry»; *Biophysical Journal* **74**, p. 1074 – 1085 (1998). ISSN 0006-3495. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349598740317>. 34
- [67] K. BERG-SØRENSEN & H. FLYVBJERG; «Power spectrum analysis for optical tweezers»; *Review of Scientific Instruments* **75**, p. 594–612 (2004). 34, 58
- [68] M. C. WANG & G. E. UHLENBECK; «On the Theory of the Brownian Motion II»; *Rev. Mod. Phys.* **17**, p. 323–342 (1945). <https://link.aps.org/doi/10.1103/RevModPhys.17.323>. 34, 57, 58
- [69] W. LAN, Z. HU, J. SHEN, C. WANG, F. JIANG, H. LIU, D. LONG, M. LIU & C. CAO; «Structural investigation into physiological DNA phosphorothioate modification»; *Scientific reports* **6** (2016). 38
- [70] M. EGLI & W. SAENGER; *Principles of nucleic acid structure* (Springer Science & Business Media) (2013). 38, 39
- [71] I. TINOCO & C. BUSTAMANTE; «How RNA folds»; *Journal of Molecular Biology* **293**, p. 271 – 281 (1999). ISSN 0022-2836. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283699930012>. 38
- [72] G. STEGER & R. GIEGERICH; «RNA structure prediction»; dans «RNA Structure and Folding : Biophysical Techniques and Prediction Methods», p. 335–362 (2013). 38
- [73] B. ALBERTS, A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS & P. WALTER; *Molecular Biology of the Cell*; tome (4th edition) (New York : Garland Science) (2002). 39
- [74] M. BERCY & U. BOCKELMANN; «Hairpins under tension : RNA versus DNA»; *Nucleic Acids Research* **43**, p. 9928 (2015). [+http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv860](http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv860); [/oup/backfile/Content_public/Journal/nar/43/20/10.1093_nar_gkv860/3/gkv860.pdf](http://oup/backfile/Content_public/Journal/nar/43/20/10.1093_nar_gkv860/3/gkv860.pdf). 39, 45
- [75] J. VIAREGG, W. CHENG, C. BUSTAMANTE & I. TINOCO; «Measurement of the Effect of Monovalent Cations on RNA Hairpin Stability»; *Journal of the American Chemical Society* **129**, p. 14 966–14 973 (2007). <http://dx.doi.org/10.1021/ja074809o>; PMID : 17997555; <http://dx.doi.org/10.1021/ja074809o>. 39

- [76] N. C. HORTON & B. C. FINZEL; «The Structure of an RNA/DNA Hybrid : A Substrate of the Ribonuclease Activity of HIV-1 Reverse Transcriptase»; *Journal of Molecular Biology* **264**, p. 521 – 533 (1996). ISSN 0022-2836. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283696906580>. 39
- [77] B. ONOA, S. DUMONT, J. LIPHARDT, S. B. SMITH, I. TINOCO & C. BUSTAMANTE; «Identifying Kinetic Barriers to Mechanical Unfolding of the *T. thermophila* Ribozyme»; *Science* **299**, p. 1892–1895 (2003). ISSN 0036-8075. <http://science.sciencemag.org/content/299/5614/1892>; <http://science.sciencemag.org/content/299/5614/1892.full.pdf>. 39
- [78] D. J. KOSLOVER, F. M. FAZAL, R. A. MOONEY, R. LANDICK & S. M. BLOCK; «Binding and Translocation of Termination Factor Rho Studied at the Single-Molecule Level»; *Journal of Molecular Biology* **423**, p. 664 – 676 (2012). ISSN 0022-2836. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283612006286>. 39
- [79] J. LIPHARDT, B. ONOA, S. B. SMITH, I. TINOCO & C. BUSTAMANTE; «Reversible Unfolding of Single RNA Molecules by Mechanical Force»; *Science* **292**, p. 733–737 (2001). ISSN 0036-8075. <http://science.sciencemag.org/content/292/5517/733>; <http://science.sciencemag.org/content/292/5517/733.full.pdf>. 39, 40
- [80] M. H. LARSON, W. J. GREENLEAF, R. LANDICK & S. M. BLOCK; «Applied force reveals mechanistic and energetic details of transcription termination.»; *Cell* **132**, p. 971–82 (2008). 39
- [81] J. F. MARKO & E. D. SIGGIA; «Stretching DNA»; *Macromolecules* **28**, p. 8759–8770 (1995). <http://dx.doi.org/10.1021/ma00130a008>; <http://dx.doi.org/10.1021/ma00130a008>. 40
- [82] D. CHATENAY, S. COCCO, R. MONASSON, D. THIEFFRY & J. DALIBARD; *Multiple Aspects of DNA and RNA : from Biophysics to Bioinformatics : Lecture Notes of the Les Houches Summer School 2004* ; tome 82 (Gulf Professional Publishing) (2005). 40
- [83] C. BUSTAMANTE, J. MARKO, E. SIGGIA & S. SMITH; «Entropic elasticity of lambda-phage DNA»; *Science* **265**, p. 1599–1600 (1994). ISSN 0036-8075. <http://science.sciencemag.org/content/265/5178/1599>; <http://science.sciencemag.org/content/265/5178/1599.full.pdf>. 40
- [84] T. ODIJK; «Stiff Chains and Filaments under Tension»; *Macromolecules* **28**, p. 7016–7018 (1995). <http://dx.doi.org/10.1021/ma00124a044>; <http://dx.doi.org/10.1021/ma00124a044>. 40
- [85] W. PRESS, S. TEUKOLSKY, W. VETTERLING & B. FLANNERY; *Numerical Recipes in C : The Art of Scientific Computing*; 2^e édition (Cambridge University Press, New York, NY) (1992). 42
- [86] J. ISRAELACHVILI; *Intermolecular and Surface Forces : Revised Third Edition* (Academic press) (2011). 44
- [87] J. M. HUGUET, C. V. BIZARRO, N. FORNS, S. B. SMITH, C. BUSTAMANTE & F. RITORT; «Single-molecule derivation of salt dependent base-pair free energies in DNA»; *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, p. 15 431–15 436 (2010). <http://www.pnas.org/content/107/35/15431.abstract>; <http://www.pnas.org/content/107/35/15431.full.pdf>. 44

- [88] D. J. HAND; «Measurements and their Uncertainties : A Practical Guide to Modern Error Analysis by Ifan G. Hughes, Thomas P. A. Hase»; *International Statistical Review* **79**, p. 280–280 (2011). 47
- [89] M. BLANCO & N. G. WALTER; «Chapter 9 - Analysis of Complex Single-Molecule FRET Time Trajectories»; dans N. G. WALTER (rédacteur), «Single Molecule Tools : Fluorescence Based Approaches, Part A», , *Methods in Enzymology*, tome 472p. 153 – 178 (Academic Press) (2010). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687910720115>. 48
- [90] J. E. BRONSON, J. FEI, J. M. HOFMAN, R. L. G. JR. & C. H. WIGGINS; «Learning Rates and States from Biophysical Time Series : A Bayesian Approach to Model Selection and Single-Molecule FRET Data»; *Biophysical Journal* **97**, p. 3196 – 3205 (2009). ISSN 0006-3495. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349509015136>. 48, 50
- [91] L. R. RABINER; «A tutorial on hidden Markov models and selected applications in speech recognition»; *Proceedings of the IEEE* **77**, p. 257–286 (1989). 48
- [92] W. CHENG, S. G. ARUNAJADAI, J. R. MOFFITT, I. TINOCO & C. BUSTAMANTE; «Single-Base Pair Unwinding and Asynchronous RNA Release by the Hepatitis C Virus NS3 Helicase»; *Science* **333**, p. 1746–1749 (2011). ISSN 0036-8075. <http://science.sciencemag.org/content/333/6050/1746>; <http://science.sciencemag.org/content/333/6050/1746.full.pdf>. 50
- [93] T. BIZEBARD, I. FERLENGHI, I. IOST & M. DREYFUS; «Studies on Three E. coli DEAD-Box Helicases Point to an Unwinding Mechanism Different from that of Model DNA Helicases»; *Biochemistry* **43**, p. 7857–7866 (2004). <http://dx.doi.org/10.1021/bi049852s>; pMID : 15196029; <http://dx.doi.org/10.1021/bi049852s>. 52, 53
- [94] D. TRUBETSKOY, F. PROUX, F. ALLEMAND, M. DREYFUS & I. IOST; «SrmB, a DEAD-box helicase involved in Escherichia coli ribosome assembly, is specifically targeted to 23S rRNA in vivo»; *Nucleic Acids Research* **37**, p. 6540–6549 (2009). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkp685>; /oup/backfile/content_public/journal/nar/37/19/10.1093_nar_gkp685/1/gkp685.pdf. 52
- [95] J. CHAROLLAIS, D. PFLIEGER, J. VINH, M. DREYFUS & I. IOST; «The DEAD-box RNA helicase SrmB is involved in the assembly of 50S ribosomal subunits in Escherichia coli»; *Molecular Microbiology* **48**, p. 1253–1265 (2003). ISSN 1365-2958. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03513.x>. 52
- [96] F. PROUX, M. DREYFUS & I. IOST; «Identification of the sites of action of SrmB, a DEAD-box RNA helicase involved in Escherichia coli ribosome assembly»; *Molecular Microbiology* **82**, p. 300–311 (2011). ISSN 1365-2958. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07779.x>. 52

Résumé

Le ribosome est un organite essentiel de la cellule qui assure la synthèse des protéines. C'est une structure très conservée, composée d'ARN et de protéines ribosomiques organisés en deux sous-unités. Les expériences de reconstitution *in vitro* du ribosome d'*E. coli* ont montré que l'assemblage est un processus coordonné impliquant de nombreuses interactions entre les différents constituants. En particulier, les premières étapes de l'assemblage de la grande sous-unité dépendent fortement de la fixation coopérative de cinq protéines ribosomiques à l'ARN 23S, mais les mécanismes moléculaires sous-jacents sont mal connus.

Cette étude à l'échelle de la molécule unique vise à préciser ces mécanismes et porte sur un fragment constitué des hélices H18, H19 et H20 du domaine I de l'ARN ribosomique 23S contenant les sites de fixation des protéines uL24 et uL4. Ce fragment d'ARN a été préparé dans une configuration qui permet la mesure de force via un double piège optique. Les courbes de force obtenues ont permis de dresser une cartographie de la stabilité des structures du fragment d'ARN.

Ces cartes ont été comparées en absence et en présence des protéines ribosomiques uL24 et/ou uL4, démontrant ainsi que le fragment d'ARN est stabilisé par la fixation des protéines uL24 et/ou uL4. Leur fixation est coopérative et la présence conjointe des deux protéines sur-stabilise les structures du fragment d'ARN.

Ces résultats sont discutés dans la perspective de préciser le rôle du fragment d'ARN et des protéines ribosomiques uL24 et uL4 dans l'assemblage de la grande sous-unité du ribosome.

Mots Clés

Assemblage du ribosome, molécule unique, piège optique

Abstract

Ribosomes are essential organelles of the cell responsible for the synthesis of proteins. Their well conserved structure made of RNA and proteins is organized into two subunits. *In vitro* reconstitution of *E. coli* ribosomes showed that their assembly is a coordinated process which involves many interactions between the components. More specifically, the early stages of the large subunit assembly depend strongly on the cooperative binding of five ribosomal proteins to the 23S RNA. The underlying molecular mechanisms however remain poorly understood.

The aim of this study is to shine new light on these mechanisms at the single molecule level. It focuses on a 23S ribosomal RNA fragment composed of the helices H18, H19 and H20 in domain I which encompasses the binding sites of the ribosomal proteins uL24 and uL4. This RNA fragment has been prepared in a dumbbell configuration and force versus displacement measurements have been performed using a dual optical trap. From these measurements, a map summarizing the mechanical stability of the RNA fragment has been determined.

The maps obtained in absence and in presence of the ribosomal proteins uL24 and/or uL4 have been compared consequently demonstrating mechanical stabilization of the RNA fragment induced by the binding of uL24 and/or uL4. Moreover, their binding is cooperative and when both are present, the mechanical stabilization of the RNA fragment is enhanced.

These results are discussed to specify the role of the RNA fragment and proteins uL24 and uL4 in the large ribosomal subunit assembly.

Keywords

Ribosome assembly, single molecule, optical tweezers