



HAL
open science

Etude de la cinétique de scanning lors de l'initiation de la traduction par microscopie de fluorescence en molécule unique

Véronique Vienne

► **To cite this version:**

Véronique Vienne. Etude de la cinétique de scanning lors de l'initiation de la traduction par microscopie de fluorescence en molécule unique. Optique [physics.optics]. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASP161 . tel-04781828

HAL Id: tel-04781828

<https://theses.hal.science/tel-04781828v1>

Submitted on 14 Nov 2024

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.

Etude de la cinétique de scanning lors de l'initiation de la traduction par microscopie de fluorescence en molécule unique

*Study of the scanning kinetics during translation
initiation by single molecule fluorescence microscopy*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 572, Ondes et Matières (EDOM)

Spécialité de doctorat : Physique

Graduate School : Physique. Référent : ENS Paris-Saclay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **LuMin (Université Paris-Saclay, ENS Paris-Saclay, CNRS)**, sous la direction de **Karen PERRONET**, chargée de Recherche CNRS, ENS Paris-Saclay (Laboratoire Lumière, Matière et Interfaces) et sous la co-direction de **Olivier NAMY**, Directeur de Recherche, CNRS (Institut de Biologie Intégrative de la Cellule)

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 13 Novembre 2023, par

Véronique VIENNE

Composition du jury

Membres du jury avec voix délibérative

Eric DEPRez

Directeur de Recherche CNRS, ENS Paris-Saclay (Laboratoire de Biologie et Pharmacologie Appliquée)

Président du Jury et Examineur

Antigoni ALEXANDROU

Directrice de Recherche CNRS, Ecole Polytechnique (Laboratoire d'Optique et Biosciences)

Rapporteuse & Examinatrice

Virginie MARCEL

Directrice de Recherche INSERM, Université Claude Bernard Lyon 1 (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon)

Rapporteuse & Examinatrice

Julien MOREAU

Maitre de Conférence, Institut d'Optique Graduate School (Laboratoire Charles Fabry)

Examineur

Titre : Etude de la cinétique de scanning lors de l'initiation de la traduction par microscopie de fluorescence en molécule unique

Mots clés : TIRFM, molécule unique, ribosome, scanning

Résumé : La synthèse des protéines est un processus complexe, multi-étapes impliquant de nombreux facteurs qui doivent interagir de manière coordonnée pour traduire correctement l'ARN messager. Comme les ribosomes en cours de traduction ne peuvent pas être synchronisés, des études sur des molécules uniques ont été introduites pour mieux comprendre la dynamique de la traduction. Cette approche a d'abord été appliquée à la traduction chez les procaryotes et, plus récemment, aux systèmes eucaryotes. Dans notre étude, nous nous intéressons à une étape spécifique de l'initiation de la traduction eucaryote appelée "scanning". Au cours de cette étape, le complexe de pré-initiation (PIC), qui contient la petite sous-unité ribosomique et des facteurs d'initiation de la traduction, glisse sur l'ARNm de 5' vers 3' pour localiser le codon START. Pour assembler le PIC à l'extrémité 5' de notre ARNm modèle, nous utilisons un site d'entrée interne du ribosome (IRES) du virus EMCV. Le processus d'initiation commence lorsque le PIC est recruté sur l'ARNm par l'IRES. Ensuite, le PIC parcourt l'ARNm en aval de l'IRES jusqu'à ce qu'il atteigne le codon START.

L'objectif de ce travail est de déterminer la vitesse de scanning et d'évaluer l'impact de différentes structures secondaires sur la cinétique de scanning. Pour ce faire, nous utilisons un dispositif de microscopie de fluorescence en réflexion totale en molécule unique. Le principal avantage de travailler à l'échelle de la molécule unique est qu'il n'est pas nécessaire de synchroniser les ribosomes pour mesurer leur vitesse. Nous suivons le passage de ribosomes individuels non modifiés de mammifères via des jalons fluorescents hybridés le long de l'ARNm. Ces jalons sont deux oligonucléotides complémentaires fluorescents (émettant respectivement dans le vert et le rouge) hybridés à des positions distinctes de la région 5'UTR de l'ARNm et excités alternativement. Pendant le scanning, le PIC ouvre la structure secondaire et détache les oligonucléotides. Cela entraîne la perte du signal de fluorescence de chaque oligonucléotide, et l'évaluation précise de la vitesse de scanning. En utilisant des oligonucléotides complémentaires à différentes positions de la région 5'UTR, nous avons accès à la distribution de la vitesse de scanning des ribosomes individuels.

Title : Study of the scanning kinetics during translation initiation by single molecule fluorescence microscopy

Keywords : TIRFM, single molecule, ribosome, scanning

Abstract : Protein synthesis is a complex multistep process involving many factors that need to interact in a coordinated manner to properly translate the messenger RNA. As translating ribosomes cannot be synchronized over many elongation cycles, single-molecule studies have been introduced to bring a deeper understanding of translation dynamics. This approach has been first applied to prokaryotic translation and, recently to eukaryotic systems. In our study, we are interested in a specific step of translation initiation called scanning. During this step, the pre-initiation complex (PIC), which contains the small ribosomal subunit and translation initiation factors, slides on the mRNA 5' toward 3' to localize the start codon. To assemble the PIC on the 5' end of our model mRNA, we use an internal ribosome entry site (IRES) of the EMCV virus. The initiation process starts when the PIC is recruited on the mRNA by the IRES. Then the PIC scans the mRNA downstream the IRES until it reaches the start codon. The objective of this work is to determine the scanning speed and to assess

the impact of different secondary structures on the scanning kinetics. To do so, we use a total internal reflection fluorescent microscopy set-up with single-molecule sensitivity. The major advantage of single-molecule techniques is that there is no need to synchronize the ribosomes to measure their speed. We monitor the passage of individual, unmodified mammalian ribosomes at specific fluorescent milestones along mRNA. These milestones are two fluorescent complementary oligonucleotides (emitting respectively in the green and the red) hybridized at distinct positions of the 5'UTR of the mRNA, and excited alternatively. While scanning, the PIC unwinds the secondary structure and thereby induces the release of the oligonucleotides. This causes the loss of the fluorescence signal from each oligonucleotide. The time lapse between signals due to the release of each oligonucleotide allows a precise assessment of the scanning speed. By using oligonucleotides at complementary to various positions in the 5'UTR we have access to the scanning speed distribution of single ribosomes.

Dedication

A toutes les personnes qui n'ont jamais cessé de croire en moi.

Remerciements

Je tiens à remercier Karen Perronet, ma directrice de thèse. J'ai beaucoup appris durant ces trois années de thèse. J'ai compris qu'il fallait être très motivée et organisée surtout dans le monde de la recherche. Merci également à Olivier Namy, mon co-directeur de thèse. Cette thèse était à l'interface de deux domaines : la physique et la biologie. Maîtriser les deux thématiques n'était pas la chose la plus facile. Venant, d'une formation de physicienne j'ai appris énormément de chose en biologie. J'ai également compris que la recherche ne correspondant pas à ce que je voulais faire plus tard. C'était quand même une expérience très riche et inoubliable qui me servira.

Ce travail est une collaboration avec l'équipe de l'IBMC que je tiens à remercier pour leur travail. En effet, on n'aurait pas pu faire nos expérimentations sans leurs échantillons. Merci à Antonin Tidu et Franck Martin.

La thèse est un long parcours avec des moments forts et d'autre plus durs. Merci à toutes les personnes qui ont cru en moi et qui m'ont donné le courage de continuer cette aventure intense. Plus particulièrement, merci à tous mes collègues de l'équipe biophotonique, tous les amis et la famille.

J'aimerais faire une mention spéciale à Athulya, Isis, Marie-Charlotte, Florian, Baptiste, Fabienne et Thomas. Merci pour tous les fous rires et les moments passés ensemble ! Vous avez été une grande source d'énergie pour moi. J'ai douté à plusieurs reprises mais vous m'avez toujours soutenue. Merci les amis !!!

Table des matières

1 La traduction eucaryote : un processus biologique complexe	7
1.1 Introduction générale sur la traduction eucaryote	8
1.2 Les différents acteurs qui participent à la traduction	10
1.2.1 L'ARN messager	10
1.2.2 Les ARN de transfert	11
1.2.3 Le ribosome	12
1.2.4 Les facteurs eucaryotes	13
1.3 L'initiation : l'étape limitante à la traduction	14
1.3.1 Initiation Canonique : une initiation qui est coiffe-dépendante	14
1.3.2 Initiation non-canonique : une initiation qui est IRES dépendante	16
1.3.3 Intérêt d'étudier les IRES	17
1.3.4 Pourquoi l'étude du phénomène de scanning est-elle intéressante ?	18
1.4 Les autres étapes de la traduction : l'élongation, la terminaison et le recyclage	19
1.4.1 L'élongation	19
1.4.2 La terminaison	21
1.4.3 Le recyclage	21
1.5 Pourquoi doit-on étudier la traduction ?	21
1.6 Conclusion	22
2 Etude de la traduction en molécule unique	23
2.1 Comment observer des molécules uniques	24
2.1.1 La cryomicroscopie électronique (cryo-EM)	24
2.1.2 La microscopie de fluorescence	25
2.1.3 Une information spatiale supplémentaire : FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) Microscopy	30
2.1.4 Augmentation de la concentration en molécules uniques avec le Zéro mode Waveguide (ZMW)	32

2.2	Stratégies de marquage fluorescent pour mesurer une vitesse de traduction	33
2.2.1	Marquage du ribosome et des ARNt	33
2.2.2	Notre méthode avec le marquage de l'ARNm	35
2.2.3	Nascent Chain tracking (NCT)	36
2.3	Résultats de cinétique de traduction	37
2.3.1	Mesures d'ensemble	37
2.3.2	Mesures en molécule unique	37
2.3.3	Etude détaillée <i>in vitro</i> de la cinétique de scanning des ribosomes eucaryotes de levure sur des ARNm coiffés en molécule unique	38
2.4	Conclusion	44
3	Description du microscope TIRF	45
3.1	Préparation de l'échantillon	46
3.1.1	Préparation de l'ARNm	46
3.1.2	Chimie de surface	47
3.1.3	Cellule microfluidique	48
3.1.4	Positionnement de l'échantillon avec le porte-échantillon	50
3.1.5	Contrôle et maintien de la température du milieu	51
3.2	Présentation détaillée de notre montage TIRFm	52
3.2.1	Le montage optique TIRFm	52
3.2.2	Excitation FLAT Top	54
3.2.3	Acquisition du signal	55
3.3	Conclusion	59
4	Traitement des données et extraction de la cinétique de scanning des ribosomes	61
4.1	Traitement des films de TIRFm	62
4.1.1	Traitement de fond de fluorescence	64
4.1.2	Extraction des instants de disparition des sondes fluorescentes	67
4.2	Analyse des instants de disparition pour extraire les cinétiques de scanning	71
4.2.1	Courbes de départs cumulés	71
4.2.2	Etude de la cinétique de départ	73
4.3	Modèle biologique pour trouver les temps caractéristiques	76
4.3.1	Le scanning : une dynamique à deux temps caractéristiques	76
4.3.2	Modèle statistique choisi	77
4.4	Conclusion	78

5	Résultats de la cinétique de scanning in vitro après recrutement sur l'IRES EMCV	79
5.1	Présentation	80
5.1.1	Présentation de différents systèmes rapporteurs biologiques	80
5.1.2	Notre système	85
5.2	Méthode de mesure de la cinétique de scanning	86
5.2.1	Condition de molécule unique	86
5.2.2	Acquisition des signaux	86
5.3	Résultats	87
5.3.1	Protocole pour obtenir les résultats	87
5.3.2	Courbes de DCM pour les expériences de contrôle	88
5.3.3	Démarche pour obtenir les temps caractéristiques du processus de scanning : exemple de la position 49	91
5.3.4	Dynamique de scanning	94
5.3.5	Résultats sur l'élongation : est-ce que le PIC 43S rentre en phase d'élongation ?	97
5.4	Discussion	98
5.4.1	Efficacité de recrutement A	98
5.4.2	Vitesse de scanning	98
5.4.3	Influence de la tige-boucle	107
5.4.4	Entrée en phase d'élongation	109
5.5	Conclusions et futures perspectives	110
5.5.1	Scanning	110
5.5.2	La tige-boucle	111
5.5.3	Elongation	111
5.6	Conclusion du chapitre	112
A	Données expérimentales supplémentaires	115
A.1	Cas des contrôles avec les oligofluorophores verts	115
A.2	Expériences réalisées avec un oligo vert	116
A.3	Etude des positions 49 et 174	117
A.3.1	Position 49	117
A.3.2	Position 174	117
A.4	Expériences réalisées avec les oligos rouge	118
A.5	Cas de la position 120 et influence de la tige-boucle	118
A.6	Influence de la durée de cycle d'acquisition	119

B	Protocoles de préparation des échantillons	121
B.1	Protocole de nettoyage de la cellule microfluidique	121
B.1.1	Nettoyage de la partie réutilisable de la cellule microfluidique	121
B.1.2	Nettoyage des lamelles de microscope	121
B.2	Protocole pour fabriquer les réservoirs ou joint PDMS	122
B.2.1	Liste de matériel	122
B.2.2	Protocole de préparation du PDMS	122
B.2.3	Préparation de la cellule microfluidique	123
B.3	Préparation de la chimie de surface	123
B.3.1	Tampons	123
B.3.2	Protocole pour la chimie de surface	123
B.4	Préparation de l'échantillon	124
B.4.1	Préparation de la solution mère d'ARNm pour l'hybridation	124
B.4.2	Préparation de l'extrait cellulaire	125
B.4.3	Prise de mesure	125

Introduction

La traduction est la synthèse des protéines nécessaires au bon fonctionnement de la cellule. C'est un procédé complexe multi-étapes orchestré par une machine moléculaire appelée ribosome. Au cours de mon projet de thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à une sous-étape de l'initiation de la traduction eucaryote appelée "scanning". Je tiens à préciser que l'étude de ce phénomène de scanning est le fruit d'une collaboration avec l'équipe de Franck Martin de l'IBMC. Dans ce projet, nous avons étudié la cinétique de scanning *in vitro* par microscopie de fluorescence en molécule unique. Notons que comme l'indique son titre cette thèse est à l'interface entre deux domaines : la physique et la biologie. Dans ce manuscrit, je vais essayer d'explicitier le sujet en introduisant les différents outils pour la compréhension du phénomène biologique et les méthodes physiques utilisées pour l'obtention des résultats de cette étude. Ce manuscrit contient cinq chapitres dont nous allons détailler le contenu.

Dans le chapitre 1, nous allons présenter en détails le phénomène de la traduction eucaryote¹ avec toutes les étapes qui la constituent. Au cours de ce processus complexe, plusieurs acteurs clés entrent en jeu tels que le ribosome, l'ARN messager (ARNm), les ARN de transfert (ARNt) et des protéines appelées "facteurs eucaryotes". Des études récentes ont montré qu'un défaut de régulation de la synthèse peptidique pouvait conduire à des problèmes de santé tels que le cancer. Il est donc important de comprendre les différentes étapes de la traduction et le rôle joué par chaque acteur. Dans cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à une sous-étape de l'initiation de la traduction appelée scanning que l'on verra en détails dans le chapitre 1. Nous verrons qu'il est possible de réguler la traduction pendant l'étape de scanning.

Dans le chapitre 2, nous introduisons le concept des mesures en molécule unique que j'ai utilisées pendant ma thèse. Il faut savoir que la traduction est un processus asynchrone par définition. Tous les ribosomes ne vont pas initier la traduction simultanément ni aller à la même vitesse. L'utilisation des méthodes en molécule unique va nous renseigner sur la dispersion de la mesure effectuée contrairement aux mesures d'ensemble où l'on obtiendra une moyenne globale. Dans ce chapitre, nous introduisons donc comment on observe les molécules uniques en microscopie de fluorescence avec les différentes stratégies de marquage. On y effectue également l'état de l'art sur les études faites en molécule unique sur la traduction.

Par la suite, nous présentons en détails dans le chapitre 3 notre microscope en réflexion totale interne (TIRF)

1. Les eucaryotes sont des organismes ayant un noyau cellulaire contrairement aux procaryotes.

utilisé pour nos mesures. Nous allons présenter les différentes étapes de la préparation de l'échantillon et le montage optique TIRF. Le TIRF a été mis en place bien avant mon arrivée par l'équipe. Ce montage optique a permis de faire des études en molécule unique de la traduction [Fizman 2013] [Barbier 2017] [Bugaud et al. 2017]. Au cours de ma thèse, nous avons apporté quelques modifications que l'on va présenter dans le chapitre.

Après l'obtention des données avec la microscopie de fluorescence TIRF, il va falloir en extraire les cinétiques de dépôts qui nous intéressent. En effet, dans le chapitre 4, nous allons expliquer le processus de traitement des données et comment on arrive à obtenir la dynamique de scanning.

Finalement, nous présenterons les résultats de notre étude de scanning dans le chapitre 5. Nous introduisons d'abord les différents systèmes rapporteurs biologiques utilisés et les résultats biologiques de nos collaborateurs de l'IBMC. Ensuite, je détaillerai les résultats de mes trois années de thèse sur le scanning avec la discussion.

Nous concluons ce manuscrit en présentant les futures perspectives pour ce projet de thèse.

Chapitre 1

La traduction eucaryote : un processus biologique complexe

Il existe deux grandes familles d'organismes vivants : les procaryotes et les eucaryotes¹. La principale différence entre ces deux familles est que l'ADN (l'acide désoxyribonucléique) est contenu dans un noyau chez les êtres eucaryotes, ce qui n'est pas le cas chez les êtres procaryotes. Rappelons que l'information génétique est contenue dans l'ADN. L'expression des gènes présents dans l'ADN permet la synthèse des protéines nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme. Ce phénomène est appelé "traduction". Un défaut de régulation de ce processus peut engendrer des problèmes de santé tels que les cancers [Sonenberg and Hinnebusch 2009],[Piccirillo et al. 2014], [Topisirovic and Sonenberg 2011], [Holcik and Sonenberg 2005], [Silvera et al. 2010]. Avoir des connaissances précises et fiables sur le fonctionnement des différents acteurs et mécanismes de la traduction semble donc être primordial. Nous verrons qu'il est possible de réguler la traduction au niveau de chaque étape et notamment lors de l'initiation. Dans cette thèse, nous nous intéresserons particulièrement à une étape bien spécifique de la traduction, appelée "scanning" chez les êtres eucaryotes.

1. Les archées sont également comptées comme une famille d'organismes pour certains biologistes

1.1 Introduction générale sur la traduction eucaryote

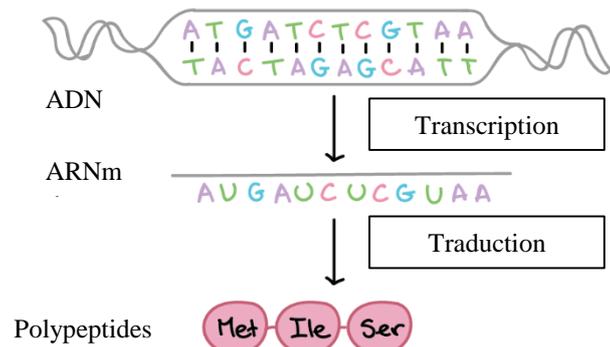


FIGURE 1.1 – Dogme central de la biologie moléculaire. Les étapes de la transcription (passage de l'ADN à l'ARN) et de la traduction (ARNm aux polypeptides) y sont représentées. Schéma modifié et adapté de Khan academy.

L'expression génique en protéines se fait en deux grands processus (voir figure 1.1). En effet, l'ADN n'est pas traduit directement. Un grand processus appelé "transcription" a lieu dans un premier temps. La première étape, appelée "transcription", correspond au passage de l'ADN à l'ARN(m)² (acide ribonucléique). La seconde étape est la "traduction" qui consiste à passer de l'ARNm aux polypeptides correspondants.

Chez les eucaryotes, l'ARNm est transcrit dans le noyau cellulaire contrairement aux procaryotes où transcription et traduction se déroulent dans le cytoplasme. La traduction est effectuée dans le cytoplasme grâce à une machine moléculaire appelée ribosome (voir figure 1.2). Le ribosome joue le rôle de "traducteur". Il va lire la séquence en nucléotides de l'ARNm pour en faire la correspondance avec des acides aminés pour créer la chaîne peptidique.

2. L'ARN doit subir des transformations post-transcriptionnelles telles que la maturation pour devenir l'ARN messager (ARNm).

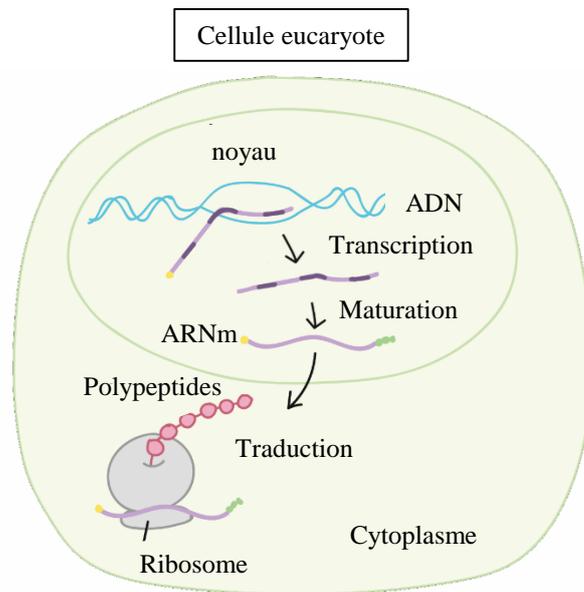


FIGURE 1.2 – Dogme central de la biologie moléculaire détaillé dans une cellule eucaryote. Les étapes de la transcription, maturation sont représentées dans le noyau. La traduction est effectuée dans le cytoplasme par le ribosome. Schéma modifié et adapté de Khan academy.

La lecture de l'ARNm par le ribosome se fait du sens 5' à 3'. La séquence est lue par triplets de nucléotides appelés "codons". Un codon correspond à un acide aminé. Le passage d'un alphabet de codons à un alphabet d'acides aminés est appelé code génétique (voir figure 1.3). On dit que le code génétique est dégénéré³ et universel⁴. Le ribosome est la machine moléculaire qui permet la synthèse du polypeptide et que nous détaillerons plus loin dans ce chapitre.

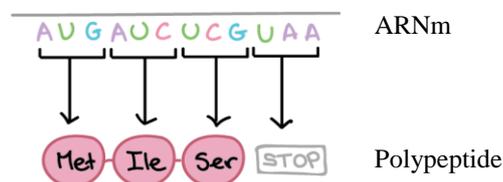


FIGURE 1.3 – Code génétique : passage d'un alphabet de codons à un alphabet d'acides aminés. Schéma modifié et adapté de Khan academy.

3. Plusieurs codons peuvent coder pour un même acide aminé

4. Le code génétique est quasiuniversel : il est le même chez quasiment tous les êtres vivants.

1.2 Les différents acteurs qui participent à la traduction

Lors de la traduction plusieurs acteurs clés entrent en jeu. Nous pouvons notamment citer l'ARN messager, les ARN de transfert (ARNt), le ribosome et des protéines appelées "facteurs eucaryotes".

1.2.1 L'ARN messager

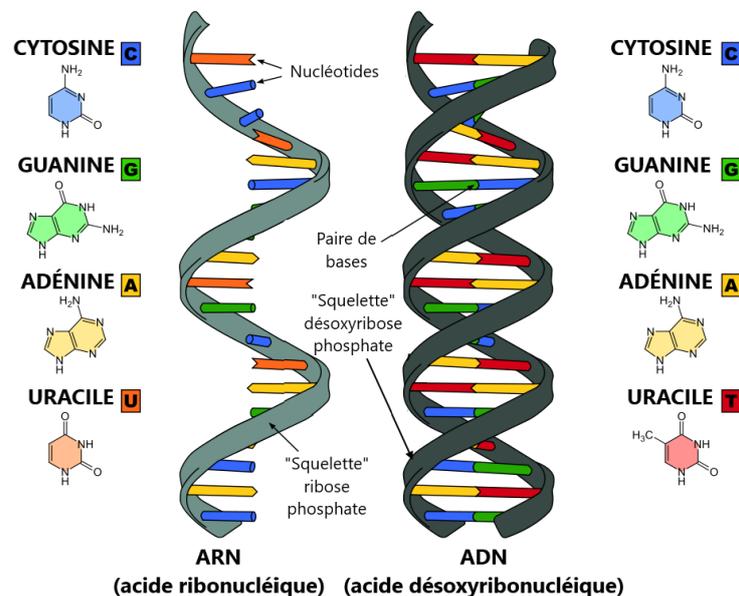


FIGURE 1.4 – Schéma de l'ARN et de l'ADN. Source Wikipédia.

L'ARNm (l'ARN messager) est une copie simple brin de l'ADN composée de nucléotides (voir figure 1.4). Il joue le rôle de précurseur intermédiaire de l'expression génique. L'information génétique portée par l'ARNm est constituée d'une série de codons. Il s'agit de triplets de nucléotides consécutifs qui correspondent à un acide aminé (AA) de la protéine synthétisée. Nous savons que le code génétique est dégénéré puisqu'il y a au total 61 codons correspondant à 20 acides aminés (voir figure 1.5). Par exemple, les codons UUU et UUC correspondent à l'AA Phénylalanine.

Le codon AUG, qui correspond à l'acide aminé méthionine⁵, agit également comme un codon d'initiation (ou codon START) pour démarrer la synthèse d'une protéine. Il y a aussi les codons d'arrêt UAA, UAG, et UGA (ou codons STOP) qui ne correspondent pas à des acides aminés mais qui indiquent quand la chaîne peptidique est terminée.

5. Chez les procaryotes, AUG correspond à l'acide aminé formyl Méthionine (fMét).

		Seconde lettre				
		U	C	A	G	
Première lettre	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

FIGURE 1.5 – Dégénérescence du code génétique. Source Wikipédia.

Notons que les ARNm sont des molécules de petite taille qui sont moins stables que celles de l'ADN. Ils ont deux extrémités (5' et 3'). Pour un même brin d'ARNm, il peut exister plusieurs cadres de lecture et celui retenu par le ribosome est déterminé par la position du premier codon START rencontré dans le sens de lecture 5' à 3'.

1.2.2 Les ARN de transfert

Les ARNt (ARN de transfert) sont des molécules qui portent en elles une séquence de trois nucléotides appelée anti-codon. Cet anti-codon est complémentaire à un codon spécifique de l'ARNm (voir figure 1.6). Lorsqu'un ARNt est chargé, il transporte un acide aminé qui correspond au codon pour lequel son anti-codon est complémentaire.

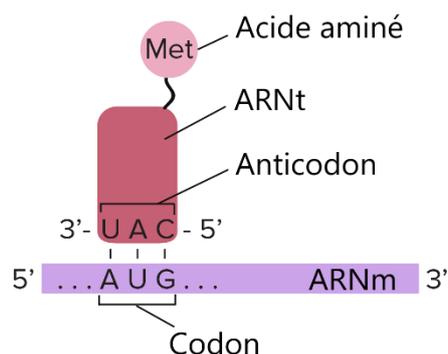


FIGURE 1.6 – Schéma de la structure d'un ARNt chargé qui s'apparie sur un brin d'ARNm. L'appariement codon anti-codon pour l'acide aminé Méthionine du codon START y est représenté. Figure adaptée de Khan academy.

Les ARNt sont des "adaptateurs" qui permettent de connecter les codons de l'ARNm avec les acides amidés correspondants lors de la synthèse peptidique (voir figure 1.7). Les ARNt ont une structure très conservée dans tous les organismes vivants. Ils prennent une forme en feuille de trèfle ou de "L" grâce à des repliements.

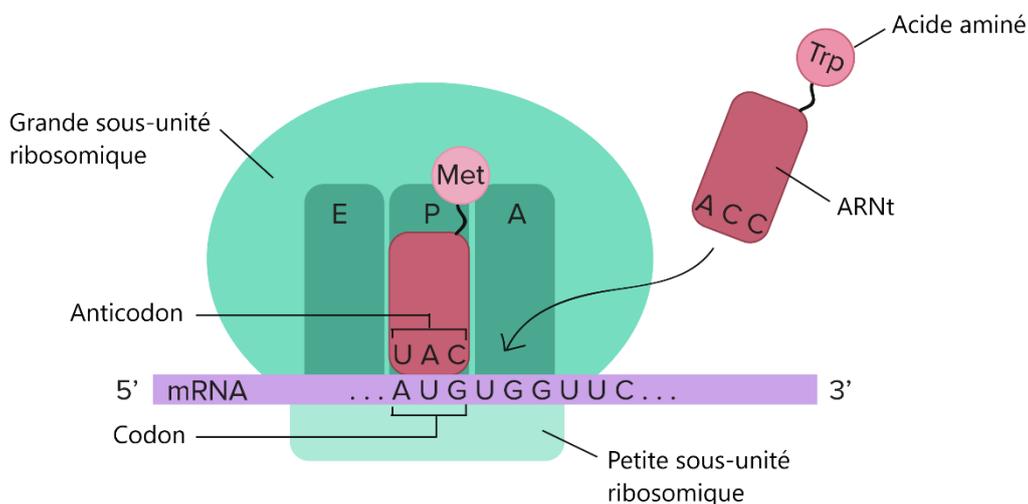


FIGURE 1.7 – Schéma d'un ribosome effectuant le premier cycle d'élongation sur un brin d'ARNm en cherchant l'appariement de l'ARNt qui correspond au codon suivant. Figure adaptée de Khan academy.

1.2.3 Le ribosome

Le ribosome est une machine moléculaire qui orchestre la synthèse peptidique. En effet, le ribosome a deux fonctions principales : le décodage de l'information génétique et la catalyse peptidique pour former la protéine.

Il est constitué de deux sous-unités : une grande sous-unité 60S et une petite sous-unité 40S⁶. La petite sous-unité a pour fonction le décodage par lecture du brin d'ARNm. La formation de la liaison peptidique se fait par la grande sous-unité qui contient une enzyme appelée peptidyl transférase. Lors de la traduction, les deux sous-unités s'assemblent autour de l'ARNm (voir figure 1.7).

Le ribosome est composé d'ARNr (ARN ribosomique) et de protéines ribosomiques. La grande sous-unité 60S fournit plusieurs sites :

- Le site A (aminoacyl) recrute l'ARNt portant l'acide aminé suivant à ajouter.
- Le site P (peptidyle) contient la chaîne peptidique en croissance avec un ARNt.
- Le site E (exit) permet à l'ARNt déchargé qui a apporté l'acide aminé précédent de partir.

Ainsi, les ARNt chargés peuvent venir trouver leur codon correspondant sur le brin d'ARNm et livrer l'acide aminé pour synthétiser la protéine.

Notons que les structures des ribosomes ont pu être observées grâce à des techniques de microscopie et de cristallographie avec une résolution suffisante. En effet, les structures détaillées des ribosomes chez les procaryotes étaient connues bien avant celles des eucaryotes grâce à la cristallographie aux rayons X [Ban et al. 2000]. L'accès aux structures des ribosomes eucaryotes n'a été possible que récemment avec la cryo-microscopie électronique et la cristallographie aux rayons X [Schüler et al. 2006], [Ben-Shem et al. 2010], [Ben-Shem et al. 2011], [Klinge et al. 2011]. Ces méthodes ont permis d'avoir accès aux structures des ribosomes eucaryotes avec une très grande résolution allant de 7.5 Å à 3 Å.

1.2.4 Les facteurs eucaryotes

Présentation

A chaque étape de la traduction plusieurs protéines appelées "facteurs eucaryotes" (eFs) sont nécessaires. Ces éléments peuvent apporter de l'énergie⁷ et avoir d'autres rôles tels que le recrutement du ribosome par l'ARNm.

Notons que les eucaryotes nécessitent plus de facteurs que les procaryotes, cette différence s'explique par la taille et la complexité des ribosomes eucaryotes [Boulik and Hellmann 1978].

eFs et régulation ?

Lors de l'étape de l'initiation de la traduction, plusieurs facteurs d'initiation eucaryotes (eIFs) viennent se fixer sur la sous-unité 40S du ribosome créant un pré-complexe d'initiation (PIC). Ces facteurs permettent au PIC de détecter la coiffe ou l'IRES⁸ rapidement [Jackson et al. 2010], [Hinnebusch 2017] , [O'Leary et al. 2013]. Par exemple dans le cas de l'IRES HCV⁹, la formation du PIC est modulée par la quantité des facteurs d'initiation [Fuchs et al. 2015].

6. chez les eucaryotes.

7. par hydrolyse de l'ATP ou GTP.

8. On décrira la coiffe et les IRES dans les sections suivantes du chapitre.

9. Les IRES seront décrites dans le paragraphe suivant.

Des études ont montré qu'avoir des connaissances bien précises sur le fonctionnement des facteurs eFs participants peut permettre de comprendre la régulation de la traduction notamment pendant l'initiation [Silvera et al. 2010] , [Gebauer and Hentze 2004], [Saini et al. 2010].

En effet, eIF3 est un facteur d'initiation permettant au facteur eIF4a de recruter le PIC par l'ARNm. Une surexpression de eIF3 peut conduire à des cancers chez l'homme [Silvera et al. 2010]. Ainsi, connaître le mode d'action de ce facteur et les possibilités de réguler sa quantité peut permettre de contrôler l'expression génique. De même, on peut citer eIF1A qui joue un rôle de régulateur pour la sélection du codon START en modulant le recrutement de l'ARNt-Mét sur le PIC [Saini et al. 2010]. Il y a également le facteur eIF4a qui est une hélicase ARN ayant une activité ATPase permettant de défaire les structures secondaires dans la région 5'UTR [Pause and Sonenberg 1992], [Hinnebusch 2014], [Svitkin et al. 2001], [Hinnebusch 2017] et qui permet également le recrutement du PIC par l'ARNm [Sokabe and Fraser 2017]. L'utilisation d'un inhibiteur appelé Hippuristanol [Bordeleau et al. 2006], [Cenicca and Pelletier 2016] sur ce facteur d'initiation empêche le recrutement du PIC. Ceci peut être également une manière de réguler le niveau de traduction.

Suite à cette description des acteurs clés participant à la traduction, nous allons désormais pouvoir décrire les différentes étapes successives de ce processus multi-étapes complexe qui sont : l'initiation (le démarrage), l'élongation (la formation de la chaîne d'acides aminés), la terminaison (l'arrêt) et le recyclage.

1.3 L'initiation : l'étape limitante à la traduction

L'initiation eucaryote est complexe car cette étape nécessite au moins 14 facteurs d'initiation (noté eIFs) contrairement à trois chez les procaryotes [Raven et al. 2017]. Cette étape est considérée comme étant l'étape limitante [Shah et al. 2013].

L'initiation eucaryote est faite en plusieurs sous-étapes [Aitken and Lorsch 2012], [Jackson et al. 2010],[Hinnebusch 2017], [Merrick and Pavitt 2018]. Le processus commence par la formation d'un complexe ternaire avec eIF2 et l'ARNt-Mét correspondant au codon START. Ce complexe se fixe à la sous-unité 40S. Ainsi, le complexe de pré-initiation (PIC) 43S est formé (voir figure 1.8). Cette configuration en PIC est nécessaire pour que la traduction puisse démarrer.

Nous verrons que chez les eucaryotes, l'initiation peut se faire de plusieurs manières (canonique ou non-canonique).

1.3.1 Initiation Canonique : une initiation qui est coiffe-dépendante

La traduction chez la plupart des eucaryotes se fait de manière canonique qui est coiffe-dépendante [Kozak 1989], [Kozak 2002], [Hinnebusch 2014],[Jackson et al. 2010], [Kozak 1978], [Merrick and Pavitt 2018]. Les ARNm

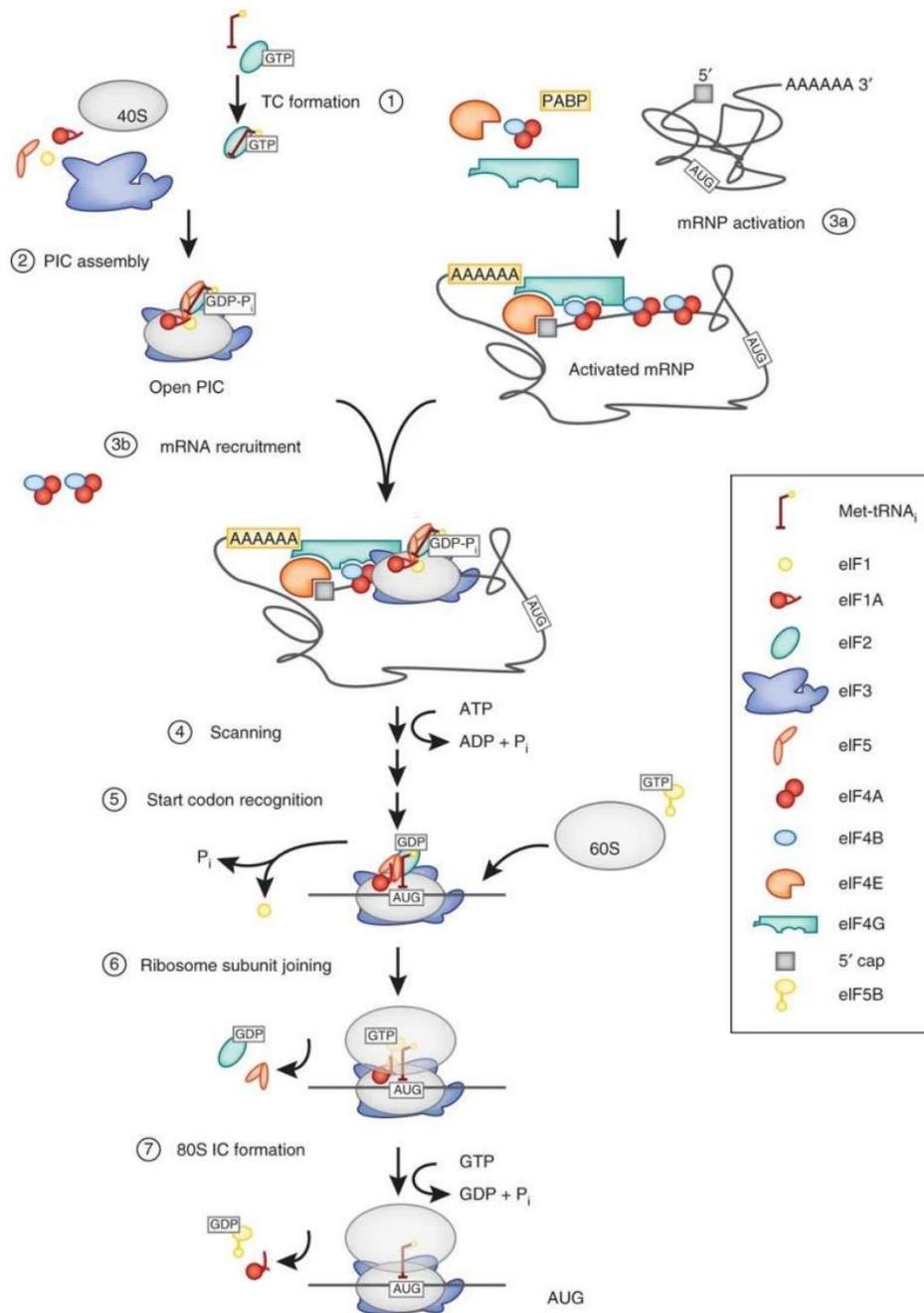


FIGURE 1.8 – Schéma de l'initiation chez les eucaryotes [Aitken and Lorsch 2012] avec les différentes étapes : (1) formation d'un complexe ternaire contenant l'ARNt-Mét et eIF2; (2) Recrutement du complexe ternaire par la 40S pour former le PIC 43S à l'aide de facteurs eIFs (1, 1A, 3 et 5); (3-a) L'ARNm se lie à des facteurs eIF4a pour permettre le recrutement du PIC et activer la coiffe en 5'; (3-b) Recrutement d'un ARNm coiffé par le PIC 43S; (4) Le PIC 43S scanne de 5' à 3' pour trouver le codon START; (5) Recrutement de facteurs pour former le PIC 48S pour être prêt à recruter la grande sous-unité 60S; (6) et (7) formation du complexe 80S pouvant effectuer l'étape d'élongation

eucaryotes ont presque tous une coiffe. Une coiffe est un nucléotide modifié que l'on trouve à l'extrémité 5' des ARNm dans les cellules eucaryotes. La coiffe joue plusieurs rôles : la protection des ARN d'une dégradation par des nucléases et le recrutement du ribosome sur l'ARNm. Cette coiffe lorsqu'elle est reliée à certains facteurs d'initiation va permettre de recruter le PIC 43S (voir figure 1.8). Ce mécanisme d'initiation montre que la petite sous-unité 40S du ribosome s'associe à des facteurs d'initiation (eIFs) pour former le PIC 43S qui reconnaît la coiffe située en 5' de l'ARNm. Chez les eucaryotes¹⁰, de l'énergie est nécessaire pour recruter la petite sous-unité 40S par hydrolyse de l'ATP [Trachsel et al. 1977], [Boulik and Hellmann 1978]. Le recrutement du PIC par la coiffe en 5' se fait par le facteur eIF4a [Sokabe and Fraser 2017]. Puis le PIC 43S se déplace le long de la 5'UTR (5' UnTranslated Region)¹¹ de l'ARNm de la direction 5' à 3', selon un processus dépendant de l'énergie ATP appelé "scanning" jusqu'à trouver le premier codon AUG de l'ARNm [Kozak 2002], [Kozak 1986], [Hinnebusch 2014], [Pestova et al. 2007]. Le PIC 43S scanne nucléotide par nucléotide la région 5'UTR jusqu'à trouver le premier codon START sur son site P. L'appariement codon anti-codon de l'ARNt-Mét du PIC 43S permet la reconnaissance du codon AUG. Ainsi, le PIC 48S est formé [Lomakin and Steitz 2013]. Puis, l'hydrolyse du GTP permet le recrutement de la grande sous-unité 60S par le PIC 48S. Ainsi, on obtient le complexe 80S fonctionnel qui démarre l'élongation (voir figure 1.8).

1.3.2 Initiation non-canonique : une initiation qui est IRES dépendante

Présentation

Sous certaines conditions de stress cellulaire et environnemental, il existe une initiation cellulaire non-canonique¹² appelée IRES dépendante qui entre en jeu. Ce procédé est possible sur des ARNm possédant une structure IRES (Internal Ribosome Entry Site). Les IRES sont des séquences fortement structurées et compactes facilitant le recrutement des ribosomes. Il faut noter que ces IRES cellulaires représentent 10-15% des ARNm eucaryotes [Leppek et al. 2018]. En effet, la cellule a besoin de synthétiser les protéines nécessaires à son maintien et à sa survie en cas de stress majeur [Jackson et al. 2010], [Piccirillo et al. 2014], [Holcik and Sonenberg 2005].

Par ailleurs, les IRES sont également des structures utilisées par certains virus pour recruter le ribosome de leurs hôtes afin de synthétiser les protéines nécessaires à leur réplication [Mailliot and Martin 2018]. La différence entre les IRES cellulaires et virales est leur degré de complexité structurale [Jackson 2013], [Leppek et al. 2018].

10. Chez les procaryotes le processus est différent. Le PIC est directement recruté par la séquence SHINE DALGARNO [Petrov et al. 2012], [Nakagawa et al. 2010].

11. La région 5' non traduite.

12. Il existe également des initiations non canoniques qui sont ni coiffe-dépendante et ni IRES dépendante. On peut citer les initiations CITE ou m6A [Lacerda et al. 2017], [Shatsky et al. 2010] et [Truniger et al. 2017].

Les différentes classes d'IRES

On peut catégoriser les IRES virales en quatre familles [Mailliot and Martin 2018] selon leur taille, leur structure secondaire ou tertiaire et selon le mode de fonctionnement¹³ :

- La classe I a besoin de pratiquement tous les facteurs d'initiation (eIF) à part eIF4E. Ces IRES recrutent le PIC 43S bien en amont de la région codante pour aller ensuite en scanning de 5' à 3' jusqu'à trouver le codon START. Par exemple, on peut citer l'IRES HRV (Human Rhinovirus).
- Les IRES de la classe II telles que l'IRES EMCV (Encephalomyocarditis Virus) ont besoin de eIFs mais recrutent directement le PIC 43S sur le codon START donc il n'y aura pas d'étape de scanning.
- Les IRES de la classe III ont des structures secondaires et tertiaires plus sophistiquées. Elles n'ont besoin que d'une poignée de facteurs eIFs. Ces IRES recrutent le PIC 43S directement sur le codon START sans passer par le scanning. C'est notamment le cas de l'IRES HCV (Hepatitis C Virus).
- Les IRES de la classe IV telles que l'IRES CrPV (Cricket Paralysis Virus) n'ont besoin d'aucun facteur eIF et permettent la traduction sans codon START et ni ARNt-Mét.

Le principe de l'initiation IRES dépendante

Toutes les étapes citées pour l'initiation coiffe-dépendante pour démarrer la traduction avec la formation du PIC sont aussi valables pour l'initiation IRES dépendante¹⁴. En fonction de la classe de l'IRES, on aura plus ou moins de eIFs nécessaires et le phénomène de scanning peut avoir lieu ou non.

1.3.3 Intérêt d'étudier les IRES

Plusieurs études ont montré que les IRES cellulaires participent à de nombreux procédés physiologiques tels que la spermatogenèse, la plasticité neuronale ou la différenciation cellulaire [Sonenberg and Hinnebusch 2007], [Gonzalez-Herrera et al. 2006], [Conte et al. 2009], [Audigier et al. 2008]. De plus, certaines IRES cellulaires ont aussi un rôle dans les procédés cellulaires comme la mitose [Cornelis et al. 2000], [Pyronnet et al. 2000], l'apoptose [Hsu et al. 2016], [Holcik and Sonenberg 2005] ou encore dans l'expression des cellules cancéreuses [Topisirovic and Sonenberg 2011], [Sonenberg and Hinnebusch 2007], [Silvera et al. 2010].

Par exemple, on peut citer un problème de santé actuel qui est le cancer du sein. Ce cancer représente la première cause de décès par cancer chez la femme. En cas de contrainte d'hypoxie dans les cellules, il y a une baisse de la traduction coiffe dépendante de VEGF-C (Vascular Endothelial Growth Factor) et une augmentation de la traduction IRES dépendante de VEGF-C [Lacerda et al. 2017], [Morfoisse et al. 2014], [Braunstein et al. 2007]. Il a été observé que l'activité des IRES VEGF-C est plus importante dans les cellules cancéreuses du sein. Connaître

13. Il existe également des IRES hors classes. Ce sont des IRES qui nécessitent tous les facteurs d'initiation eIFs.

14. sauf pour les IRES de type IV.

le fonctionnement des IRES VEGF-C peut être une manière de réguler la prolifération des cellules cancéreuses.

Les initiations non-canoniques (IRES dépendantes) chez les eucaryotes participent ainsi à la régulation de l'expression génique en cas de stress cellulaire et pour certaines maladies comme les cancers [Lacerda et al. 2017], [Hellen and Sarnow 2001]. Ainsi, comprendre le principe de fonctionnement peut avoir des enjeux thérapeutiques majeurs. Ainsi, l'étude des IRES a un grand intérêt sur la compréhension de certaines pathologies.

1.3.4 Pourquoi l'étude du phénomène de scanning est-elle intéressante ?

Régulation de la traduction avec le scanning

Le scanning est une étape permettant au PIC 43S de lire la zone 5'UTR afin de trouver le codon START. Il faut noter que 98% du génome humain est fait de séquences non-codantes comme la 5'UTR [Mattick 2003], [Mattick 2004]. Une des grandes hypothèses est que ces séquences non codantes permettent aux eucaryotes de réguler la synthèse protéique [Mattick 2004]. Des séquences structurées (tiges-boucles) ou le contenu de la région 5'UTR permettent cette régulation [Babendure et al. 2006], [Kozak 1986], [Kozak 1989], [Leppek et al. 2018], [van der Velden et al. 2002].

Rôle d'une tige-boucle en région 5'UTR

Il a été montré que les régions 5'UTR qui sont peu structurées ont une efficacité de traduction plus élevée [Ringnér and Krogh 2005]. Ainsi, les tiges-boucles dans la zone 5'UTR permettent de réguler la traduction. L'étude effectuée par une équipe sur des ARNm coiffés dans des extraits cellulaires eucaryotes a donné les résultats qui suivent [Babendure et al. 2006]. Pour des tiges-boucles ayant des $\Delta G = -10$ à -25 kcal/mol, l'efficacité de traduction reste inchangée par rapport à une séquence linéaire en 5'UTR. Cependant, quand ΔG passe de -25 à -40 kcal/mol, l'efficacité de la traduction diminue. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Kozak :

- Les structures de -30 kcal/mol n'influencent pas la traduction mais celles de -50 kcal/mol font chuter l'efficacité à 85-90% [Kozak 1986].
- L'efficacité de la traduction est très sensible à la proximité de la tige-boucle ($\Delta G = -30$ kcal/mol) à la coiffe en 5' [Kozak 1989], [Kozak 2002], [Leppek et al. 2018]. Elle chute fortement si la tige-boucle est à moins de +12 nucléotides de la 5'.

Les résultats de Vassilenko et al sur l'étude d'une tige-boucle dans la zone 5'UTR sont aussi en accord [Vassilenko et al. 2011].

Cette efficacité est différente si elle est *in vivo* ou *in vitro* [Babendure et al. 2006], [Kozak 2002], [van der Velden et al. 2002]. En effet, l'étude *in vivo* dans des cellules eucaryotes montre que mettre une tige-boucle pour les positions en dessous de +4 nucléotides de la 5' sont inhibitrices mais que les positions +7 à +13 nucléotides amplifient la traduction [Babendure et al. 2006]. L'inhibition due à la tige-boucle semble être moins importante dans

le cas *in vivo*. Cette distance (+7 à +13 nucléotides de la 5') permet sûrement un recrutement favorable du PIC. Ainsi, le positionnement de la tige-boucle en région 5'UTR est un moyen de réguler la traduction.

Une étude faite par Kozak montre qu'une tige-boucle ($\Delta G = -19$ kcal/mol) placée 14 nucléotides¹⁵ avant le codon AUG principal permet d'augmenter l'efficacité de la reconnaissance du codon AUG par le PIC lors du scanning [Kozak 1990]. Dans certaines situations, le ribosome peut lire la séquence "rapidement" et se tromper de codon START [Chenik et al. 1995], [Carroll and Derse 1993], [Arst Jr and Sheerins 1996],[Kearse and Wilusz 2017]. Ainsi, une structure en tige-boucle peut remédier à ce problème.

Toutes ces études montrent qu'une tige-boucle peut avoir un rôle de régulateur dans l'étape de l'initiation en fonction de sa stabilité et sa position dans la zone 5'UTR.

Dans ce manuscrit on va étudier le scanning avec des ARNm ayant des structures IRES. On utilisera l'ARNm EMCV de la classe II pour lequel le codon natif a été supprimé afin de permettre le scanning.

1.4 Les autres étapes de la traduction : l'élongation, la terminaison et le recyclage

1.4.1 L'élongation

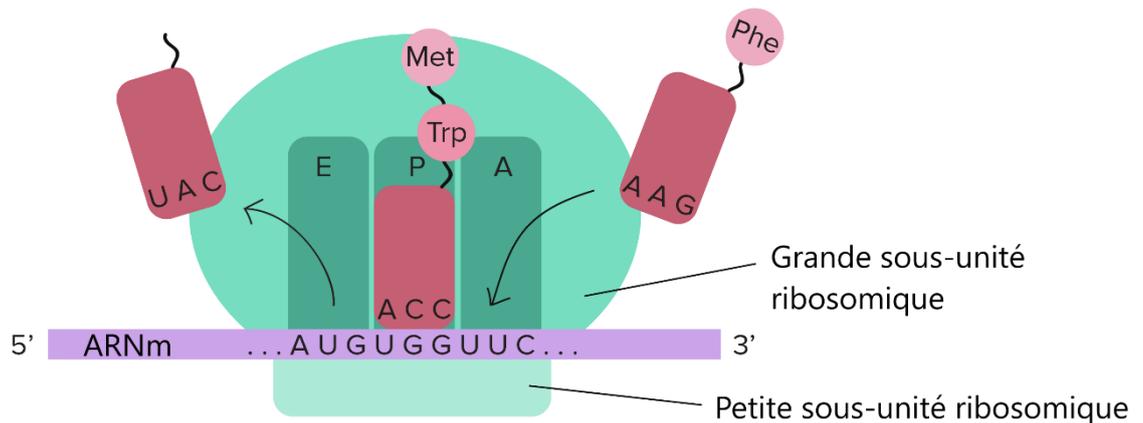


FIGURE 1.9 – Schéma résumé de l'étape d'élongation. Figure adaptée de Khan academy

15. Cette distance correspond entre le début de l'empreinte du ribosome et le codon START.

L'élongation débute quand le complexe 80S est formé au niveau du codon START. Ce complexe lit chaque codon de l'ARNm pour faire l'appariement codon anti-codon (voir figure 1.9). En effet, chaque nouvel ARNt chargé arrive au site A du ribosome. Si l'appariement codon anti-codon se fait, l'ARNt chargé va se fixer au site A. Puis, la formation de la liaison peptidique est effectuée entre la chaîne en croissance du site P et l'acide aminé du site A. Au même moment la liaison entre cette chaîne et l'ARNt est rompue au site P. Ainsi, il y a donc le passage de la chaîne en croissance à l'ARNt au site A (voir figure 1.10).

Après la formation de la liaison peptidique, le ribosome se déplace par rapport à l'ARNm et aux ARNt (voir figures 1.9 et 1.10). Il s'agit d'une translocation. Le codon suivant de l'ARNm se trouve dans le site A et l'ARNt avec la chaîne en croissance dans le site P. L'ARNt non chargé qui se trouvait dans le site P va passer au site E où il sera éjecté au cycle suivant. Les ARNt libres éjectés peuvent servir à nouveau en se rechargeant pour d'autres cycles d'élongation. Un cycle d'élongation correspond à une translocation. L'élongation de la chaîne se poursuit jusqu'à ce que le ribosome rencontre un codon STOP.

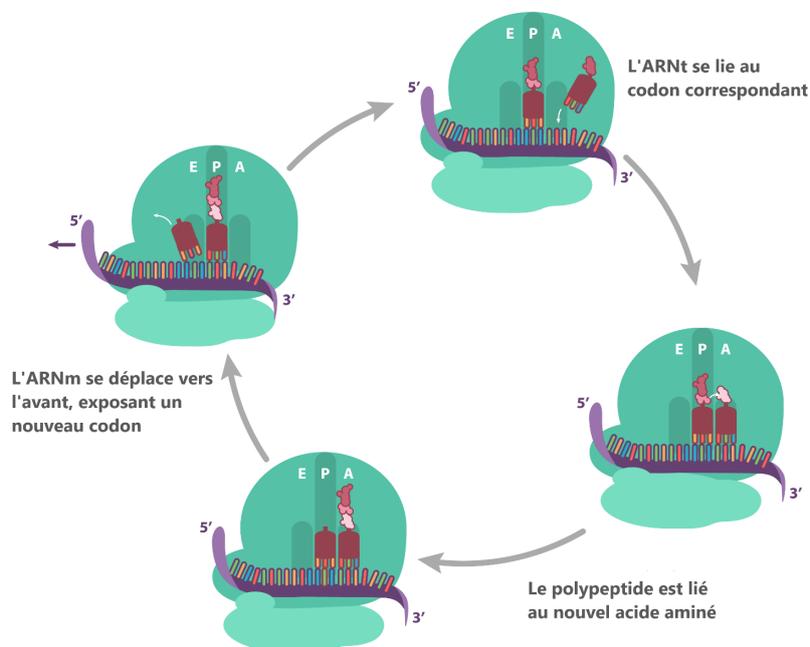


FIGURE 1.10 – Schéma d'un cycle d'élongation. Figure extraite de Khan academy.

1.4.2 La terminaison

La terminaison est l'étape de la libération du polypeptide synthétisé. Cette étape commence lorsque le ribosome rencontre un codon STOP. Lors de cette étape, il faut qu'un facteur de terminaison eRF (Eukaryotic Release Factor) reconnaisse un des codons STOP sur le site A [Aitken and Lorsch 2012], [Jackson et al. 2010], [Merrick and Pavitt 2018]. Ces facteurs sont des équivalents structuraux des ARNt mais ne portent pas d'acide aminé.

Dès que la chaîne peptidique commence à sortir du ribosome celle-ci va pouvoir subir des repliements sur elle-même. Il faut que la protéine ait la bonne configuration spatiale et subisse des maturations post-traductionnelles pour devenir fonctionnelle.

1.4.3 Le recyclage

Lorsque la traduction est terminée tous les acteurs qui ont participé à la réaction seront libérés et recyclés. Les deux sous-unités 40S et 60S seront libérées et ainsi que les facteurs de terminaison eRFs. Ils pourront être utilisés à nouveau pour une synthèse peptidique.

Nous avons présenté les différentes étapes de la traduction dans le paragraphe précédent. On peut se demander quel est l'intérêt d'avoir étudié ce phénomène au cours de la thèse.

1.5 Pourquoi doit-on étudier la traduction ?

Le contrôle de la traduction est essentiel pour la régulation de l'expression génique [Sonenberg and Hinnebusch 2009]. Lors de la synthèse des protéines, les interactions avec tous les acteurs (ribosomes, ARNm, ARNt, facteurs...) sont très contrôlées [Sonenberg and Hinnebusch 2009], [Pestova et al. 2007], [Jackson et al. 2010]. En effet, un défaut de régulation de la machinerie de traduction peut conduire à des problèmes de santé et notamment à des cancers [Piccirillo et al. 2014], [Topisirovic and Sonenberg 2011], [Holcik and Sonenberg 2005], [Silvera et al. 2010]. La régulation s'effectue à toutes les étapes de la traduction : initiation, élongation, terminaison et recyclage [Sonenberg and Hinnebusch 2009], [Pestova et al. 2007], [Jackson et al. 2010], [Sonenberg and Hinnebusch 2007]. En particulier, l'étape limitante qui est extrêmement contrôlée est celle de l'initiation [Sonenberg and Hinnebusch 2009], [Jackson et al. 2010], [Piccirillo et al. 2014], [Topisirovic and Sonenberg 2011], [Holcik and Sonenberg 2005], [Aitken and Lorsch 2012], [Gebauer and Hentze 2004], [Shah et al. 2013]. La régulation peut être effectuée sur : les facteurs permettant de former le PIC 43S ; sur le recrutement du PIC par l'ARNm ; la formation de la coiffe ; l'ARNm et des modifications structurales ou chimiques en 5'UTR...

Un problème actuel de santé publique majeur est celui du SARS-CoV-2 qui a provoqué une pandémie mondiale. Une étude récente a montré que le facteur de virulence de SARS-CoV-2 pouvait se fixer sur la sous-unité 40S de l'humain empêchant ainsi le recrutement du PIC nécessaire à la traduction chez l'homme [Lapointe et al. 2021b].

La compréhension du processus de traduction a ainsi permis la création du vaccin à ARNm contre le SARS-CoV-2 [Mercado et al. 2020].

Ainsi, étudier la traduction et notamment l'étape de l'initiation ouvre des perspectives futures pour de nouvelles solutions thérapeutiques.

1.6 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les acteurs participant à la traduction notamment le ribosome. Nous avons également vu les différentes étapes de la traduction : l'initiation, l'élongation, la terminaison et le recyclage. L'initiation eucaryote peut être coiffe dépendante ou IRES dépendante. L'une des sous-étapes de l'initiation qui nous intéresse pour notre étude en molécule unique est celle du scanning. On a abordé pourquoi il est intéressant d'étudier ce phénomène sur des ARNm à IRES. En effet, il est possible de moduler la traduction au niveau de cette étape de scanning par l'ajout de séquences structurées (tige-boucle) dans la région 5'UTR.

Nous allons donc à présent pouvoir étudier et caractériser le phénomène de scanning sur des ARNm à IRES EMCV avec l'aide de la microscopie de fluorescence TIRFm (Total Internal Reflection Fluorescence microscope).

Chapitre 2

Etude de la traduction en molécule unique

La traduction est un processus multi-étapes complexe asynchrone par définition. En effet, tous les ribosomes ne vont pas forcément s'initier et démarrer la traduction au même moment. Il est fort probable qu'ils n'aillent pas à la même vitesse lors des différentes étapes. Une approche en "molécule unique" a été choisie dans notre étude de scanning.

Les techniques ayant la dénomination de « molécule unique » sont des méthodes de manipulation ou d'observation des molécules chimiques ou biologiques à l'échelle individuelle. Il faut noter que la plupart des méthodes de mesures classiques utilisées sont des techniques de "mesures d'ensembles". Ces méthodes vont moyenniser les comportements individuels d'un grand nombre de molécules. Ainsi, avec les techniques de mesure d'ensemble, on obtiendra une moyenne statistique globale sur la mesure effectuée comme la vitesse moyenne de scanning. Par conséquent, avec le moyennage on perd la dispersion liée à la vitesse locale de scanning de chaque ribosome. Cependant, les techniques de molécule unique vont tenir compte du comportement individuel de toutes les molécules observées sans perdre cette dispersion. De plus, l'avantage d'observer les ribosomes individuellement est de permettre de distinguer et de caractériser les informations liées à une sous-population qui se comporte autrement. En effet, il a été observé dans des études que des ribosomes dans des cellules cancéreuses avaient un comportement différent [Belin et al. 2009]. Avec les techniques de molécule unique il est donc possible de quantifier et d'analyser ces événements rares. Par ailleurs, l'approche en molécule unique est un outil puissant qui permet de s'affranchir de la contrainte de synchronisation entre événements [Petrov et al. 2012]. En effet, tous les ribosomes ne démarrent pas la traduction au même moment. On pourra donc observer tous les événements indépendamment et simultanément permettant d'obtenir une distribution des statistiques lors de la mesure effectuée. Cette méthode semble être plus adaptée et pertinente pour étudier la traduction et notamment le phénomène de scanning.

Dans ce chapitre nous allons voir quelles sont les méthodes d'observation des molécules uniques dans un premier temps. Ensuite, nous verrons les différentes stratégies de marquage pour mesurer une vitesse de traduction. En dernière partie, nous verrons les différents résultats de cinétique de traduction.

2.1 Comment observer des molécules uniques

Les techniques d'observation en molécule unique sont des techniques de microscopie. On distingue deux sous-catégories :

- la microscopie aux longueurs d'onde optiques ayant une résolution spatiale ne permettant pas de voir directement les molécules. Il y a donc nécessité de marquer ces molécules pour faire de la microscopie de fluorescence.
- la microscopie électronique qui a une résolution spatiale suffisante. Cette technique ne nécessite pas de marquage mais requiert de geler les échantillons.

Dans cette deuxième catégorie, on peut citer la cryomicroscopie électronique (cryo-EM).

2.1.1 La cryomicroscopie électronique (cryo-EM)

La cryomicroscopie électronique permet d'observer à l'échelle de la molécule unique avec une grande précision les structures des acteurs de la traduction (ribosomes, facteurs d'initiation, ARNt, ARNm...) figés à un instant t . Cette méthode d'observation en molécule unique a permis de comprendre les différentes interactions entre acteurs lors de la traduction. En effet, la cryo-EM permet de cartographier en parallèle l'état de milliers de ribosomes qui ont été cryogénisés à une date donnée.

Cependant, soulignons que la méthode de référence en biologie structurale est la cristallographie aux rayons X. Cette méthode a valu le prix de Nobel de chimie en 2009 pour la structure du ribosome procaryote. En effet, la cristallographie aux rayons X a permis de comprendre beaucoup de choses dans la traduction et a beaucoup plus été utilisée que la cryo-EM bien qu'il ne s'agisse pas d'une méthode en molécule unique puisque l'on travaille sur un cristal. Une des difficultés expérimentales de cette méthode est la formation des cristaux qui peut prendre énormément de temps.

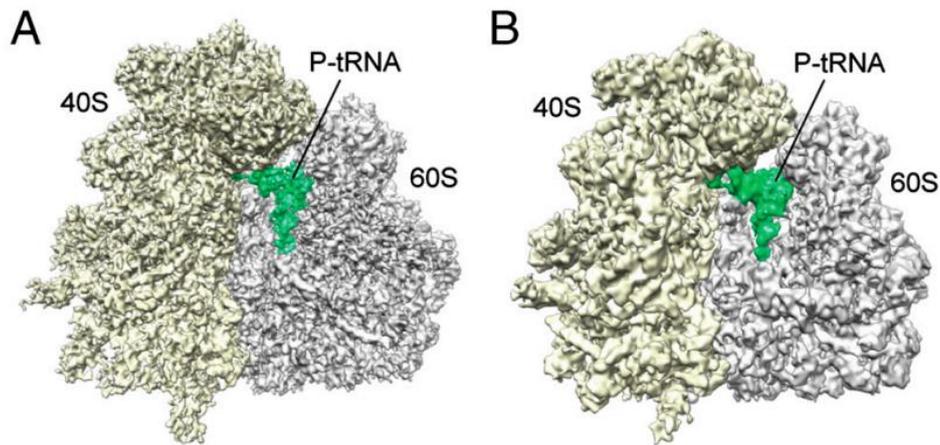


FIGURE 2.1 – Reconstruction des ribosomes eucaryotes 80S avec la cryo-EM chez : A) *T.aestivum* et B) *S.cerevisiae*. Observation des petites sous-unité 40S (colorées en jaune) et grandes sous-unité 60S (colorées en gris) des ribosomes. En vert est représenté l'ARNt-P se trouvant dans le site P du ribosome. Figure adaptée de [Armache et al. 2010].

Une étude récente en molécule unique avec la cryo-EM a permis de reconstruire les structures des ribosomes eucaryotes 80S de *T. aestivum* avec une résolution de 5.5Å et de *Saccharomyces cerevisiae* avec une résolution de 6.1Å (voir figure 2.1 a-b) [Armache et al. 2010]. Pour ces deux reconstructions avec la cryo-EM, l'équipe de recherche a observé plus d'un million de ribosomes avec la présence de l'ARNt-P dans le site P. Cette technique a permis donc de voir avec précision la structure de ces ribosomes eucaryotes. Cependant, cette méthode nécessite de figer les ribosomes dans leur état pour les observer. Par conséquent, cette technique d'observation n'est pas adaptée si l'on veut observer la dynamique des ribosomes individuels lors de la traduction. De plus la cryo-EM est un microscope très onéreux.

On choisira donc la microscopie de fluorescence à l'échelle de la molécule unique pour notre étude de scanning des ribosomes eucaryotes.

2.1.2 La microscopie de fluorescence

Dans cette sous-partie, nous allons présenter la microscopie de fluorescence permettant d'observer les molécules uniques en parlant du phénomène de fluorescence puis nous présenterons la technique de microscopie de fluorescence choisie pour notre étude en molécule unique : le TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence microscopy).

Présentation du phénomène de fluorescence

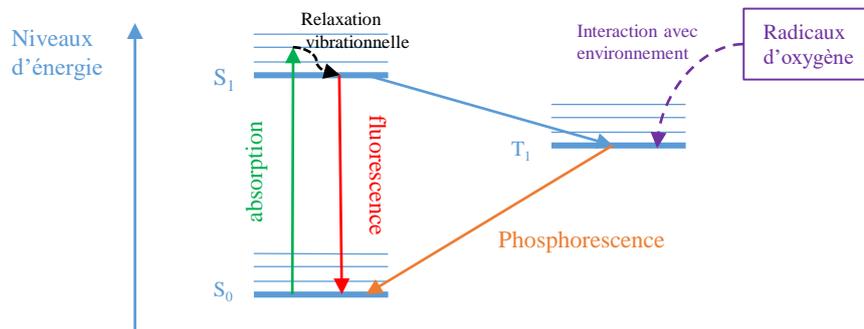


FIGURE 2.2 – Diagramme de Jablonski avec les niveaux d'énergie singulets S_0 et S_1 et triplet T_1 d'une molécule fluorescente.

Le phénomène de fluorescence est un processus d'interaction lumière-matière. Une molécule fluorescente initialement à l'état singulet fondamental S_0 possède la propriété d'absorber un photon et de passer dans un état excité appelé singulet S_1 . Le retour à l'état fondamental S_0 peut se faire de deux manières : soit par fluorescence ou soit par phosphorescence (voir figure 2.2).

La fluorescence est caractérisée par l'émission rapide d'un photon. Cette rapidité est explicable par les règles de sélection de la mécanique quantique $\Delta S=0$ ¹. La molécule reste dans un état singulet au cours de la transition électronique. Notons que la durée de vie de l'état excité est très courte.

La phosphorescence est caractérisée par une transition entre un état singulet S_1 vers un état triplet métastable T_1 . Cette transition n'est pas permise par le modèle quantique mais est rendue possible par le couplage spin-orbite. La transition est cette fois-ci plus lente puis suit une émission de photon pour retourner à l'état fondamental. En effet, la durée de vie de l'état triplet est très longue. Notons que ce processus est peu favorable.

Photoblanchiment

Il faut savoir qu'une molécule fluorescente peut perdre de manière irréversible sa fluorescence : ce phénomène est appelé photoblanchiment. Rappelons qu'une molécule qui est à l'état excité S_1 peut soit émettre un photon ou soit être engagée dans une réaction photochimique avec l'environnement (avec les radicaux d'oxygène) qui va empêcher son retour à un état excitable (voir figure 2.2). Plus on excite un fluorophore et plus la proportion de molécules qui photoblanchissent est grande. Le phénomène de photoblanchiment peut être quantifié en regardant l'évolution temporelle du signal de fluorescence de plusieurs molécules au cours du temps. Ce signal suit une loi de décroissance exponentielle caractérisée par une durée de vie qui dépend des conditions optiques (du type de fluorophore, de la puissance du laser, du temps d'excitation...). Ainsi, le photoblanchiment est une source de

1. S : moment quantique de spin.

bruit parasite que l'on veut minimiser lors de notre mesure de cinétique en molécule unique. Nous verrons dans la section suivante les différentes stratégies mises en place.

Les catégories de microscopie de fluorescence en molécule unique

La microscopie de fluorescence en molécule unique utilise ce principe de fluorescence comme l'indique son nom. Il faut savoir que le signal émis par les molécules uniques par fluorescence est intrinséquement limité (voir figure 2.2). Afin de mieux voir ces signaux, l'une des solutions a été de réduire le fond de fluorescence puisqu'on ne peut pas augmenter le signal d'émission. Pour ce faire, des méthodes de sectionnement axial ont été intégrées à la microscopie de fluorescence.

Il existe deux grandes catégories de microscopes de fluorescence utilisées pour les études en molécule unique : la microscopie confocale et la microscopie TIRF. Ces deux techniques sont intéressantes puisqu'elles permettent une sélection spatiale axiale qui permet d'augmenter le rapport signal à bruit de la mesure effectuée. On obtiendra une image plus contrastée puisqu'on limite le bruit de fond de fluorescence émis hors du plan focal. Cependant la microscopie confocale n'est pas une technique d'observation à champ large. L'autre inconvénient est qu'il faut scanner l'échantillon ce qui va allonger le temps d'acquisition [Davidovits and Egger 1969]. On pourra donc observer plusieurs ribosomes mais pas en même temps avec le scanning de l'image. Ainsi, la technique de microscopie confocale n'est donc pas adaptée pour notre cas si l'on veut voir simultanément le comportement de plusieurs ribosomes. En effet, on voudrait imager en parallèle des milliers de molécules uniques simultanément afin de suivre leur cinétique de départ. Ainsi, pour nos expériences en molécules unique pour l'étude de scanning on s'est naturellement dirigé vers la microscopie TIRF.

La microscopie en réflexion totale interne (TIRFm)

Nous allons voir en détail le principe du microscope TIRF en présentant d'abord le phénomène de réflexion totale.

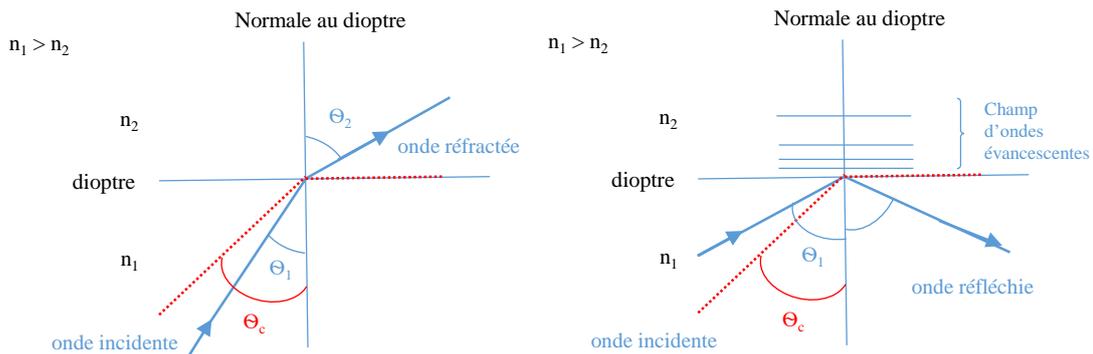


FIGURE 2.3 – Illustrations : à gauche, du phénomène de réfraction d'une onde incidente (en bleu) qui arrive avec un angle d'incidence $\theta_1 < \theta_c$ (angle critique limite) sur une interface entre deux milieux d'indice de réfraction n_1 et n_2 (tel que $n_1 > n_2$). En rouge est représentée l'onde incidente en réflexion totale limite. A droite, du phénomène de réflexion totale interne d'une onde incidente (en bleu) qui arrive avec un angle d'incidence $\theta_1 > \theta_c$ (angle critique limite) sur la même interface. Représentation du champ d'ondes évanescentes créé à la surface du dioptre. L'intensité de ce champ décroît exponentiellement sur une profondeur de pénétration d .

Phénomène de réflexion totale Lorsque l'on envoie une onde incidente avec un angle d'incidence θ_1 non nul sur un dioptre séparant deux milieux d'indices respectifs n_1 et n_2 on observe le phénomène de réfraction (voir figure 2.3). Si $n_1 > n_2$, on voit que l'onde réfractée s'éloigne de la normale au dioptre. Les lois de Snell-Descartes nous donnent la relation suivante :

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$$

avec :

$n_1 = 1.52$, l'indice du verre

$n_2 = 1.34$, l'indice du milieu de l'eau contenant les molécules uniques

θ_1 , l'angle d'incidence par rapport à la normale au dioptre dans le milieu verre d'indice n_1

θ_2 , l'angle de réfraction par rapport à la normale au dioptre dans le milieu d'indice n_2

La loi donnée montre qu'il existe un angle critique limite $\theta_c = \arcsin\left(\frac{n_2}{n_1}\right)$ tel que l'onde réfractée n'existe plus et que celle-ci soit complètement rasante au niveau du dioptre (voir l'onde représentée en rouge pointillé sur la figure 2.3). Cette condition de réflexion limite (telle que $\theta_2 = 90^\circ$) à l'interface entre le verre et l'eau du milieu biologique nous donne un angle critique d'incidence $\theta_c = 65.5^\circ$ à l'interface verre/eau. Par conséquent, toute onde incidente ayant un angle d'incidence $\theta_1 > \theta_c$ est en réflexion totale à l'interface verre/eau (voir figure 2.3). Les règles de continuité des composantes du champ électromagnétique données par les lois de Maxwell-Boltzman montrent qu'un champ d'ondes évanescentes est créé à l'interface. Ce champ d'ondes évanescentes est confiné dans un faible volume à la surface de la lame de microscope (voir figure 2.3). Notons que ce champ est non propagatif et que son intensité décroît de manière exponentielle sur une distance caractéristique appelée profondeur de pénétration notée d . L'expression de d est donnée par la formule suivante :

$$d = \frac{\lambda_{excitation}}{2\pi n_2} \frac{1}{\sqrt{\left(\frac{n_1}{n_2} \sin \theta_1\right)^2 - 1}}$$

avec :

$\lambda_{excitation}$, la longueur d'onde d'excitation.

Si on fait le calcul avec $\theta_1 = \theta_c$ et que l'on prend les longueurs d'excitation des LASER rouge ($\lambda_{excitation} = 638 \text{ nm}$) et vert ($\lambda_{excitation} = 561 \text{ nm}$) de notre montage, on trouve des profondeurs de pénétration d de 296 nm et 260 nm respectivement. On aura un champ d'ondes évanescente d'autant plus confiné que θ_1 est grand.

Présentation du TIRFm Le TIRFm est une technique à champ large permettant l'observation simultanée de plusieurs milliers de systèmes biologiques en parallèle. Cette technique consiste à réaliser une sélection spatiale sur un volume d'excitation fin (d'une hauteur d'une centaine de nm) entre la lame de microscope et le milieu d'observation de l'échantillon. Ce sectionnement optique va permettre d'observer des systèmes de quelques nm comme dans notre cas et de limiter également le bruit de fond de fluorescence afin d'avoir des signaux d'intérêt avec de bons rapports signal à bruit. La réalisation de cette sélection spatiale se fait donc par l'arrivée d'une onde incidente qui arrive en réflexion totale à l'interface verre/eau qui va générer un champ d'ondes évanescentes qui permettra d'exciter les fluorophores localisés uniquement dans ce volume confiné de l'ordre d'une centaine de nm (voir figure 2.4).

Notons que l'excitation des fluorophores et la collecte des photons se fait avec le même objectif du microscope. Si l'on veut collecter un maximum de photons tout en restant en réflexion totale, il faut que l'ON (Ouverture Numérique)² de l'objectif soit grande. L'angle limite de l'objectif doit être supérieur à l'angle critique d'incidence θ_c . Ainsi, on a donc choisi un objectif à immersion dans l'huile³ avec une grande ON de 1.50. Pour notre objectif à ON=1.50, on trouve un angle limite d'une valeur de 80.7° ce qui est supérieur de 15° par rapport à l'angle critique θ_c . On se retrouve avec une grande possibilité d'angles d'incidence pour être en situation de réflexion totale interne. Plus θ_1 est grand et plus le champ d'ondes évanescentes sera confiné en surface de l'échantillon. Une faible pénétration du champ signifie que les éléments fluorescents libres en solution seront moins excités. Par conséquent, on limitera fortement le bruit de fond de fluorescence.

2. $ON = n_1 \sin \theta_{objectif}$.

3. L'huile d'immersion utilisée a un indice de réfraction très proche de celui du verre de la lame de microscope.

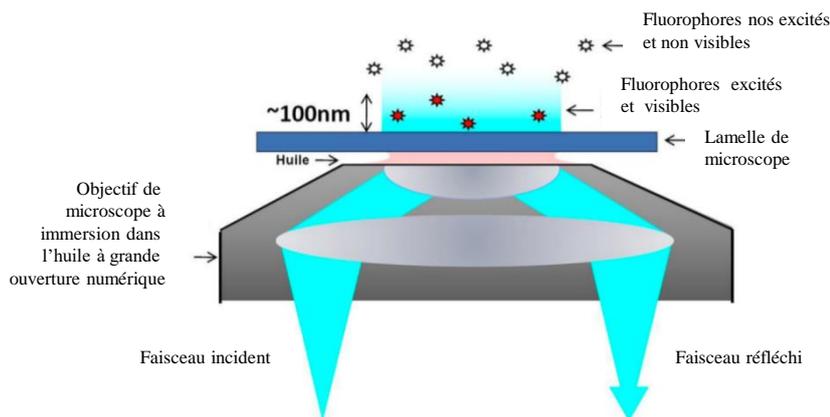


FIGURE 2.4 – Schéma illustrant le principe de la microscopie TIRFM. Un faisceau d'onde incident est envoyé avec un angle d'incidence $\theta > \theta_c$ sur la lame de microscope. Ce faisceau est complètement réfléchi à l'interface entre l'eau salée (contenant les échantillons biologiques marqués) et le verre. A l'interface, un champ d'ondes évanescentes sera créé permettant d'exciter les molécules se trouvant uniquement dans le volume d'excitation (d'une hauteur de 100 nm). Figure extraite de [Barbier 2017].

La méthode d'observation en molécule unique avec le TIRFM semble être un compromis idéal pour visualiser les signaux des milliers de molécules tout en ayant un rapport signal à bruit suffisant. Cependant, cette méthode présente également des inconvénients :

- Il faut attacher l'échantillon à la surface de la lamelle.
- Nous sommes limités en concentrations en espèces marquées (moins de 30nM) si l'on veut respecter la conditions de molécule unique.

2.1.3 Une information spatiale supplémentaire : FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) Microscopy

Le FRET est une technique utilisable à l'échelle de la molécule unique [Tinoco and Gonzalez 2011],[Petrov et al. 2012] en microscopie de fluorescence permettant de mesurer des distances de l'ordre d'une dizaine de nm. Le FRET est un phénomène de transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes suffisamment proches résultant d'une interaction dipôle-dipôle. Ce phénomène est possible uniquement si le spectre d'émission de la molécule appelée «donneur» et le spectre d'absorption de la molécule « accepteur» se recouvrent. Lorsque le donneur est excité, il peut soit se désexciter spontanément ou soit transférer son énergie à l'accepteur qui va se désexciter en libérant un photon.

Le FRET est un processus qui dépend de la distance R séparant les deux molécules (donneur et accepteur). Son efficacité E est donnée par la formule suivante :

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6}$$

avec :

R_0 , le rayon de Förster. Ce dernier correspond à la distance entre donneur et accepteur pour laquelle l'efficacité du transfert d'énergie est de 50% . R_0 est de l'ordre de 5nm.

R , la distance entre le centre des deux dipôles.

L'efficacité de FRET est une grandeur comprise entre 0 et 1. E varie grandement avec la distance entre l'accepteur et le donneur. C'est donc une méthode qui va permettre de mesurer la distance séparant les marqueurs avec précision. C'est une technique utilisée notamment pour l'étude de la traduction [Fuchs et al. 2015], [Petrov et al. 2016], [Capece et al. 2015]. Cependant, le FRET nécessite des stratégies de marquage complexes sur le ribosome si l'on veut suivre sa dynamique de traduction (voir l'exemple donné sur les figures 2.5 et 2.6). Il faut aussi choisir des fluorophores adaptés pour le FRET. Par exemple, les marqueurs Cy3 et Cy5 sont couramment utilisés. Leur efficacité de FRET varie de 1 (à 20 Å) à 0 sur une distance R supérieure à 80 Å. L'efficacité de FRET varie grandement entre 30-60 Å, distance parfaite pour étudier le recrutement de la grande sous-unité 60S du ribosome par le PIC.

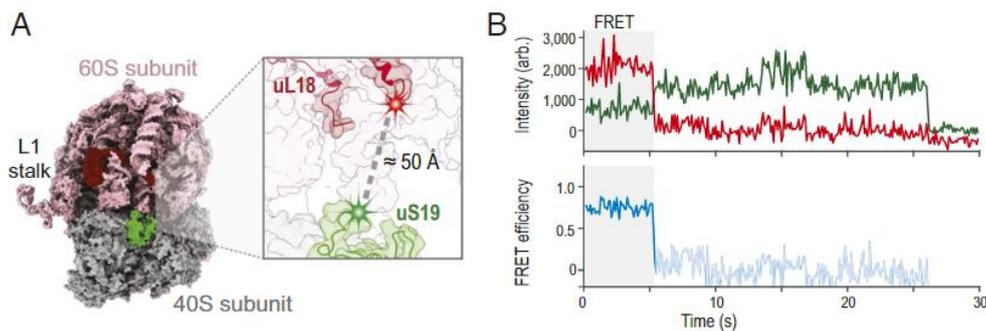


FIGURE 2.5 – Exemple d'une étude eucaryote en molécule unique avec le FRET pour voir l'effet d'un facteur de virulence issu du virus SARS-Cov2 sur le recrutement du ribosome humain sur des ARNm à IRES CrPV.

A-Schéma du ribosome 80S dont la petite sous-unité 40S est en gris et la grande sous-unité 60S est en rose. Des protéines ribosomiques de la 60S et de la 40S ont été marquées par des ybbR TAG contenant respectivement les fluorophores Cy5 (rouge) et Cy3 (vert).

B- Exemple de traces temporelles des signaux de fluorescence des marqueurs avec le FRET et l'efficacité de FRET. Figure extraite de [Lapointe et al. 2021a].

L'exemple de l'étude en molécule unique faite avec le FRET [Lapointe et al. 2021a] montre bien que le FRET nécessite de bien connaître le positionnement des marqueurs sur le ribosome (voir figure 2.5-A). Il faut donc avoir la structure atomique pour pouvoir la réaliser proprement. Dans cette étude, les auteurs ont incorporé les marqueurs Cy3-YbbR TAG et Cy5-YbbR TAG dans des endroits bien spécifiques de la petite sous-unité 40S (en vert) et de la grande sous-unité 60S (en rouge). Les traces des signaux de fluorescence (voir figure 2.5-B) donnés par le FRET nous montrent qu'on observe bien le complexe 80S assemblé. Nous pouvons également voir que le FRET n'échappe pas au photoblanchiment puisqu'on voit que l'on perd le signal rouge puis le signal vert à la fin du signal.

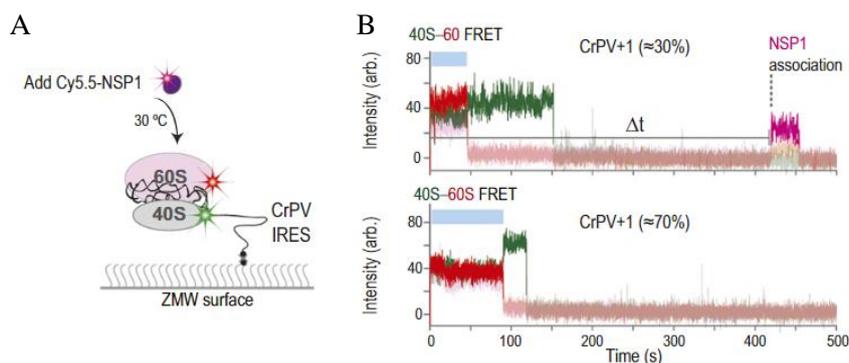


FIGURE 2.6 – A- Schéma du marquage ribosomique : Cy3-YbbR TAG et Cy5-YbbR TAG sont incorporés dans la petite sous-unité 40S (en vert) et la grande sous-unité 60S (en rouge). Les complexes 80S marqués ont été incubés sur les ARNm à IRES CrPV. Les ARNm sont attachés à des ZMW. Les facteurs de virulence NSP1 sont marqués par des Cy5.5 en violet et ajoutés au milieu à 30°C avec une concentration de 25nM. B- Traces temporelles des signaux de fluorescences FRET avec le facteur NSP1 marqué : en haut, dans 30% des cas on voit une association de NSP1 et en bas dans 70% on voit le contraire. Figure extraite de [Lapointe et al. 2021a].

Cette expérience avec le FRET a permis de voir l'effet de NSP1 sur le complexe 80S (voir figure 2.6). Le complexe 80S a été fixé sur l'IRES CrPV. On incorpore de fortes concentrations de NSP1 (25nM). Ces résultats montrent que seulement dans 30% des cas, le facteur NSP1 vient perturber le complexe 80S pré-assemblé. Dans cette étude, les auteurs ont montré que NSP1 perturbe fortement la traduction en interagissant avec la sous-unité 40S en l'empêchant de recruter la 60S. Alors que si le complexe 80S est pré-assemblé, NSP1 le perturbe très peu.

2.1.4 Augmentation de la concentration en molécules uniques avec le Zéro mode Waveguide (ZMW)

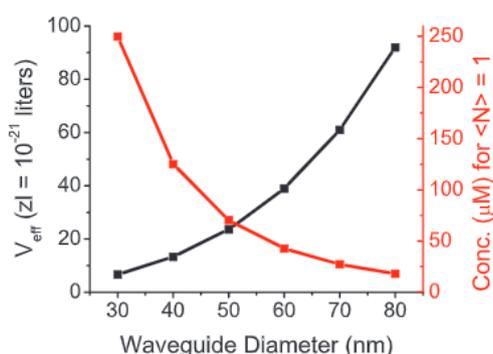


FIGURE 2.7 – Volume effectif V_{eff} (L) correspondant à la concentration en espèces marquées en fonction du diamètre du puits du ZMW en pour avoir en moyenne une molécule par V_{eff} . Figure extraite de [Levene et al. 2003].

Le Zero Mode Waveguide (ZMW) est une amélioration de l'approche en molécule unique en microscopie de fluorescence. Le principal avantage de cette technique est de pouvoir travailler avec une concentration en espèces

marquées allant de 100nM à 250 μ M contrairement aux autres méthodes en molécule unique où on ne pouvait excéder une dizaine de nM.

Les ZMW sont des plaques de verre recouvertes d'une fine couche d'un dépôt d'aluminium contenant des puits nanostructurés dont le diamètre est de l'ordre de 100nm [Levene et al. 2003], [Joo et al. 2008]. Les ZMW sont des guides d'ondes non propagatifs (d'ordre zéro) qui permettent de confiner le champ d'excitation sur un faible volume d'épaisseur de l'ordre de 50 nm. Dans ces puits sera déposé l'échantillon d'étude contenant les molécules marquées. Plus les trous sont petits et plus on pourra travailler avec des concentrations maximales en molécules uniques élevées [Levene et al. 2003] (voir figure 2.7). Notons que la taille du ribosome humain est de 30 nm et si l'on désire travailler en molécule unique avec des ZMW on sera limité par la taille du puits qui est bornée par la taille du ribosome. On peut penser à utiliser des puits allant jusqu'à 40 nm de diamètre et donc on aura la possibilité de travailler avec des concentrations en espèces marquées allant jusqu'à 150 μ M tout en restant en condition de molécule unique. Par exemple, dans l'étude en molécule unique avec le FRET donnée dans la sous-partie précédente, les auteurs ont dû utiliser des concentrations physiologiques allant jusqu'à 25nM en espèces marquées (voir figure 2.6) et ceci a été rendu possible par l'utilisation des ZMW [Lapointe et al. 2021a].

Cependant, c'est une méthode très onéreuse puisqu'une plaque de ZMW coute une centaine d'euros. S'il l'on veut utiliser le ZMW pour nos expériences en molécule unique il va falloir utiliser plus d'une vingtaine de plaques par journée d'expérimentation. Cette technique n'est pas adaptée pour nos expérience bien qu'elle permette de travailler avec de fortes concentrations. Cette approche avec le ZMW combinée au FRET a été également utilisée par une équipe pour mesurer la cinétique de scanning eucaryote *in vitro* sur des ARNm coiffés avec la microscopie de fluorescence TIRFm [Wang et al. 2022] que l'on détaillera à la fin du chapitre.

2.2 Stratégies de marquage fluorescent pour mesurer une vitesse de traduction

Lors de la traduction, plusieurs acteurs (ribosome, ARNm, ARNt et les facteurs) vont intervenir comme on l'a décrit dans le chapitre 1. Ainsi, on a plusieurs possibilités de marquage pour étudier ce phénomène. En effet, on peut suivre le phénomène de manière plus ou moins directe en fonction du choix de marquage.

2.2.1 Marquage du ribosome et des ARNt

Différentes techniques de marquage direct sont possibles pour l'étude en molécule unique par la microscopie de fluorescence avec le marquage spécifique et covalent des différents acteurs tels que les ARNt ou le ribosome lui-même. Ces techniques de marquage nécessitent de connaître la structure des molécules et d'avoir des méthodes chimiques élaborées.

En effet, la maîtrise du marquage des ARNt avec des fluorophores a permis avec le FRET d'identifier l'état hybride des deux ARNt avant l'étape de la translocation dans le complexe 80S [Blanchard et al. 2004a], [Blanchard et al. 2004b].

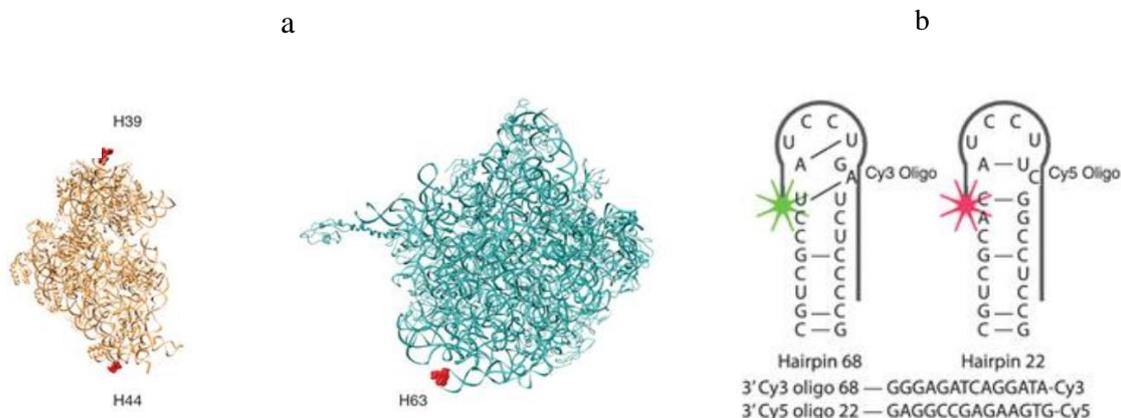


FIGURE 2.8 – a)- Position des sites de marquage sur le ribosome de *Saccharomyces cerevisiae* sur une représentation 3D du ribosome *E.Coli*. Schéma de la petite sous-unité (en jaune) et de la grande sous-unité (en vert). En rouge sont représentées les hélices modifiées qui seront remplacées par des tiges-boucles. b)- Schéma des tiges-boucles marquées par des oligofluorophores cyanines. Figure adaptée de [Petrov and Puglisi 2010].

Plusieurs méthodes de marquage direct du ribosome sont possibles en marquant ses protéines ou son ARNr afin de suivre son activité lors de la traduction. Le ribosome eucaryote est une macro-molécule qui a une structure très complexe. Son marquage nécessite une connaissance précise de sa structure. Une des stratégies de marquage peut être basée sur la modification structurelle du ribosome. Il faut marquer spécifiquement le ribosome mais de manière très stable sans altérer son activité traductionnelle. Par exemple, il est possible de marquer les ARN ribosomiques comme dans l'étude [Petrov and Puglisi 2010] (voir figure 2.8). Cette équipe a identifié deux hélices du ribosome chez *Saccharomyces cerevisiae* puis les a modifiées afin de rajouter des tiges-boucles ayant des séquences complémentaires à des oligofluorophores. Dans leur étude, ils ont démontré que le complexe ribosome-oligofluorophore était stable au cours du temps pour une étude en molécule unique. Dans une étude eucaryote en molécule unique faite avec le FRET pour l'étude de scanning [Wang et al. 2022], les auteurs ont marqué différentes protéines de la grande sous-unité 60S et de la petite sous-unité 40S.

Ces méthodes de marquage direct permettent de voir l'activité du ribosome en temps réel mais la stratégie de marquage semble être difficile à être mise en oeuvre. En effet, ce sont des méthodes assez "invasives" et qui peuvent gêner la traduction. Nous allons désormais voir des méthodes de marquage "indirect" moins invasives. Je présenterai d'abord notre méthode de marquage de l'ARNm, puis la Nascent Chain Tracking qui est utilisée *in*

cellulo.

2.2.2 Notre méthode avec le marquage de l'ARNm

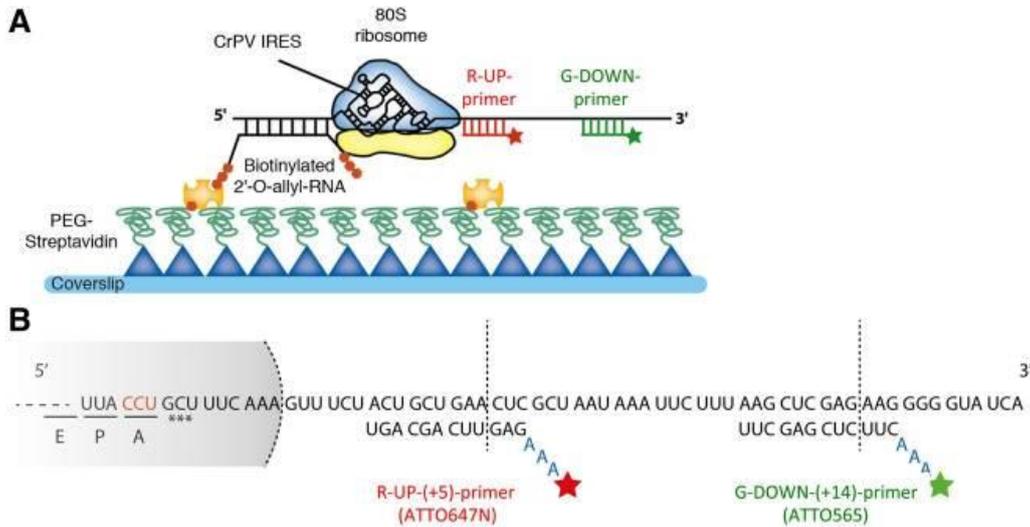


FIGURE 2.9 – Exemple d'étude en molécule unique sur des ARNm à IRES (CrPV) avec le TIRFm pour étudier une cinétique de traduction. A- L'ARNm est attaché grâce à des accroches spécifiques sur une lamelle contenant des PEGs-neutravidines. L'ARNm est marqué par des oligofluorophores qui sont hybridés en positions UP (en rouge) et DN (en vert). B- Représentation du ribosome en gris lorsqu'il est recruté par l'IRES. On voit les oligonucléotides contenant des marqueurs (ATTO647N ou ATTO565) qui sont hybridés à l'ARNm. Figure adaptée de [Bugaud et al. 2017].

Une autre possibilité de marquage pour l'étude de la traduction est de marquer l'ARNm avec des oligofluorophores. Les oligofluorophores ou primers sont des oligonucléotides couplés à des fluorophores que l'on hybride directement sur le brin d'ARNm (voir figure 2.9). Cette stratégie de marquage est moins invasive et permet de mesurer de manière indirecte l'activité du ribosome.

Le choix des fluorophores pour marquer l'ARNm a été effectué selon leurs propriétés photophysiques [Barbier 2017]. Les primers seront visibles au microscope de fluorescence grâce aux fluorophores. Une contrainte de cette stratégie est que l'oligofluorophore doit être suffisamment stable⁴ lors de son hybridation sur l'ARNm mais il faut aussi que le ribosome puisse le détacher facilement lors de son passage. Le choix s'est donc restreint à des primers de 21 nt couplés à de petites molécules organiques fluorescentes de quelque nm qui sont des fluorophores ATTO565 et ATTO647N. Ces fluorophores peuvent être excités respectivement dans le vert (561 nm) et dans le rouge (640 nm). Le premier primer hybridé est appelé UP. Le second hybridé plus en aval de l'ARNm est appelé DN (Down).

Notre équipe a utilisé cette stratégie de marquage pour suivre la cinétique de traduction en molécule unique *in vitro* sur des ARNm à IRES (HCV et CrPV) avec le TIRFm [Bugaud et al. 2017]. Nous utiliserons également cette

4. La stabilité du primer va dépendre de sa longueur et du pourcentage de nucléotides C-G dans sa séquence.

même stratégie de marquage sur l'ARNm pour notre étude de scanning en molécule unique que l'on détaillera dans le chapitre 5.

2.2.3 Nascent Chain tracking (NCT)

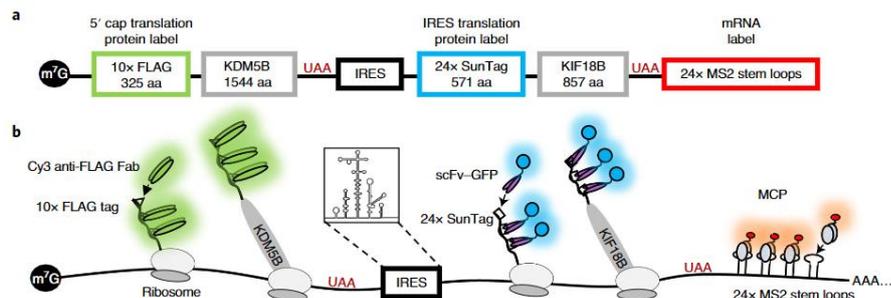


FIGURE 2.10 – Comparaison entre les initiations coiffe dépendante et IRES dépendante : a- Schéma de la construction du système rapporteur contenant une coiffe et une structure IRES. L'ARNm comporte une séquence de 10xFLAG et 24x SunTag. b- La protéine issue de l'initiation coiffe dépendante est marquée par des anti-FLAG couplés à Cy3 qui vont venir se fixer sur la séquence peptidique 10xFLAG (en vert). La protéine issue de l'initiation IRES dépendante sera marquée par GCN4 couplé au GFP qui va s'accrocher sur la séquence peptidique 24x SunTAG (en bleu). UAA est le codon STOP. Figure extraite de [Koch et al. 2020].

Une autre méthode de marquage indirect est de voir l'évolution de la synthèse de la chaîne peptidique (Nascent chain tracking) via des étiquettes SUNTAG ou FLAGTAG. Cette stratégie est fortement utilisée pour les études en molécule unique *in cellulo*. L'ARNm traduit possède une séquence qui code pour un peptide FLAG ou SUNTAG qui lorsqu'il est traduit va être reconnu par des anti-corps possédant des fluorophores tels que des anti-FLAG couplés à des marqueurs fluorescents comme le Cy3 (voir figure 2.10). Grâce à leur signal de fluorescence, on est capable de suivre l'activité du ribosome de manière indirecte. Dans l'exemple donné dans la figure 2.10, on est capable de quantifier et de suivre les initiations coiffe dépendante ou IRES dépendante en regardant les types de signaux de fluorescence des protéines synthétisées. Cependant, il faut noter que le temps d'apparition du signal de fluorescence ne correspond pas uniquement au temps d'élongation mais inclut également les temps de repliement et de maturation de la protéine. Ces cinétiques ne sont pas forcément négligeables devant les cinétiques d'élongation et peuvent induire de fortes incertitudes lors de la mesure de la vitesse de traduction du ribosome.

Ainsi, il existe différentes stratégies de marquage pour suivre plus ou moins directement la cinétique de traduction. Chaque stratégie a ses avantages et inconvénients. Nous allons désormais présenter dans la section suivante les différents résultats de cinétique de traduction obtenus durant ces dernières années.

2.3 Résultats de cinétique de traduction

Des approches génétiques [Saini et al. 2010], biochimiques [Algire et al. 2002], [Pisarev et al. 2007], structurales [Hinnebusch 2017] et génomiques [Iwasaki and Ingolia 2017] ont permis de comprendre le mécanisme de l'initiation coiffe-dépendante. Cependant, l'approche cinétique était limitée aux méthodes de mesures d'ensemble qui ont permis dans un premier temps de caractériser la vitesse de traduction globale. Puis, des méthodes en molécule unique sont venues compléter ces études de la cinétique de traduction.

2.3.1 Mesures d'ensemble

Des méthodes de mesures d'ensemble ont donné des estimations globales sur la cinétique de traduction. En effet, des mesures d'ensemble avec une approche luciférase ont permis de mesurer des vitesses de traduction [Berthelot et al. 2004], [Vassilenko et al. 2011]. L'approche luciférase consiste à insérer une séquence correspondante à la protéine luciférase dans la région codante de l'ARNm. Lors de la traduction, on peut mesurer l'activité de la protéine luciférase grâce à la bioluminescence. Ces études de mesures d'ensemble ont montré que le scanning s'effectue globalement de 5' à 3' et que la vitesse de scanning augmente linéairement avec la taille de la région 5'UTR [Berthelot et al. 2004], [Vassilenko et al. 2011]. Ils ont trouvé sur des ARNm coiffés *in vitro* une :

- vitesse de scanning de 10 nt/s (à 26°C dans l'extrait cellulaire de levure) [Berthelot et al. 2004]
- vitesse de scanning de 6 nt/s (à 30°C dans l'extrait cellulaire de Krebs) et 8 nt/s (25°C dans de l'extrait cellulaire de germe de blé) [Vassilenko et al. 2011].
- vitesses d'élongation de 1 AA/s⁵ et 1-1.5 AA/s respectivement dans les extraits cellulaires de Krebs et de germe de blé [Vassilenko et al. 2011].

2.3.2 Mesures en molécule unique

in vitro

Des études en molécule unique *in vitro* notamment avec smFRET ont permis de mieux comprendre le phénomène de traduction chez les eucaryotes et notamment les rôles des différents acteurs. En effet, elles ont permis d'étudier les interactions du ribosome avec les facteurs d'initiation [O'Leary et al. 2013], [Sun et al. 2012], [Sun et al. 2014], [Petrov et al. 2012], les initiations IRES dépendantes [Fuchs et al. 2015], [Petrov et al. 2016], [Bugaud et al. 2017] et l'élongation [Ferguson et al. 2015], [Ng et al. 2018], [Blanchard 2009]. En effet, ces études en molécule unique nous ont renseignés sur le mécanisme de la traduction *in vitro* en général [Blanchard 2009], [Bustamante et al. 2011], [Petrov et al. 2012], [Tinoco and Gonzalez 2011].

5. AA : Acide Aminé

Plus particulièrement, une équipe a mesuré en temps réel *in vitro* avec la méthode de la molécule unique la cinétique individuelle de ribosomes eucaryotes sur des ARNm coiffés [Wang et al. 2020]. Ils ont utilisé le NCT avec une approche FLAGTAG. Ils ont mesuré une vitesse d'élongation de 2.5 ± 0.1 AA/s (dans des extraits cellulaires de levure) [Wang et al. 2020]. Dans leur étude, ils ont également pu voir l'influence d'une tige-boucle ($\Delta G = -4.8$ kcal/mol) très peu stable sur la cinétique de traduction. Ce phénomène n'était pas observable dans les études de mesure d'ensemble.

Il y a aussi des vitesses d'élongation qui ont été mesurées par notre équipe avec la technique de marquage sur l'ARNm avec des oligofluorophores [Bugaud et al. 2017]. Leur étude en molécule unique avec le TIRFm dans le RRL (Rabbit Reticulocyte Lysate)⁶ à 30°C a donné des vitesses d'élongation de :

- 6.8 ± 2.6 AA/s sur les ARNm à IRES HCV.
- 2.2 ± 0.3 AA/s sur les ARNm à IRES CrPV (en pré-incubant les ribosomes).

in vivo

Des équipes ont voulu caractériser cette cinétique de traduction en molécule unique *in vivo* et notamment dans des cellules. En effet, des méthodes d'étude de la traduction *in cellulo* avec le NCT avec les approches SUNTAG ou FLAGTAG ont vu le jour [Wang et al. 2016], [Yan et al. 2016], [Wu et al. 2016], [Morisaki et al. 2016], [Halstead et al. 2015] [Koch et al. 2020]. Toutes ces approches ont permis de mesurer des vitesses d'élongation *in cellulo* :

- 4 AA/s (à 37°C) sur des ARNm coiffés dans des neurones [Wang et al. 2016]
- 3-5 AA/s sur des ARNm coiffés dans des cellules U2OS [Yan et al. 2016]
- 5 ± 1 AA/s sur des ARNm coiffés dans des neurones [Wu et al. 2016]
- 10 AA/s sur des ARNm coiffés [Morisaki et al. 2016] dans des cellules.
- 2 AA/s sur des ARNm à IRES EMCV dans des cellules U2OS [Koch et al. 2020]

Les vitesses d'élongation mesurées *in vivo* sont cohérentes avec celles obtenues avec les méthodes de mesure d'ensemble.

Les résultats obtenus avec les méthodes de molécule unique sont en accord avec celles trouvées avec les méthodes d'ensemble. Les méthodes en molécule unique tiennent compte de la dispersion et du comportement hétérogène de la population de ribosomes.

2.3.3 Etude détaillée *in vitro* de la cinétique de scanning des ribosomes eucaryotes de levure sur des ARNm coiffés en molécule unique

Dans ce paragraphe, nous allons présenter une étude en molécule unique *in vitro* avec le FRET couplé au ZMW qui a été faite récemment. L'observation de la dynamique de scanning avec le FRET a été faite au microscope

6. extrait cellulaire

TIRF. Les auteurs de cette étude ont déterminé la vitesse de scanning sur des ARNm coiffés avec des ribosomes eucaryotes de levure. Ils ont également observé l'influence de structures secondaires dans la zone 5'UTR sur la dynamique de scanning.

Résumé de cette étude en molécule unique *in vitro*

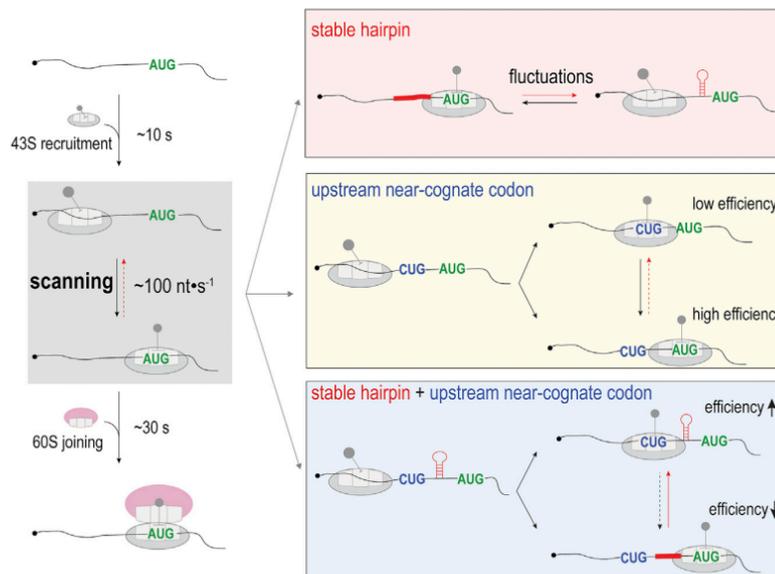


FIGURE 2.11 – Résultats de l'étude en molécule unique *in vitro* sur le scanning eucaryote sur des ARNm coiffés. Figure extraite de [Wang et al. 2022].

Les auteurs ont montré :

- Le suivi en temps réel de l'arrivée du PIC sur l'ARNm, le scanning de la région 5'UTR et le recrutement de la sous-unité 60S par le PIC.
- La mesure d'une vitesse de scanning *in vitro* autour de 100 nt/s avec des ribosomes de levure sur des ARNm coiffés (voir figure 2.11). Leurs résultats suggèrent que c'est l'arrivée de la sous-unité 60S qui est l'étape limitante de l'initiation (30s).
- L'observation du phénomène d'oscillations⁷ du PIC dans la direction de scanning lorsqu'une tige-boucle est insérée en 5'UTR. La fréquence de ces oscillations croît avec la stabilité de la tige-boucle.
- L'augmentation de la fréquence d'initiation sur un START proche-cognat avec la présence d'une tige-boucle en aval de ce START.

Cette étude a nécessité :

- de mettre en place une stratégie de fixation du système avec l'accroche des ARNm en 3' avec une biotine incorporée. L'avantage d'utiliser des ARNm ayant une biotine est que l'on sait que le système accroché à

7. On appelle "oscillations" les mouvements du PIC faisant des aller-retours dans la région 5'UTR.

la surface est forcément de l'ARNm de manière spécifique. Cependant, le rendement de la synthèse des ARNm avec une biotine est très faible.

- de mettre en place une stratégie de marquage bien spécifique des différents acteurs (ribosome, ARNt, et ARNm) pour la mesure avec deux paires de FRET. Notons que la stratégie de marquage direct du ribosome et des ARNt nécessite de connaître avec précision les structures marquées et leur emplacement de manière très spécifique.
- d'utiliser la méthode du FRET afin de connaître avec précision l'arrivée de la petite-sous-unité sur l'ARNm pour la mesure de la vitesse de scanning et de l'arrivée de la grande sous-unité 60S. Remarquons la complexité de cette étude par le fait que l'on a une seule voie d'excitation et quatre voies de détection. De plus, soulignons le degré de complexité de cette méthode de mesure sur la détection des signaux des différents marqueurs qui ont des longueurs d'ondes assez proches. L'analyse des données sera donc laborieuse pour en extraire la cinétique.
- d'utiliser le ZMW afin de travailler avec de fortes concentrations tout en restant en condition de molécule unique afin de voir plusieurs systèmes biologiques qui scannent en parallèle.

Observation du scanning et du recrutement de la grande sous-unité avec deux paires de FRET

Pour l'étude du scanning, ils ont utilisé deux paires de FRET. Les auteurs ont utilisé différents marquages (voir figure 2.12 B) :

- le PIC 43S avec les marqueurs Cy5 sur uS5 (en rouge) et Cy3.5 sur uS19 (en jaune).
- l'ARNm avec l'hybridation d'un oligo avec Cy3 en 3' (en vert).
- la grande sous-unité 60S avec le marqueur Cy5.5 sur uL18 (en violet).

Notons que ces stratégies de marquage direct du ribosomes ont nécessité de connaître avec précision les protéines marquées (uL18, uS19 et uS5) et leur emplacement dans le ribosome de manière très spécifique.

L'ARNm marqué est attaché en 3' avec une biotine au ZMW et celui-ci sera excité par le LASER vert de leur TIRFm. Le recrutement du PIC 43S par la coiffe est observé par l'apparition du signal de Cy3.5 en jaune (voir figure 2.12 A-C). Lorsque le PIC 43S scanne la région 5'UTR, on observe du FRET entre Cy3 (en vert) et Cy5 (en rouge). Le recrutement de la grande sous-unité 60S par le PIC 48S est mis en évidence par le FRET entre Cy3.5 (en jaune) et Cy5.5 (en violet).

Les auteurs ont fait cette expérience sur des ARNm ayant différentes tailles de la région 5'UTR (voir figure 2.12 D-E). Ils ont d'abord montré que le scanning s'effectue à la même vitesse peu importe la taille de la région 5'UTR : 145 nt/s (avec un intervalle de confiance à 95% allant de 96-297 nt/s). Par ailleurs, la dépendance linéaire de la vitesse de scanning en fonction de la taille de la région 5'UTR montre que le scanning se fait globalement de 5' à 3'. De plus, un autre résultat intéressant dans leur étude est l'arrivée de la grande sous-unité 60S sur le PIC 48S qui dure globalement 30s.

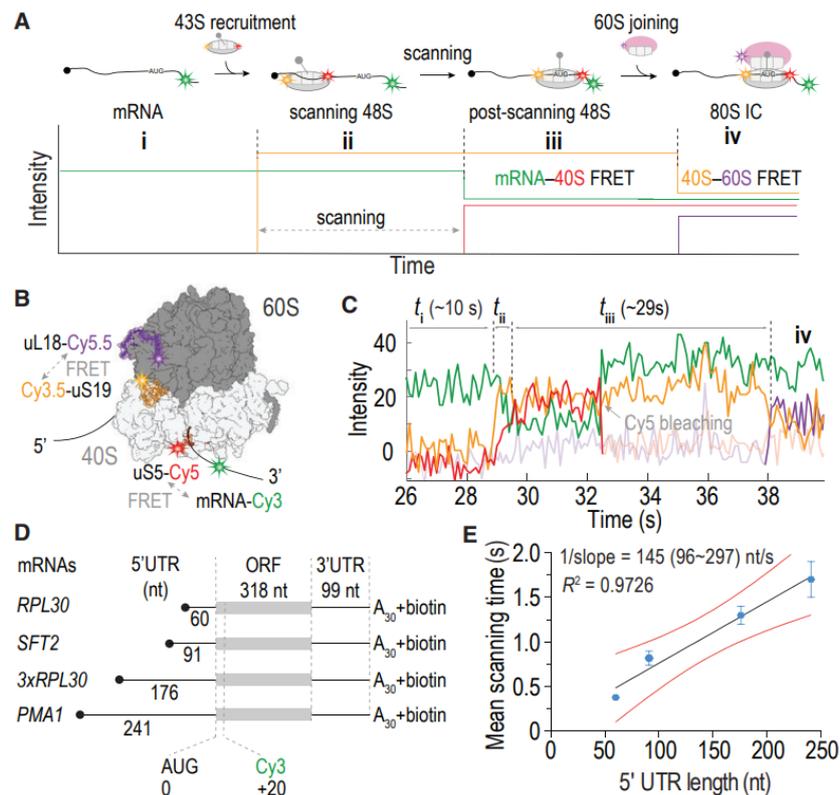


FIGURE 2.12 – Etude en molécule unique du phénomène de scanning sur des ribosomes eucaryotes avec deux paires de FRET (détection à quatre couleurs).

A- Schéma du système rapporteur pour détecter le scanning. Le recrutement du PIC 43S est observé par la détection du signal de Cy3.5 (en jaune). Le scanning est détecté par le FRET entre Cy3 sur l'ARNm (en vert) et Cy5 se trouvant sur le PIC (en rouge). Cy3 est accroché en aval du codon START. Le recrutement de la grande sous-unité 60S par le PIC 48S est observé par le FRET entre Cy3.5 (en jaune) et le Cy5.5 (en violet).

B- Schéma du complexe d'initiation. Les différents sites de marquage sont représentés pour l'étude.

C-Exemple de traces d'intensité de fluorescence dans les différents canaux.

D- Différents ARNm avec des longueurs des régions 5'UTR qui varient.

E- Graphique montrant l'évolution du temps de scanning moyen en fonction de la longueur de la région 5'UTR. Résultats obtenus à partir des échantillons de tailles $n=105, 167, 138$ et 114 (de haut en bas).

Figure extraite de [Wang et al. 2022].

Influence d'une tige-boucle en 5'UTR sur la dynamique de scanning

Les auteurs ont cherché à observer l'effet d'une séquence structurée (une tige-boucle) dans la zone 5'UTR (voir figure 2.13-a). Ils ont utilisé différentes tiges-boucles ayant des stabilités plus ou moins importantes. Par exemple, ils ont vu qu'une tige-boucle ($\Delta G = -52$ kcal/mol à 30°C à la position 60 nt de la 5' et 46 nt avant le codon AUG) induisait un ralentissement de 30% sur le scanning.

Une autre observation qui a été faite était les oscillations du PIC lors du scanning en fonction de l'emplacement et de la stabilité de la tige-boucle en 5'UTR (voir figure 2.13 B- C). Si la tige-boucle est proche du codon START (à moins de 6nt) une proportion importante de PIC effectue des oscillations. La fréquence moyenne de ces oscillations augmente avec la stabilité de la tige-boucle. De plus, l'efficacité de recrutement de la grande sous-unité 60S par le

PIC 48S décroît avec la stabilité de la tige-boucle (voir figure 2.13 D).

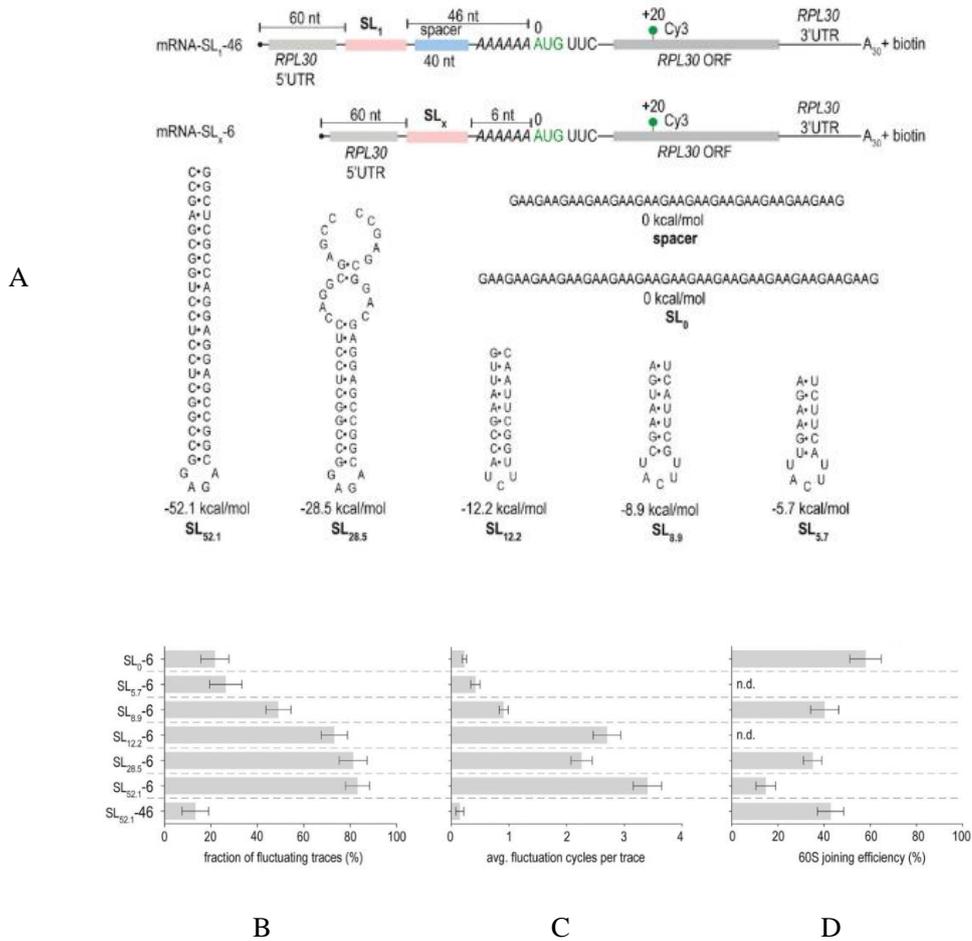


FIGURE 2.13 – Dynamique de scanning en fonction du type de tige-boucle insérée en région 5'UTR et de sa position.

A- Présentation des différents systèmes rapporteurs ayant des structures secondaires différentes en région 5'UTR.
 B- Proportion des traces présentant des oscillations du PIC pour chaque type de structure secondaire insérée en 5'UTR.

C- Nombre moyen d'oscillations du PIC par trace.

D- Efficacité du recrutement de la grande sous-unité 60S par le PIC 48S.

Pour B-C, l'étude a été faite sur des échantillons de tailles n= 184, 174, 336, 213, 166, 191 et 135 de haut en bas. Pour D, l'étude a été faite sur n= 205, 263, 502 et 280. SL₁ correspond à SL_{-51.2}. Figure adaptée de [Wang et al. 2022].

Influence de la tige-boucle sur les initiations sur un START proche-cognat

L'équipe a voulu voir l'effet de la tige-boucle sur les initiations sur un START proche-cognat⁸. Ils ont utilisé des ARNm coiffés contenant un START proche-cognat (CUG) et une tige boucle en 5'UTR qui est plus ou moins proche du codon START (voir figure 2.14-A). Ils ont mis en place des stratégies de marquage très sophistiquées pour avoir deux types de signaux de FRET en fonction du type d'initiation (voir figure 2.14-B). Cette fois-ci, ils ont marqué :

8. Un codon qui ne diffère que par une seule lettre avec le codon AUG. Ici, on a le codon CUG.

- la grande-sous unité avec Cy3 sur uL18 (en vert)
- l'ARNt-Phe avec Cy5.5 sur acpU47 (en violet)
- l'ARNt-Lys avec Cy5 sur acpU47 (en rouge)

Cette nouvelle stratégie de marquage permet de voir le premier cycle d'élongation (voir figure 2.14 C-D). En effet, si l'initiation se fait sur le START proche-cognat, on observera du FRET avec Cy3 (en vert) et Cy5 (en rouge). Dans la cas où l'initiation se fait sur le codon START, on verra du FRET entre Cy3 (en vert) et Cy5.5 (en violet). Les signaux obtenus par FRET ont permis de déterminer avec précision la proportion d'initiations faites sur le START proche-cognat et le codon START (voir figure 2.14 E). Ce résultat montre que plus la tige-boucle est stable et proche du START et plus le ribosome va préférer s'initier sur le START proche-cognat.

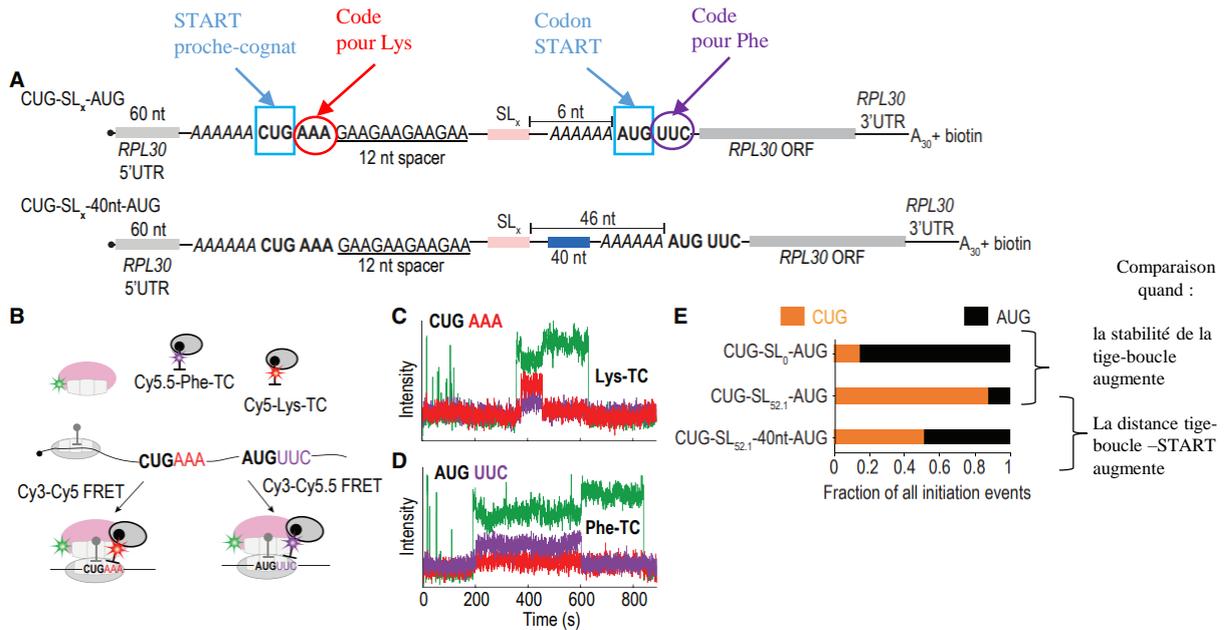


FIGURE 2.14 – Effet des structures secondaires (tige-boucle) sur les initiations sur un codon proche-cognat en 5'UTR.

A- Représentation des ARNm contenant un codon proche-cognat (CUG) et une tige-boucle en région 5'UTR proche ou loin du codon START.

B- Schéma des différents marquages.

C- Exemple de traces observées si l'initiation se fait sur CUG.

D- Exemple de traces observées si l'initiation se fait sur AUG.

E- Proportion des initiations sur le START proche-cognat par rapport au codon START avec les différents structures secondaires en 5'UTR. La taille des échantillons n= 608, 550, 725 et 532 (de haut en bas). Figure adaptée de [Wang et al. 2022].

Conclusion de l'étude et comparaison avec notre méthode de mesure

Cette étude de scanning en molécule unique a nécessité des stratégies de fixation de l'échantillon et différentes stratégies de marquage direct du ribosome et des ARNt. Cette méthode de marquage est très complexe à mettre en place puisqu'elle nécessite la connaissance précise des différentes structures des différents acteurs. Ils ont été contraints de travailler avec le ZMW afin de travailler avec de fortes concentrations en espèces marquées afin d'observer du signal. Une autre complexité technique est l'usage d'une seule voie d'excitation et de quatre voies de détection du signal pour le FRET. Il faut donc avoir les bons filtres d'émission et être capable de distinguer avec précision les différents signaux des marqueurs qui ont des longueurs d'ondes très proches (Cy3/Cy3.5 et Cy5/Cy5.5). L'analyse pour extraire la cinétique de scanning a dû être laborieuse bien que leurs résultats sont très prometteurs.

En comparaison, notre méthode de mesure en molécule unique nécessite le marquage uniquement de l'ARNm. C'est une stratégie de marquage moins invasive. On utilise une chimie de surface pour accrocher les ARNm à la surface de la lamelle du microscope. On est obligé de travailler avec des concentrations en espèces marquées de l'ordre du nM pour nos systèmes rapporteurs (ARNm) afin d'être en condition de molécule unique. Cependant, pour la mesure on peut injecter notre extrait cellulaire contenant les ribosomes à une concentration physiologique. Nous avons également deux voies d'excitation à des longueurs d'ondes bien différentes (638nm et 561nm) et deux voies de détection alternées. Avec notre méthode qui est plus simple à mettre en oeuvre, nous sommes également capable de mesurer d'une manière indirecte la vitesse de scanning des ribosomes eucaryotes et de voir l'effet d'une tige-boucle en région 5'UTR sur cette dynamique. Cependant, notre méthode ne permet pas d'observer en temps réel les oscillations du PIC.

2.4 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté l'intérêt des études en molécule unique pour la compréhension du phénomène de la traduction. Nous avons présenté les différentes méthodes d'observation des molécules uniques notamment la microscopie de fluorescence TIRFm. Puis, on a parlé des différentes stratégies de marquage possibles pour les études en molécule unique. En dernière partie, nous avons abordé les différents résultats de vitesses de cinétique de traduction mesurées au cours de ces dernières années.

Dans le chapitre suivant, nous présenterons en détails le montage optique TIRFm utilisé pour étudier le phénomène de scanning.

Chapitre 3

Description du microscope TIRF

Dans ce chapitre, nous présenterons le dispositif expérimental de microscopie de fluorescence en réflexion totale (TIRFm) qui a été entièrement conceptualisé par l'équipe avant mon arrivée. Le montage leur a permis de faire des études en molécule unique pour mesurer des vitesses de traduction [Barbier 2017][Bugaud et al. 2017]. Nous avons utilisé ce microscope TIRF pour notre étude de scanning eucaryote *in vitro* en molécule unique. Cependant, au cours de la thèse, nous avons apporté quelques améliorations techniques au système optique et à la cellule microfluidique que nous verrons dans ce chapitre.

Dans un premier temps, nous allons expliquer comment on prépare un échantillon pour notre étude en molécule unique. Puis, ensuite nous présenterons notre montage TIRFm avec les améliorations qui ont été faites.

3.1 Préparation de l'échantillon

Dans le chapitre précédent, nous avons abordé comment on observe les molécules uniques et les différentes stratégies de marquage pour les voir. Nous allons présenter dans cette section comment préparer l'échantillon biologique pour notre étude en molécule unique.

3.1.1 Préparation de l'ARNm

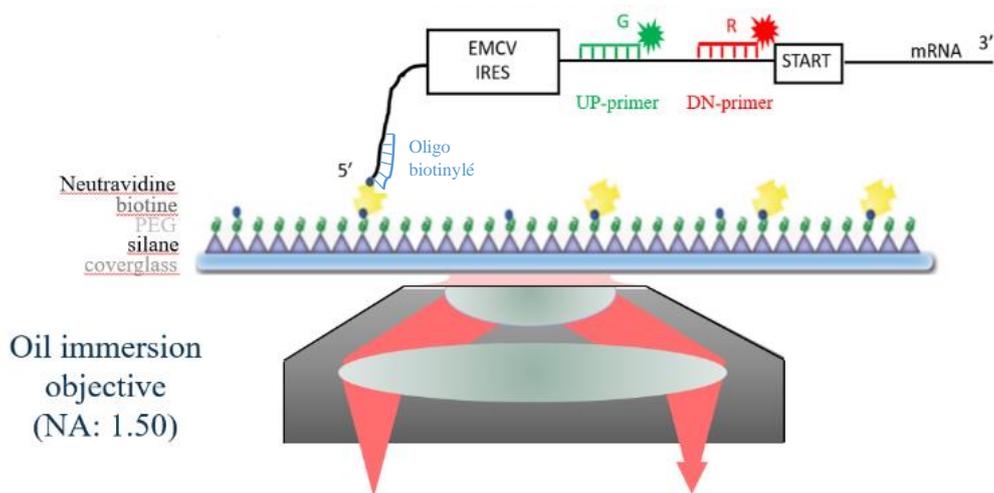


FIGURE 3.1 – Schéma d'un échantillon prêt pour une expérience en molécule unique avec le TIRFm. L'ARNm représenté contient une structure IRES EMCV. Cet ARNm a été hybridé à trois oligos : 2 oligofluorophores UP (en vert) et DN (en rouge) en 5'UTR et un oligo biotinylé en 5' (en bleu) qui permet l'accroche spécifique sur la neutravidine (représentée en jaune).

Nous avons choisi le marquage de l'ARNm par des sondes fluorescentes comme nous l'avons décrit au chapitre précédent. Deux oligonucléotides couplés à des fluorophores sont hybridés en région 5'UTR¹ (voir figure 3.1). Les oligofluorophores utilisés dans nos expériences sont couplés aux fluorophores ATTO647N et ATTO565 qui peuvent être respectivement excités par les LASER rouge et vert du montage (présentés dans la section suivante). Un autre oligo biotinylé est hybridé en 5' de l'ARNm. En effet, rappelons que le TIRFm nécessite que l'échantillon soit attaché à la surface de la lamelle du microscope où le champ d'ondes évanescentes pourra exciter les primers². Ainsi, cet oligo biotinylé va permettre à l'ARNm de s'accrocher de manière spécifique à la lamelle de microscope grâce à une chimie de surface.

1. Le protocole d'hybridation est donné en ANNEXE.
2. Le volume d'excitation du champ a une profondeur de pénétration d'environ 100 nm. Ce champ est idéal pour exciter les primers qui sont des objets nanométriques accrochés à la surface de la lamelle.

3.1.2 Chimie de surface

L'équipe a réfléchi à une chimie de surface pour avoir des accroches spécifiques de l'ARNm à la surface de la lamelle du microscope³. Cette chimie a deux objectifs principaux :

- La passivation de la lamelle pour empêcher des impuretés fluorescentes de venir s'accrocher de manière non spécifique. Ce phénomène dégraderait le rapport signal à bruit des signaux des molécules uniques.
- L'accroche spécifique et fiable de nos systèmes rapporteurs biologiques à la surface de la lamelle.

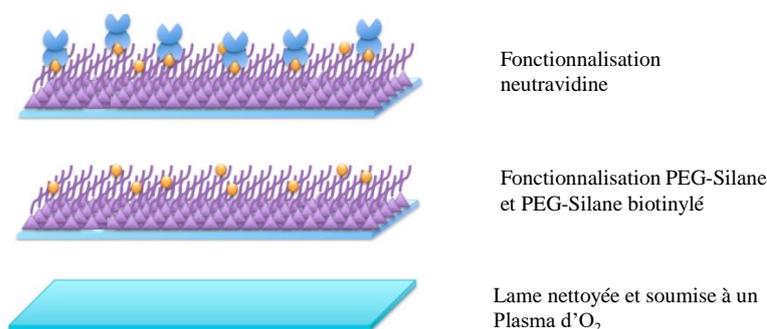


FIGURE 3.2 – Schéma descriptif des différentes étapes de chimie de surface (du bas vers le haut). Figure adaptée de [Barbier 2017].

étape 1 : Lamme nettoyée et passée au plasma cleaner O₂.

étape 2 : Passivation de la surface de la lamelle avec un mélange de PEG-Silane et PEG-Silane biotinylé.

étape 3 : Ajout de la neutravidine.

Dans un premier temps, la lamelle du microscope est nettoyée⁴ puis activée au plasma cleaner d'O₂ (voir figure 3.2). Le passage au plasma cleaner va activer les fonctions hydroxyles de la silice de la surface de lamelle de verre. La cellule microfluidique est montée juste après. On décrira la cellule microfluidique dans le paragraphe suivant. Puis, pour la passivation de la surface, on injecte un mélange de PEG-Silane et de PEG-Silane biotinylé dans la cellule microfluidique. Les fonctions silanes vont faire des liaisons covalentes avec les fonctions silanes activées de la lamelle. Les proportions de PEG-Silane et de PEG-Silane biotinylé ont été réfléchies de manière à avoir une passivation correcte et des sites biotinylés suffisants à la surface. On ajoute ensuite dans la cellule microfluidique de la neutravidine qui va former un complexe avec la biotine. Ces complexes neutravidine-biotine sont très stables et forment des sites d'accroches spécifiques pour l'ARNm.

3. Le protocole détaillé de la préparation de la chimie de surface est donnée en Annexe.

4. Processus de nettoyage des lamelles et le protocole du plasma cleaner sont aussi donnés en ANNEXE

3.1.3 Cellule microfluidique

Présentation

Lors de nos expériences, il nous faut un système microfluidique permettant :

- d'accueillir les systèmes rapporteurs.
- l'injection des tampons et des extraits cellulaires.

L'équipe a donc imaginé une cellule microfluidique compatible avec ses expériences en molécule unique TIRFm.

Cette cellule est constituée de (voir figure 3.3) :

- une lame de verre de microscope percée avec deux trous de 1 mm espacés de 4 cm. Les trous correspondent aux emplacements du réservoir et du tuyau pour l'injection.
- un scotch double face avec un canal de largeur de 2 mm espacé de 4 cm.
- une lamelle de verre.

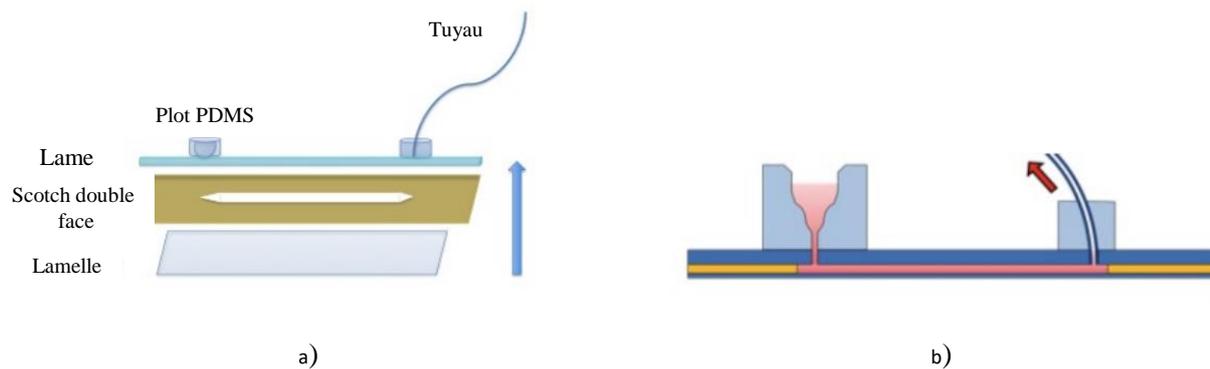


FIGURE 3.3 – Description d'une cellule microfluidique. a- Montage d'une cellule microfluidique. b- Injection dans la cellule microfluidique en aspirant le contenu du réservoir. Figure extraite de [Barbier 2017]

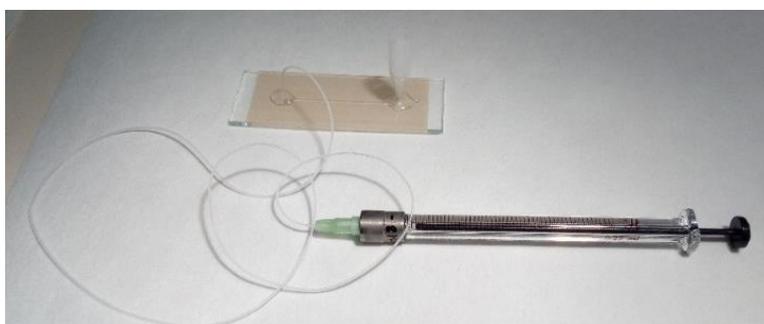


FIGURE 3.4 – Photo d'une cellule microfluidique assemblée.

Lorsque la cellule est assemblée, elle peut accueillir dans son réservoir les différents tampons, systèmes rapporteurs et l'extrait cellulaire. Le tuyau permet ainsi l'aspiration des solutions contenues dans le réservoir dans le canal formé par le trio lame-scotch-lamelle (voir figure 3.4).

Notons qu'une partie de cette cellule est réutilisable et qu'une partie sera démontée à la fin de chaque expérience (voir figure 3.3). La partie réutilisable comprend la lame de microscope percée avec deux trous. La partie qui sera démontée correspond au scotch double face et à la lamelle de verre où sera faite la chimie de surface pour l'accroche des ARNm. En effet, cette lamelle de verre doit être nettoyée et activée au plasma cleaner pour chaque expérience.

Durant la thèse, nous avons apporté des modifications sur la cellule microfluidique notamment au niveau du réservoir, du tuyau et du scotch que nous allons voir dans les paragraphes suivants.

Travail sur le réservoir

Les réservoirs utilisés étaient des embouts en verre provenant des pipettes pasteurs (voir image de la figure 3.4) fixés sur la lame avec de la colle époxy. L'un des inconvénients était l'accès au réservoir avec le cône de la pipette. En effet, les réservoirs étaient très étroits. Par ailleurs, il était difficile de remplir le réservoir avec l'extrait cellulaire sans avoir un fond de mélange dilué contenant du tampon.

On a donc tenté de modifier le réservoir. Nous avons d'abord pensé à utiliser des plots PDMS avec un trou en forme de cône pouvant contenir jusqu'à $50 \mu\text{L}$ ⁵. Ce plot est directement attaché à la lame au niveau du trou à l'aide du plasma cleaner. L'avantage de ces nouveaux réservoirs est qu'ils sont difficilement cassables et sont bien collés à la lame contrairement aux anciens réservoirs. Pour l'injection du RRL, il n'était pas toujours évident de s'en servir car le plot n'était pas très transparent.

Finalement, on s'est redirigé vers nos anciens réservoirs provenant des pipettes pasteurs. On a décidé de garder ces anciens réservoirs en verre mais d'utiliser la technique de joint avec le PDMS pour les maintenir au dessus du trou de la lame de verre. Ce joint PDMS fait un à deux mm d'épaisseur et est percé d'un trou de 1mm dans lequel le réservoir sera fixé. Avec cette méthode, on n'est plus gêné par le réservoir qui se retire au cours de l'expérience. Pour l'injection du RRL, on a fait le choix de maintenir un même niveau de fond du milieu pour chaque expérience. Ceci constituera nécessairement un biais expérimental lors de nos mesures sur l'arrivée du front du RRL.

Tuyau

Un autre changement qui a été effectué est le choix des tuyaux. On utilise des tuyaux que l'on va fixer sur le trou de lame avec un joint PDMS également. On utilise des embouts avec seringue que l'on met directement dans le tuyau. On n'a plus besoin d'utiliser de la colle époxy autour des embouts et du tuyau. Ce nouveau système de tuyau est plus facile d'utilisation pour l'opérateur.

5. Le protocole de la réalisation de ces plots PDMS est donné en ANNEXE.

Découpe au Laser

Au cours du projet de thèse, nous avons choisi de découper le canal avec un laser au FABLAB de l'école Centrale Supélec. Rappelons que lors d'une journée d'expérience, on peut réaliser jusqu'à 16 cellules. Couper manuellement du scotch avec une lame de rasoir peut prendre beaucoup de temps. Ainsi, l'avantage de la découpe au LASER est que c'est rapide, facile et pratique à utiliser.

Nous avons utilisé des logiciels pour la conception de la forme du canal avec différentes largeurs sur le scotch. En effet, nous voulons que l'arrivée du front de l'extrait cellulaire soit rapide afin de déterminer avec précision son instant d'arrivée qui va correspondre à notre instant initial de la prise de mesure des cinétique de départs. Ainsi, nous avons essayé des canaux de différentes largeurs : 1mm, 2mm et 4mm. Le canal de 4 mm n'était pas idéal puisqu'on observait des défauts dans la chimie de surface (des zones qui ont séché). Les canaux de largeur de 1mm et 2mm étaient de bons candidats où le front du RRL arrivait (environ en 500 ms sur la zone d'observation) mais il était difficile de coller avec précision sur la lame de verre le canal de 1mm. Donc, on a préféré faire nos expériences avec des scotch ayant des canaux de 2mm de largeur.

Après avoir monté les cellules microfluidiques et réalisé la chimie de surface, on peut désormais injecter nos systèmes biologiques rapporteurs. Rappelons que la concentration en systèmes rapporteurs doit respecter les conditions d'observation en molécule unique. L'ARNm va venir s'accrocher de manière spécifique à la neutravidine avec la fonction biotine de l'oligo biotinylé hybridé en 5' (voir figure 3.1).

3.1.4 Positionnement de l'échantillon avec le porte-échantillon

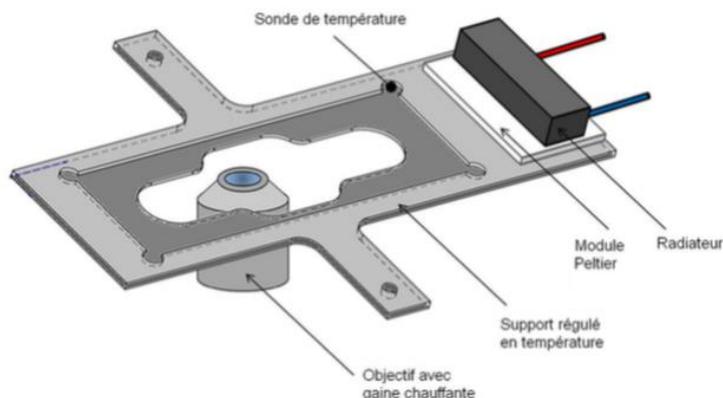


FIGURE 3.5 – Schéma descriptif du porte échantillon réglable en température et du chauffage de l'objectif. Figure extraite de [Barbier 2017]

Une fois que notre échantillon biologique est prêt dans la cellule microfluidique, celui-ci sera installé sur un porte échantillon (voir figure 3.5). Ce porte-échantillon est fixé sur une platine de micro et nano positionnement. On peut déplacer l'échantillon manuellement par rapport à l'objectif du microscope afin de voir une nouvelle zone d'observation à la caméra.

3.1.5 Contrôle et maintien de la température du milieu

Le RRL est un extrait cellulaire dont l'efficacité est optimale à 30 °C. Il faut donc chauffer le milieu de manière homogène à cette température. Pour ce faire, l'équipe a mis en place deux systèmes pour la régulation et le maintien de la température :

- un module Peltier qui est intégré au porte-échantillon.
- une bague chauffante placée autour de l'objectif pour le chauffage de l'échantillon.

Ces deux systèmes permettent de maintenir la température de l'échantillon à 30 ± 1 °C au cours de toute l'expérience.

Ainsi, nous avons présenté comment on prépare un échantillon pour notre étude en molécule unique avec le TIRFm. Nous allons voir dans la section suivante la présentation du montage optique avec les améliorations effectuées au cours de la thèse.

3.2 Présentation détaillée de notre montage TIRFm

3.2.1 Le montage optique TIRFm

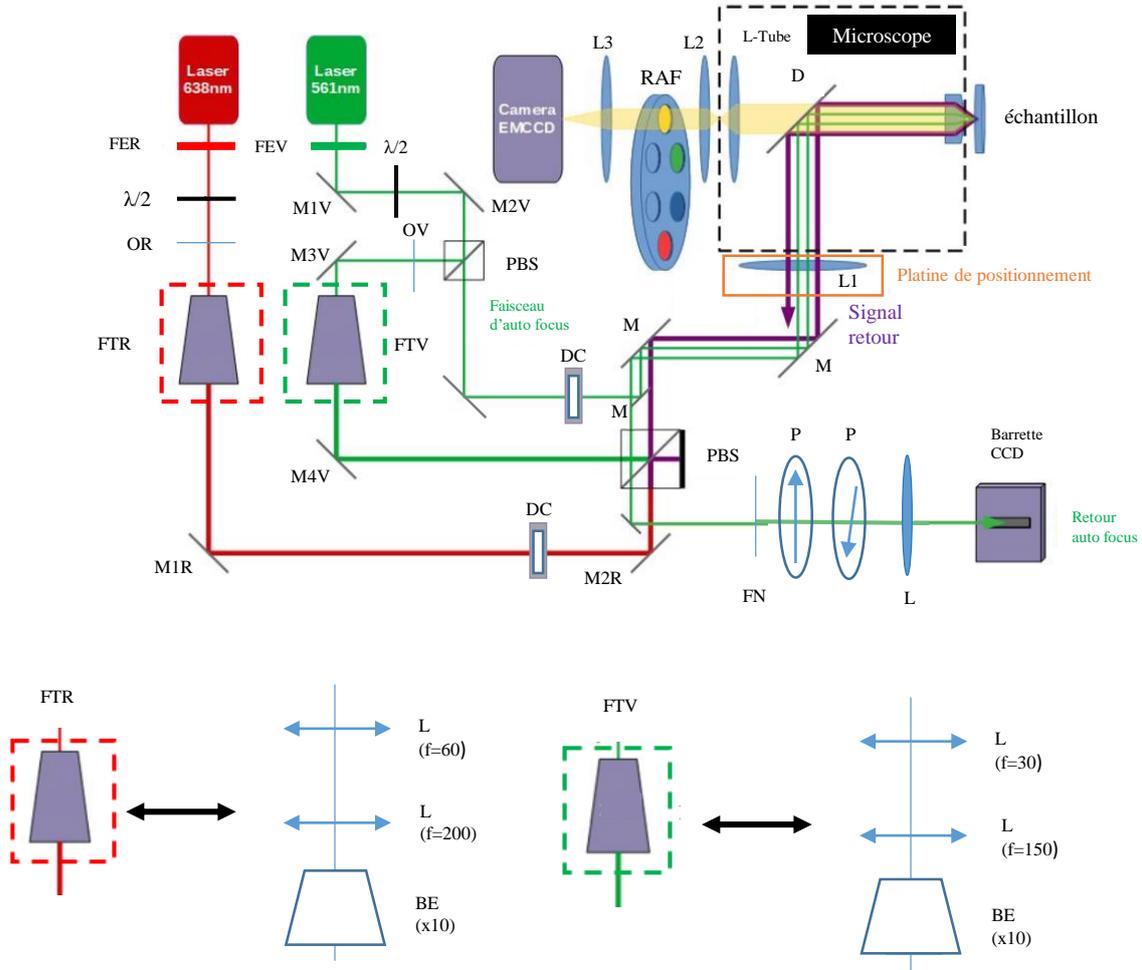


FIGURE 3.6 – Montage optique TIRFm. FE = filtre d'excitation (R = rouge, V=vert), M = miroir, D = miroir dichroïque, DC = Diaphragme carré, FT = FLAT Top, PBS = cube séparateur en polarisation, L = doublet de lentilles, L-Tube = lentille de tube, BE = beam expander, P = polariseur, FN = Filtre Notch, RAF = roue à filtres pour les filtres d'émission, O = Obturateur et $\lambda/2$ = lame demi-onde. Les focales des doublets L1, L2, L3 sont respectivement en mm 300, 100 et 100. La partie FT (rouge/verte) est représentée plus en détails en bas. Le FT pour les deux couleurs est constitué d'un télescope (de grossissement X3.3) et d'un BE (de grossissement X10). Le FT est l'équivalent d'un télescope final de grossissement x33.3.

Deux voies d'excitation

Nous voulons exciter les fluorophores (ATTO 647N et ATTO565) du système rapporteur avec deux LASER dont la longueur d'onde est proche de la longueur d'onde d'excitation des fluorphores.

Dans le montage qui existait avant mon arrivée, l'équipe a utilisé un LASER rouge Cobolt 06-MLD qui émet à 638 nm et un LASER vert LBX-532-50 d'Oxxius à 532 nm. Ces deux LASER sont continus et polarisés linéairement. Notons qu'au cours de ma thèse, on a remplacé le LASER vert par un autre LASER vert LBX-561 d'Oxxius. Ce LASER vert a une longueur d'onde plus proche de la longueur d'onde d'excitation des fluorophores ATTO565. Ainsi, on a réussi à obtenir des signaux verts ayant un meilleur rapport signal à bruit en changeant de LASER.

Le montage est présenté à la figure 3.6. Les deux faisceaux en sortie de chaque LASER font initialement 0.7 mm de diamètre. En sortie de chaque LASER, un filtre passe-bande sélectionnant une bande de 10nm autour de la longueur d'onde souhaitée est installé. Les faisceaux rouge et vert seront élargis avec un système télescope FLAT Top (FT) ayant un grossissement de x33.3. Les FT ont été intégrés au montage optique lors de ma thèse et on expliquera plus en détails le principe de leur fonctionnement un peu plus loin. Ces deux faisceaux élargis vont suivre des chemins différents. Uniquement le centre de chaque faisceau élargi avec un diaphragme carré (DC) est envoyé au niveau du cube séparateur en polarisation (PBS) où ils seront recombinaés. Ces faisceaux sont collimatés et renvoyés grâce à deux miroirs qui vont permettre de régler l'angle d'incidence sur la lentille L1. Celle-ci focalise les faisceaux dans le plan focal arrière de l'objectif. Entre L1 et l'objectif, un miroir dichroïque D permet de séparer les photons d'excitation et ceux issus de l'émission par les fluorophores. Rappelons que l'objectif est à immersion dans l'huile et a une grande ouverture numérique ($ON=1.50$, grandissement x60, Olympus) parfaite pour le TIRFm. On aura une gamme d'angles de plus d'une dizaine de degrés pour l'angle d'incidence du faisceau incident pour être en réflexion totale (voir chapitre précédent). Pour le réglage fin de l'onde évanescente on fait varier légèrement l'angle d'incidence (avec la platine de positionnement de la lentille L1) jusqu'à ce que le rapport signal à bruit sur l'image observée avec la caméra nous convienne.

Détection du signal

Le champ d'ondes évanescentes créé à la surface va exciter uniquement les particules se trouvant dans le fin volume d'excitation avec une profondeur de 100 nm. Les marqueurs présents dans ce volume vont émettre à leur tour des photons grâce au phénomène de fluorescence. Ces photons d'émission sont collectés par la voie de détection qui est représentée sur la figure 3.6 en jaune. Un autre avantage d'utiliser un objectif à grande ON est de pouvoir collecter un maximum de photons d'émission. Le miroir dichroïque D (Chroma ZT405/488/561/640rpcv2-UF1) renvoie les photons d'émission sur la lentille tube (L-Tube). Cette lentille va focaliser le faisceau dans le plan focal objet de la lentille L2. Les lentilles L2 et L3 forment un télescope de grossissement x1. Entre ces deux lentilles le faisceau passe par une roue à filtres (RAF). Cette RAF contient les filtres d'émission correspondant aux fluorophores utilisés⁶ et elle est commandée par l'ordinateur avec un programme Labview. Nous utilisons comme filtres d'émission : chroma HQ665lp (pour le rouge) et chroma HQ610/75 (pour le vert). Puis la lentille L3 permet de focaliser le faisceau d'émission sur une caméra EMCCD (Electron Multiplying Charge Couple Device, Ixon 897,

6. On retire éventuellement toute trace de photons d'excitation résiduels qui ont pu passer à travers le dichroïque D.

Andor). La caméra va enregistrer des images de 512x512 pixels correspondant à une zone d'observation carré sur l'échantillon de côté $100\mu\text{m}$.

3.2.2 Excitation FLAT Top

Rappelons que lors de nos expériences, on est confronté au problème de photoblanchiment qui est une source de bruit parasite pour nos mesures. Avant mon arrivée, l'équipe utilisait les deux faisceaux d'excitation gaussiens qui étaient légèrement élargis pour exciter les fluorophores comme on peut le voir sur la figure 3.7.

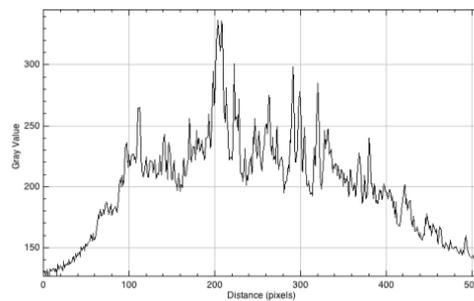


FIGURE 3.7 – Profil spatial (en niveaux de gris) sur une section horizontale (en pixels) sélectionnée au centre d'une image TIRFm type rouge avant l'installation des FLAT Top. Figure adaptée de [Barbier 2017].

On peut clairement voir que l'éclairement de la zone d'observation n'est pas complètement homogène. Les particules au centre du faisceau sont plus éclairées que celles du bord. Le photoblanchiment dépend de la puissance d'éclairage qui est pas identique sur toute l'image. On se retrouve dans un cas de figure où le nombre de faux positifs liés au photoblanchiment est plus important au centre du faisceau.

Au cours de ma thèse, nous avons réfléchi à ce problème. Afin de s'affranchir de cette inhomogénéité de l'éclairage, nous avons pensé à installer des systèmes télescopes "FLAT Top" (d'un grossissement $\times 33.3$) sur chaque voie d'excitation. Chaque FT est constitué d'un télescope d'un grossissement $\times 3.33$ et d'un élargisseur de faisceau (BE) d'un grossissement $\times 10$ (voir figure 3.6). Le principe consiste à élargir fortement le faisceau gaussien et à éclairer la zone d'observation uniquement avec le centre du faisceau qui a une intensité quasi-homogène. On sélectionne le centre élargi avec des diaphragmes carrés (DC) de taille adaptée.

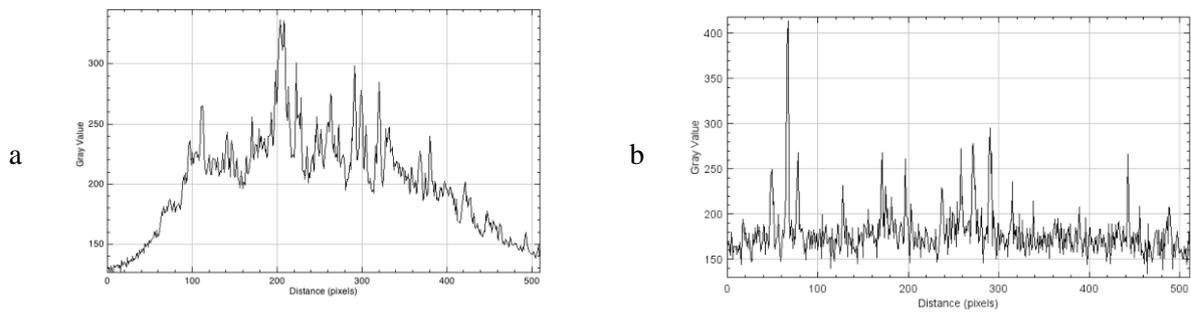


FIGURE 3.8 – Profil spatial (en niveaux de gris) sur une section horizontale (en pixels) sélectionnée au centre d'une image TIRFm type rouge : a- avant l'installation des FLAT Top ; b- après l'installation.

Ainsi, nous avons donc réussi à obtenir un éclairage homogène sur toute la zone d'observation (voir figure 3.8 b). On voit que les pics représentant des molécules uniques ont une "hauteur" quasi-similaire. Le fond est à la même hauteur sur toute une section horizontale passant par le centre de l'image. Ainsi, le taux de photoblanchiment est le même sur toute la zone.

3.2.3 Acquisition du signal

Nous avons présenté le montage optique et nous allons désormais parler des composants importants pour l'acquisition du signal.

Maintien de la mise au point

Lors de l'acquisition, il est important de maintenir la mise au point au cours de toute l'expérience. Ainsi, l'équipe a mis en place un système de rétro-action sur la mise en point dans chaque couleur. En effet, la profondeur de champ de l'objectif est d'une centaine de nm donc la mise au point peut varier très facilement. De plus, l'injection de l'extrait cellulaire peut entraîner une perte de la mise au point.

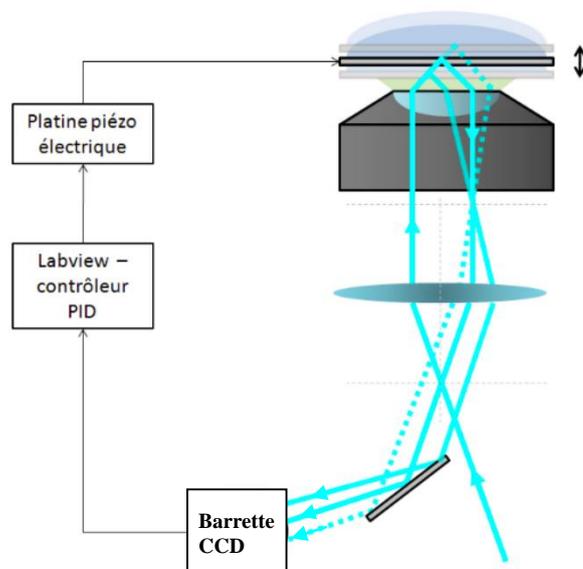


FIGURE 3.9 – Trajet du faisceau sonde réfléchi sur l'échantillon et boucle de rétroaction sur la mise au point appelée PID (auto-focus). Figure extraite de [Fizman 2013].

Le système permettant de faire la mise au point est constitué d'une partie du faisceau vert avant son élargissement qui est prélevée grâce à un cube séparateur en polarisation (voir figure 3.6). Ce faisceau "sonde" est réfléchi par trois miroirs et envoyé dans l'objectif avec un angle d'incidence supérieur à l'angle critique limite. Le faisceau sonde est donc totalement réfléchi et suit un trajet retour identique à l'aller. Le faisceau sonde retour est intercepté par un petit miroir qui l'envoie (voir figures 3.6) :

- sur un filtre réjecteur de bande (FN) qui permet de couper le faisceau rouge qui a pu passer.
- un premier polariseur P qui sélectionne la bonne polarisation correspondant à celle du faisceau sonde.
- un second polariseur P afin de diminuer l'intensité.
- une lentille qui permet de focaliser sur la barrette CCD.

Le décalage du chemin optique entre l'aller et le retour dépend de la distance entre l'objectif et la lamelle. Cette différence de marche se traduit par un décalage du faisceau sonde sur la barrette CCD (voir figure 3.9). Un programme Labview permet de mesurer l'intensité et de calculer la position du faisceau sonde sur la barrette CCD. Ce décalage peut être mesuré grâce à une consigne. Dans le programme Labview, une boucle de rétroaction (PID) est mise en place pour corriger ce décalage afin de maintenir la mise au point. Pour ce faire, une rampe de tension de 3V est générée sur la platine piézo-électrique qui va balayer une distance de $3\mu\text{m}$ en Z (voir figure 3.9). Pour chaque valeur de la position de la platine, la valeur de la position sonde est enregistrée. Il faut que la relation entre ces deux grandeurs soit linéaire sur cette plage de valeurs pour que l'on ait une bonne rétro-action. Puis, une valeur de consigne de la position du faisceau est définie dans chaque couleur. Dès lors que la boucle de rétro-action est mise en marche, si la valeur mesurée est différente de la consigne une commande sera donc envoyée à la platine de positionnement de l'échantillon pour ajuster sa position afin de maintenir la mise au point.

Présentation du séquenceur

Afin de limiter le photoblanchiment pour notre mesure, les molécules ne seront pas éclairées en continu. En effet, ce sont des séquences d'images qui sont réalisées. Entre deux images consécutives, l'échantillon n'est pas éclairé et ceci est rendu possible grâce au séquenceur. Cet outil a été mis en place par l'équipe afin de piloter de façon très synchronisée les deux voies d'excitation avec les obturateurs, la caméra et la RAF (voir figure 3.6). Les deux LASER sont allumés en continu et un obturateur commandé numériquement par le séquenceur va laisser ou non passer le faisceau d'excitation sur chaque voie. La RAF reçoit une commande de tourner et de mettre en place le bon filtre d'émission (en 600ms) en fonction de la longueur d'onde d'émission. La caméra prend la photo uniquement au moment où l'on désire enregistrer l'image (voir figure 3.10).

Séquence temporelle d'acquisition

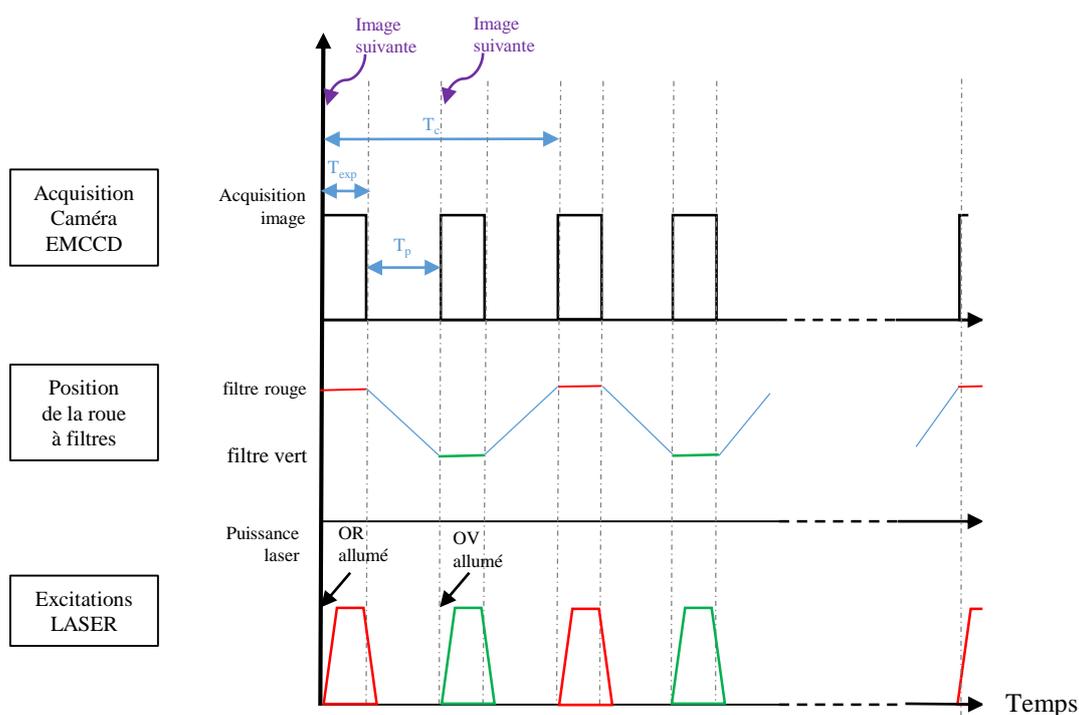


FIGURE 3.10 – Exemple de séquence temporelle d'acquisition Rouge-Vert RV des images TIRFM. OR = Obturateur rouge, OV = Obturateur vert, T_c = temps de cycle, T_{exp} = temps d'exposition et T_p = temps de pause.

Ainsi, au cours de notre mesure en molécule unique, nous obtenons des films. Un film correspond à une multitude de séquences temporelles d'acquisition. En effet, une séquence temporelle d'acquisition correspond à une acquisition d'une image dans une couleur puis suivie d'une image dans l'autre couleur et avec un temps de pause entre ces deux images comme la séquence Rouge-Vert RV (voir figure 3.10). Cette sous-séquence se répète N fois pour faire le film final. Les temps d'acquisition sont de 100 ms dans chaque couleur afin d'avoir un bon rapport

signal à bruit. Le choix du temps de cycle T_c a été optimisé de façon à observer le phénomène biologique tout en limitant le photoblanchiment. Nous réalisons des films de 200 images alternées dans les deux couleurs. En fonction, du temps de cycle T_c choisi, l'acquisition d'un film peut durer plusieurs minutes par échantillon.

Séquence temporelle "VVR" (Vert-Vert-Rouge) Au cours de la thèse, nous avons été confrontés à des problèmes de résolution temporelle pour observer certains phénomènes biologiques. En effet, nous devions observer des phénomènes qui étaient parfois longs comme l'effet d'une tige-boucle en région 5'UTR. Le temps de trajet entre les deux primers pour le ribosome pouvait donc être long. Donc, il a fallu mettre en place une stratégie pour ne pas que le photoblanchiment soit la principale cause des départs du second marqueur en position DN.

Nous avons donc mis place une séquence d'acquisition appelée VVR. L'idée était de mettre deux images vertes (marqueur UP) pour une image rouge (marqueur DN). L'opérateur choisit le temps entre deux images vertes T_{VV} et une image rouge va s'intercaler entre ces images vertes. Un cycle d'acquisition est constitué donc de deux images vertes et une image rouge (voir figure 3.11). Chaque image est prise avec une durée d'exposition $T_{exp}=100$ ms. Cette séquence VVR est répétée N fois au cours de l'expérience. On réalise des films de 210 images donc 70 cycles. L'acquisition de ces films peut durer plusieurs minutes.

Grâce à cette nouvelle séquence d'acquisition VVR, nous verrons dans le chapitre 5 comment nous avons pu observer certains phénomènes qu'on n'était pas capable de voir avec la séquence d'acquisition classique VR ou RV.

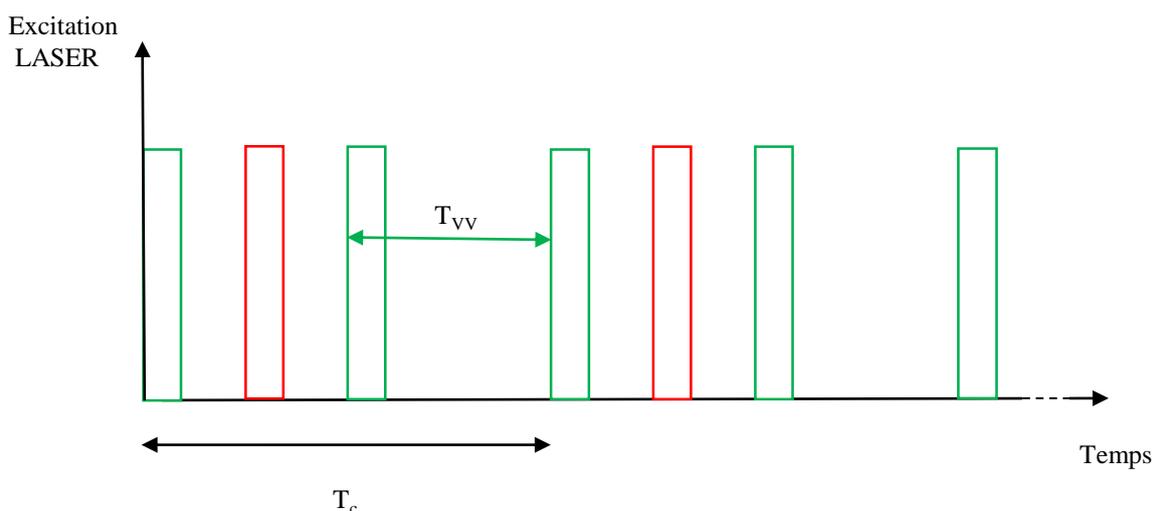


FIGURE 3.11 – Séquence temporelle d'acquisition VVR des images TIRFM. Chaque image est prise avec une durée d'exposition $T_{exp}=100$ ms. Un cycle VVR correspond à 2 images vertes avec une image rouge. Une image rouge est intercalée entre deux images vertes.

3.3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons vu comment on mesure la cinétique de scanning avec notre microscope TIRFm. Nous avons expliqué comment on prépare l'échantillon pour l'étude en molécule unique avec la préparation de l'ARNm, la chimie de surface, la cellule microfluidique, le positionnement de l'échantillon et le maintien en contrôle de la température. Puis dans une seconde partie, nous avons présenté le montage optique TIRFm avec les améliorations qui ont été effectuées (FLAT Top, séquence VVR).

Après l'acquisition des données, il va falloir les analyser pour en extraire la cinétique de départ des primers que nous allons voir en détails dans le chapitre suivant.

Chapitre 4

Traitement des données et extraction de la cinétique de scanning des ribosomes

Dans ce chapitre, nous montrerons comment on arrive à extraire les instants de départ des sondes UP/DN pour chaque brin d'ARNm à partir des films obtenus avec notre montage TIRFm. Lorsqu'une expérience de scanning ou de contrôle est effectuée nous obtenons des films de plusieurs centaines d'images alternées dans les couleurs rouges et vertes. En fonction des paramètres choisis lors de l'acquisition nous avons des films avec des durées de cycle bien prédéfinis. A partir de ces films, l'objectif est d'extraire la loi statistique sous-jacente décrivant la cinétique de scanning des ribosomes.

Dans une première partie, nous décrivons le principe du programme d'analyse de données. Ce programme IGOR PRO a été développé par Nicolas Fiszman[Fiszman 2013] lors de sa thèse dans l'équipe. Ce programme permet de traiter les films acquis. Les principes et fonctionnement du programme ont été détaillés et utilisés dans la thèse de Nathalie Barbier[Barbier 2017], ancienne doctorante de l'équipe, pour son étude sur la traduction en molécule unique. Je vais donc reprendre les points importants du code ici qui sont :

- le traitement des images du film par soustraction du fond
- détecter et dénombrer les molécules présentes sur une image
- comparer deux images prises dans des couleurs distinctes (rouge et vert) afin de repérer les fluorophores "colocalisés".

Ce programme sera également utilisé lors de ma thèse pour traiter mes données sur l'étude sur le scanning des ribosomes. Puis, dans une seconde partie on décrira le modèle mathématique qui a été mis en place pour l'analyse des données.

4.1 Traitement des films de TIRFm

Architecture du programme existant

Avant tout traitement des films bruts, un pré-traitement est effectué sur FIJI. En effet, chaque film alterné est découpé en un film vert et un film rouge. On appellera "film" une séquence d'images d'une seule couleur et on traite deux "films" (rouge ou vert) en parallèle avec le programme IGOR PRO. Ici, on détaillera les grandes étapes du programme informatique.

Lors de l'acquisition d'un film TIRFm, chaque pixel de la caméra percevra un bruit de fond et un signal de fluorescence d'un fluorophore si celui-ci est présent. Le programme d'analyse IGOR PRO effectue les opérations suivantes :

1. Soustraction du fond de fluorescence pour chaque image du film.
2. Détection de particules uniques avec le critère de la taille des taches donnée par la diffraction.
3. Analyse de l'intensité du signal de fluorescence de chaque particule en fonction du temps. En effet, une molécule unique a un profil d'intensité qui disparaît en une seule "marche", ou bien reste constante au cours du film.
4. Repérage des fluorophores verts et rouges co-localisés du film afin de calculer l'intervalle de temps entre les instants de disparition de chaque fluorophore.

Détection des molécules uniques

L'objectif est de détecter les molécules uniques présentes dans les films expérimentaux.

Cependant, l'inconvénient des données obtenues lors des expériences de scanning est que nous ne savons pas a priori quelle sera l'allure du film puisque :

- le fond peut dépendre de la qualité de préparation de l'échantillon.
- le nombre de molécules présentes sur la surface aussi.
- la statistique des instants de départ dépend du phénomène observé (traduction, photoblanchiment, action d'une nucléase,...) et d'autres paramètres comme la température par exemple.

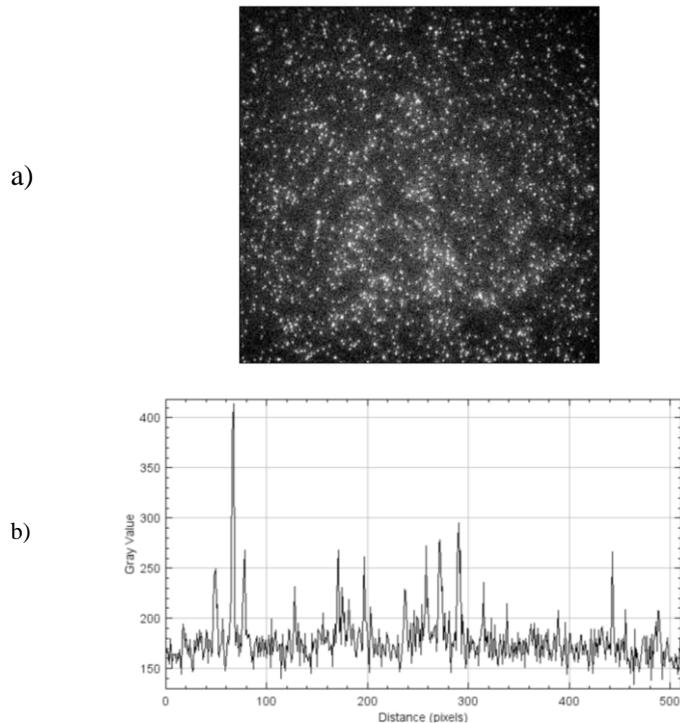


FIGURE 4.1 – a) Image TIRFm prise dans le rouge avec le montage Flat TOP. Paramètres d’acquisition du film : temps d’exposition $T_{exp}=100$ ms et durée de cycle $T_c= 1.4$ s.
 b) Profil spatial (en niveaux de gris) sur une section horizontale (en pixels) sélectionnée au centre de l’image a-

On a grandement optimisé la qualité de l’éclairement sur la zone d’observation de l’image en installant le montage FLAT TOP (décrit au chapitre 3). En effet, on arrive à obtenir des images où les particules sont excitées de manière quasi-uniforme (voir image 4.1 a-b). Cependant, nous préférons quand même effectuer les traitements d’images sur Fiji décrits dans les thèses de N.Barbier[Barbier 2017] et N.Fizman[Fizman 2013]. Bien que le montage optique a été amélioré, il est possible que le centre du faisceau gaussien soit légèrement excentré à l’entrée du FLAT Top. Ceci conduira à un éclairage des fluorophores pas complètement uniforme (voir figure 4.1 a-b).

Nous rappelons que le faisceau d’excitation LASER a un profil gaussien comme on peut le voir sur la figure 4.2 prise avant l’installation du montage FLAT Top. Généralement, il éclairera davantage les particules qui sont au centre que les particules situées aux bords. On voit cette non-uniformisation d’éclairement plus facilement sur l’image sans FLAT Top.

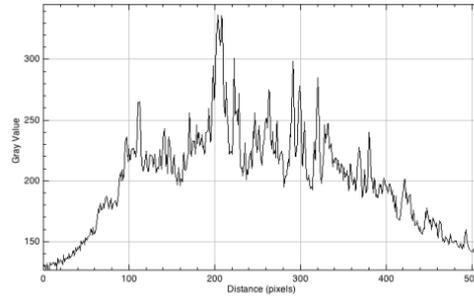


FIGURE 4.2 – Figure adaptée de [Barbier 2017]. Profil spatial (en niveaux de gris) sur une section horizontale (en pixels) sélectionnée au centre d'une image TIRFm dans le rouge issue d'un film d'acquisition type. Paramètres d'acquisition du film : temps d'exposition $T_{exp}=100\text{ms}$ et durée de cycle $T_c= 1.4\text{s}$. Film pris avant l'installation du montage FLAT Top.

Il y a un bruit de fond I_{fond} dû à la fluorescence résiduelle de l'échantillon (lamelle, molécules de la chimie de surface,...) qui peut être séparé en 2 composantes :

- une composante lentement variable spatialement qui correspond à l'enveloppe gaussienne du laser d'excitation. Elle correspond à la moyenne du fond en chaque point en (x,y) sur un voisinage local de 50 pixels . Elle est notée $\langle I_{fond} \rangle_{locale}(x,y)$
- une composante qui varie rapidement selon la position spatiale : celle-ci correspond à l'écart-type du fond σ_{Bf} . Elle est principalement due au bruit photonique (bruit de fluorescence parasite).

Notre objectif est de repérer les molécules uniques qui sont "immergées" dans ce bruit de fond de fluorescence et de détecter leur instant de départ avec précision.

4.1.1 Traitement de fond de fluorescence

Le programme permet de traiter les films. Il faut retirer le fond de fluorescence parasite et renormaliser chaque image des films pour mieux repérer tous les fluorophores qui nous intéressent. En effet, l'idéal serait d'avoir une intensité de fluorescence des particules des bords qui soit équivalente à celles des particules situées au centre de l'image.

Soustraction du fond de fluorescence par rolling ball

Pour soustraire le fond lentement variable on utilise une opération mathématique appelée Rolling Ball. Ce traitement a pour objectif de ramener le fond à une valeur nulle sur chaque image des films.

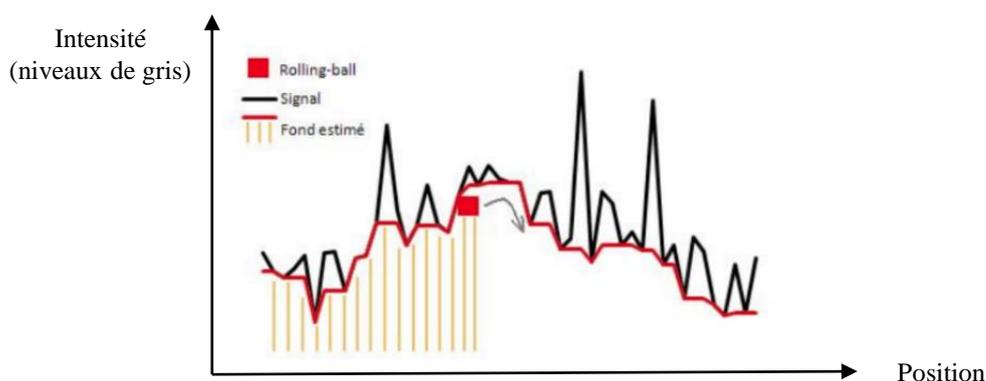


FIGURE 4.3 – Figure adaptée de la thèse de N.Fizman[Fizman 2013]. Schéma explicatif de la méthode du Rolling Ball à une fonction à une dimension. Un motif (carré rouge) est déplacé le long de la courbe. La surface balayée est considérée comme étant le fond de l'image que l'on pourra retrancher au signal. Dans le cas d'une image, ce principe est étendu dans les deux dimensions.

L'opération consiste à considérer l'image comme une surface sous laquelle on fait rouler une sphère d'un certain rayon (voir figure 4.3). Le choix de la taille de la balle est effectué pour que celle-ci ait un rayon assez petit pour décrire la forme générale de la surface à variation lente et assez grand pour ne pas considérer les fluctuations rapides. Il a été choisi un diamètre de 7 pixels pour la balle. La surface couverte par cette sphère peut être considérée comme le fond de fluorescence lent que l'on soustraira à l'image.

Cette opération de soustraction est effectuée sur chaque image des films (voir figure 4.4). Cependant, le bruit de fluorescence (le fond parasite à variation rapide) et les signaux des molécules uniques sont bien présents même après l'opération Rolling Ball. L'effet du Rolling Ball est bien plus perceptible dans le cas du faisceau gaussien. Notre montage FLAT Top nous donne une homogénéité de l'éclairage sur la surface d'observation. Les particules des bords et du centre semblent être excitées de la même façon.

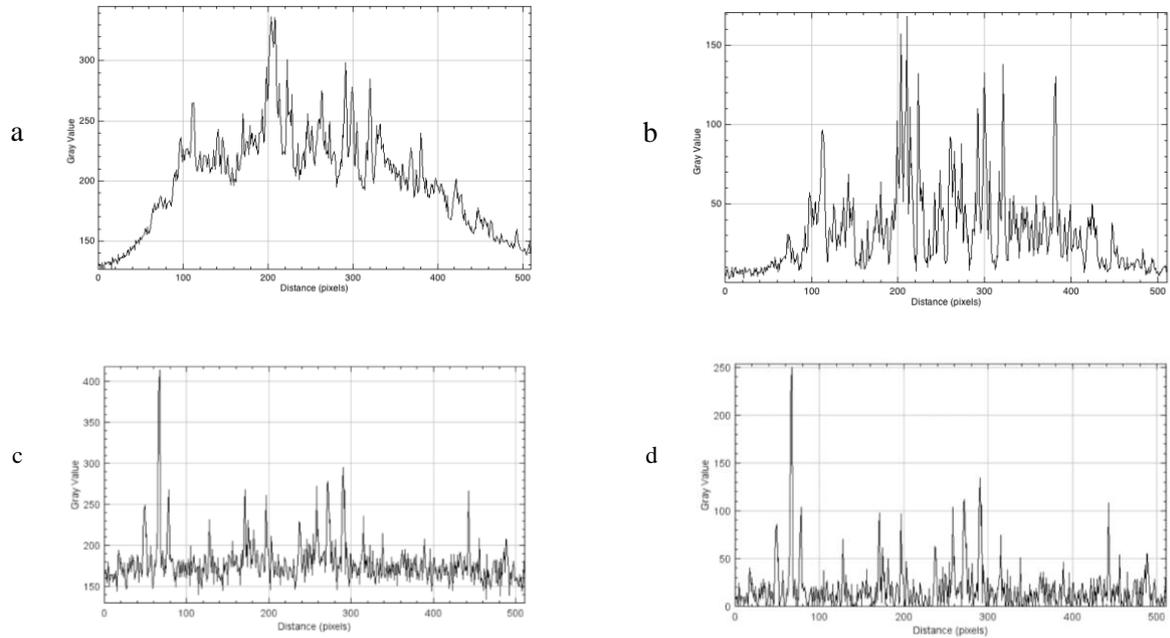


FIGURE 4.4 – Effet de l'opération de Rolling Ball sur le profil spatial (en niveau de gris) sur une section horizontale (en pixels) sélectionnée au centre d'une image TIRFm dans le rouge issue d'un film d'acquisition type avec un faisceau gaussien (a-b adaptées de [Barbier 2017]) et avec le montage Flat top (c-d).

a-c : avant l'opération Rolling ball

b-d : après l'opération Rolling ball

Paramètres d'acquisition du film : temps d'exposition $T_{exp}=100ms$ et durée de cycle $T_c= 1.4s$.

Renormalisation de l'image par soustraction du bruit de fluorescence

Pour expliquer l'intérêt de la renormalisation on va expliquer le principe sur l'image avec le faisceau gaussien car l'effet est plus visible. On voit d'après l'image 4.4 a-b que les fluctuations et l'intensité du bruit de fluorescence sont plus importantes au centre de l'image qu'au bord. Ceci est expliqué par l'excitation qui est gaussienne. En effet, les fluorophores seront plus excités au centre de l'image comparé au bord. Cependant, le bruit de fluorescence (provenant des impuretés, des oligos en excès dans le milieu ou de la fluorescence résiduelle du verre...) sera également plus important au centre puisqu'il dépend également de l'intensité d'excitation du LASER. Cette observation est bien cohérente avec l'éclairement qui n'est pas homogène sur l'image sans le montage FLAT Top. Le bruit rapide σ_{BF} en chaque position (x,y) de l'image est proportionnel à la racine carrée de l'intensité d'excitation $I_{excitation}$:

$$\sigma_{BF}(x, y) \propto \sqrt{I_{excitation}(x, y)}$$

Ainsi, une étape de renormalisation du signal en tenant compte de l'inhomogénéité de l'éclairement de l'image

sera effectuée. L'opération consiste concrètement à flouter chaque zone de l'image bruitée par zones de carrés de taille choisie. L'intensité $I(x,y)$ de chaque pixel de l'image bruitée est divisée par une intensité moyenne locale $\langle I_{fond} \rangle_{locale}(x,y)$ d'un carré de taille choisie :

$$\frac{I(x,y)}{\langle I_{fond} \rangle_{locale}(x,y)}$$

La division va écraser les pics qui sont au centre. Ce traitement permet de ramener les intensités des signaux des molécules fortement et peu éclairées à même niveau en s'affranchissant de l'intensité d'excitation. Ce procédé va permettre de rendre compte de l'inhomogénéité de l'éclairement.

Après cette étape de renormalisation, on se retrouve avec un fond résiduel σ_{BF} qui fluctue peu et qui est moins important. On peut par la suite repérer les molécules uniques avec des critères de détection. Dans notre cas, avec le montage Flat Top on avait déjà des signaux qui étaient à peu près à la même hauteur (voir figure 4.4 c-d). On décide quand même de faire cette étape de renormalisation qui n'est pas forcément nécessaire. A partir de ce traitement d'images, on peut extraire désormais les informations de cinétique.

4.1.2 Extraction des instants de disparition des sondes fluorescentes

L'obtention de la cinétique de départs des marqueurs à partir des films traités se fait en plusieurs étapes :

- la détection des fluorophores par une opération de seuillage
- le critère de taille des molécules
- l'obtention et la sélection des molécules "uniques" à partir de leurs traces temporelles en intensité
- le critère de "colocalisation" des molécules uniques rouges et vertes

Détection des molécules uniques par opération de seuillage

L'opération de renormalisation des signaux a permis de ramener à la même échelle le niveau des pics du centre et des bords. Ainsi, on s'affranchit du niveau d'excitation du LASER en fonction la position de particule sur l'image. On peut désormais détecter les molécules uniques grâce à une opération de seuillage. En effet sur IGOR Pro, l'opérateur choisit une valeur de seuil d'intensité manuellement. Tout pixel qui a une valeur d'intensité supérieure à ce seuil sera retenu comme appartenant a une molécule unique. Cette valeur a été longuement étudiée par l'équipe lors de la thèse de N.Fizman [Fizman 2013]. En effet, il faut choisir une valeur adaptée qui permette de limiter les faux positifs tout en conservant un maximum de fluorophores intéressants pour notre étude.

Soulignons que l'opération de seuillage à elle seule n'est pas suffisante pour une détection optimale avec précision des fluorophores. Il faut donc un autre critère de sélection supplémentaire comme la taille des molécules uniques.

Critère de taille des molécules uniques

Il faut noter que l'image sur la caméra des fluorophores n'est pas ponctuelle. En effet, un fluorophore sera vu par la caméra comme une tache d'Airy dont le diamètre d est donné par :

$$d = 1.22 \frac{\lambda}{ON}$$

avec :

λ la longueur d'émission centrale des oligofluorophores

ON : l'ouverture numérique de l'objectif¹

Effectuons, un calcul d'ordre de grandeur avec les fluorophores utilisés dans notre montage. On utilise des ATTO 565 et ATTO 647N dont les longueurs d'onde d'émission centrale sont respectivement à 585nm et 664nm. Nous utilisons un objectif ayant une ON=1.50. L'image de la caméra correspond à une image de 512X512 pixels correspondant à une zone de 100X100 μm^2 sur l'échantillon. En effectuant le calcul avec la formule donnée, on trouve des valeurs de diamètre d de 476nm (dans le vert) et de 540nm (dans le rouge). Cela correspond pour notre dispositif expérimental à une tache de diamètre de 2-3 pixels pour les molécules uniques. Ainsi, dans le programme IGOR PRO sont sélectionnées les particules respectant ce critère de taille. Pour sélectionner les molécules "uniques", une étude des traces temporelles en intensité est également nécessaire.

Sélection des molécules uniques suivant l'évolution temporelle de l'intensité

Nous analysons l'évolution au cours du temps de l'intensité de chaque particule repérée et présente sur les deux premières images de chaque film pour confirmer qu'il s'agit bien de molécules uniques.

Rappelons qu'un émetteur fluorescent unique ne peut avoir que deux niveaux de fluorescence. Soit il absorbe un photon du laser d'excitation et se désexcite en réémettant un photon de fluorescence à une cadence dépendant de différents paramètres (comme la durée de vie de son état excité), ce qui correspond à un niveau excité ayant des fluctuations poissonniennes ou soit il est dans un état noir, et il ne fluoresce pas. Cette émission caractéristique nous a incitées à étudier les traces temporelles en intensité (voir les traces de la figures '4.5). En effet, les spots fluorescents détectés sur la première image peuvent avoir une intensité qui évolue suivant différents scénarios au cours du temps :

- Le scénario normal pour un jalon fluorescent hybridé à l'ARNm est un niveau de fluorescence stable puis une disparition brutale (en une image) de la fluorescence au moment du détachement par le ribosome. Ce même comportement est observé si la molécule photoblanchit, ou est détachée par une nucléase ou une hélicase. Bien entendu, ces cas ne peuvent pas être distingués du phénomène de scanning pur. Ils constitueront nécessairement des faux positifs lors de l'étude de l'intensité de fluorescence, mais ne peuvent pas

1. L'objectif du TIRFm a une ON=1.50 et un grandissement x60.

être modélisés, car ils sont indiscernables du scénario que nous cherchons à mesurer. Notre protocole expérimental de préparation des échantillons (environnement sans RNases, utilisation d'oligofluorophores moins sensibles aux nucléases présentes dans l'extrait cellulaire ...) et de la prise de données (intensité d'excitation faible pour limiter au maximum le photoblanchiment) permettent de maintenir un niveau relativement faible de ces faux positifs.

- Les particules peuvent aussi clignoter : extinction de la particule pendant plusieurs images du film puis elles se rallument.
- Il se peut que 2 particules fluorescentes soient situées au même endroit : donc lorsqu'on regarde leur traces temporelles en intensité, on observe plusieurs ruptures.
- La particule peut aussi être un agrégat. Dans ce cas, l'intensité n'évolue pas par paliers, mais de façon continue selon le blanchiment d'un des nombreux contributeurs au signal.

Pour notre étude sur le phénomène de scanning en molécule unique, on garde uniquement les molécules qui ne meurent pas ou qui meurent en une seule étape bien franche².

Nous avons pu repérer les molécules uniques dans chaque film. Cependant, il faut savoir que le rendement d'hybridation des deux marqueurs UP/DN sur nos ARNm n'est pas de 100%. Il se peut qu'un ARNm ne contienne qu'un des deux oligofluorophores hybridé. Par conséquent, il faut mettre en place un autre critère pour sélectionner uniquement les brins d'ARNm qui contiennent les deux primers.

2. Les critères de sélection des molécules uniques en fonction de leur traces temporelles sont décrites dans la thèse de N.Fizman [Fizman 2013].

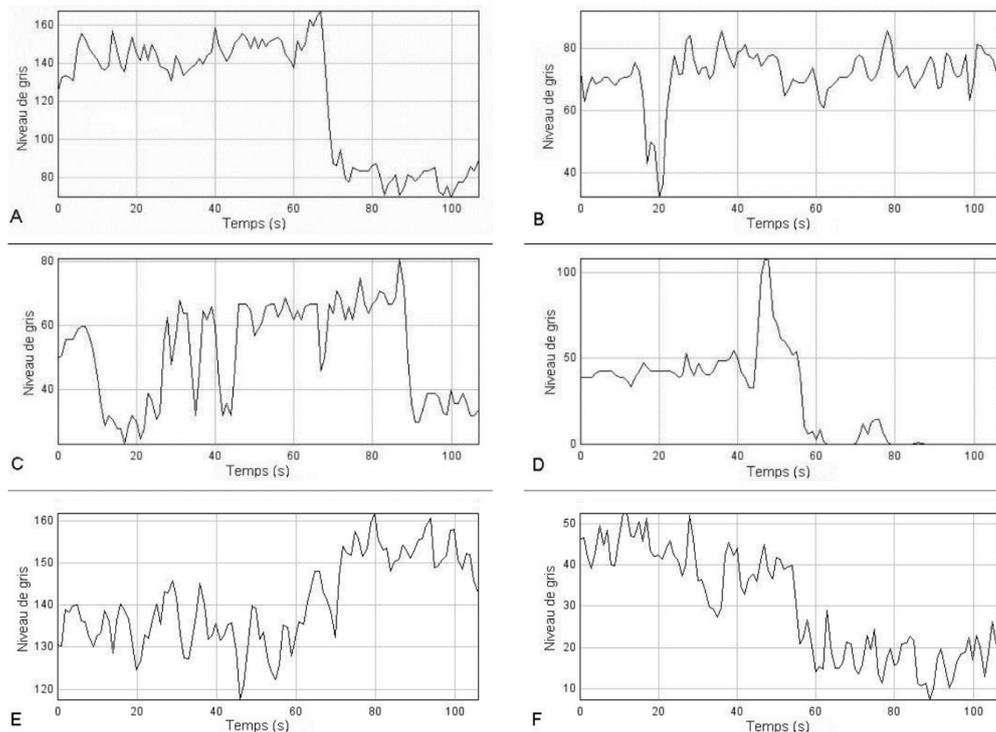


FIGURE 4.5 – Figure adaptée de la thèse de N.Fizman [Fizman 2013] donnant les traces temporelles de l'intensité de l'intensité correspondant à un fluorophore sur une centaine d'images.

A : Courbe montrant un profil canonique c'est-à-dire que le fluorophore présent au début disparaît en une marche (vers 70s ici). Ceci illustre le comportement d'une molécule unique type.

B : Courbe montrant un fluorophore présent au début et qui disparaît temporairement (clignotement) à cause de l'état triplet (voir chapitre 2).

C : Courbe montrant un fluorophore qui clignote et blanchit à la fin

D : Courbe présentant deux paliers montrant probablement deux fluorophores très proches

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

F : Courbes décroissantes qui ne possèdent pas de marche franche ou bien des instants d'extinction possibles. Possibilité de voir cela sur un agrégat de fluorophores.

Critère de colocalisation des molécules uniques rouges et vertes

La colocalisation est un critère de distance où on considère que deux molécules uniques sont sur le même ARNm si la distance les séparant est inférieure à un rayon correspondant donc à 1-2 pixels³. Ainsi, on retient uniquement la sous-population des molécules uniques colocalisées dans les deux couleurs. En effet, la colocalisation est un indicateur fiable qui nous permet de nous intéresser uniquement aux potentiels ARNm contenant les marqueurs UP et DN.

Une fois que les films sont traités, on obtient les signaux de fluorescence des différentes molécules uniques. A

3. 2-3 pixels correspondent au diamètre de la tache d'Airy de la molécule sur la caméra.

partir des critères de sélection de molécule unique, on retient pour l'analyse finale une population de N_0 particules.

4.2 Analyse des instants de disparition pour extraire les cinétiques de scanning

A chaque particule N_i , on lui associera un instant de départ T_i . A partir de ces données, nous sommes capables de tracer la courbe de cinétique des instants de départs des molécules uniques colocalisées dans les deux couleurs.

4.2.1 Courbes de départs cumulés

Présentation

A partir des instants de départs des N_0 primers, nous pouvons tracer la proportion des oligofluorophores n partis entre l'instant initial et l'instant t :

$$n(t) = \frac{N(t)^{UP/DN}}{N_0}$$

avec :

N_0 : nombre initial de molécules uniques colocalisées

$N(t)^{UP/DN}$: nombre de molécules uniques en UP ou DN parties entre l'instant initial et l'instant t

Nous appellerons cette courbe "courbe de départs cumulés". Elle nous renseigne dans un premier temps sur la cinétique de départs des marqueurs UP et DN.

Courbes de départs cumulés moyennés (DCM)

Dans une même journée, pour un même système rapporteur, l'expérience est répétée plusieurs fois. En effet, il est important d'avoir une statistique suffisamment importante pour le traitement des données. Ainsi, notre analyse de données sera basée sur plusieurs milliers de systèmes biologiques scannés (au moins 2000).

Pour chaque cellule traitée, on aura un film d'acquisition. Par conséquent, on obtiendra plusieurs courbes de départs cumulés pour les molécules colocalisées UP/DN. On retiendra uniquement les courbes obtenues à partir de cellules qui ont un taux de colocalisation d'au moins de 35 % et qui respectent la condition de molécule unique (moins de 2000 particules sur le champ d'observation).

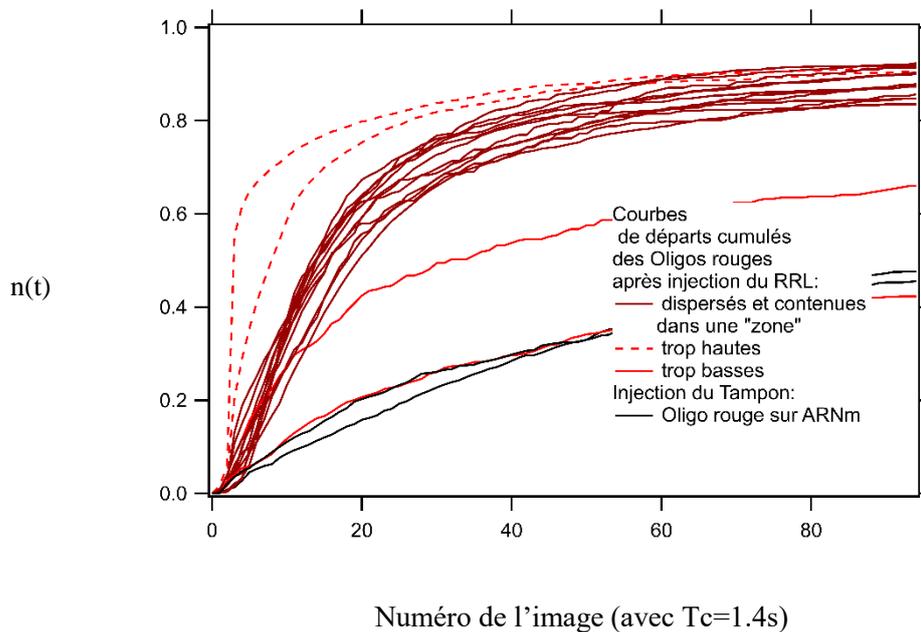


FIGURE 4.6 – Courbes de départs cumulés des fluorophores rouges pour une expérience de scanning prises au cours d'une journée d'expérimentation type. En noir sont tracées les courbes de départs dans le tampon. La durée de cycle est de $T_c=1.4s$.

On trace sur un même graphe toutes les courbes de départs cumulés pour un même système rapporteur obtenues à partir des films pris dans les mêmes conditions optiques (durée d'un cycle d'acquisition, temps d'exposition...) pour les marqueurs UP ou DN (voir figure 4.6).

Il nous arrive d'observer des courbes cumulées pour les deux oligos UP/DN plus ou moins dispersés. En effet, même si nous prenons la précaution de répéter l'expérience dans les mêmes conditions (physiques ou biologiques), certains paramètres expérimentaux ne sont pas parfaitement maîtrisables par l'opérateur. En effet, il y a toujours de légères variations dues à la température, à la salinité du tampon, à la préparation de l'extrait cellulaire, au temps d'incubation, à la chimie de surface ... qui peuvent expliquer la variabilité de la cinétique mesurée.

On observe comme sur la figure 4.6 :

- des courbes "trop hautes". Il se peut que ce soit dû à des départs spontanés trop importants pour des raisons telles que la présence de RNAses, de choc salin, de problèmes de chimie de surface (courbes en rouge clair pointillés).
- des courbes très reproductibles légèrement dispersées mais contenues dans une "zone peu dispersée" (courbes en bordeaux)
- quelques courbes trop "basses" à la même hauteur que les courbes de photoblanchiment dans le Tampon (courbes en rouge clair trait plein). Ce comportement peut être dû à des interactions non-spécifiques impor-

tantes ou à un lot de RRL de mauvaise qualité.

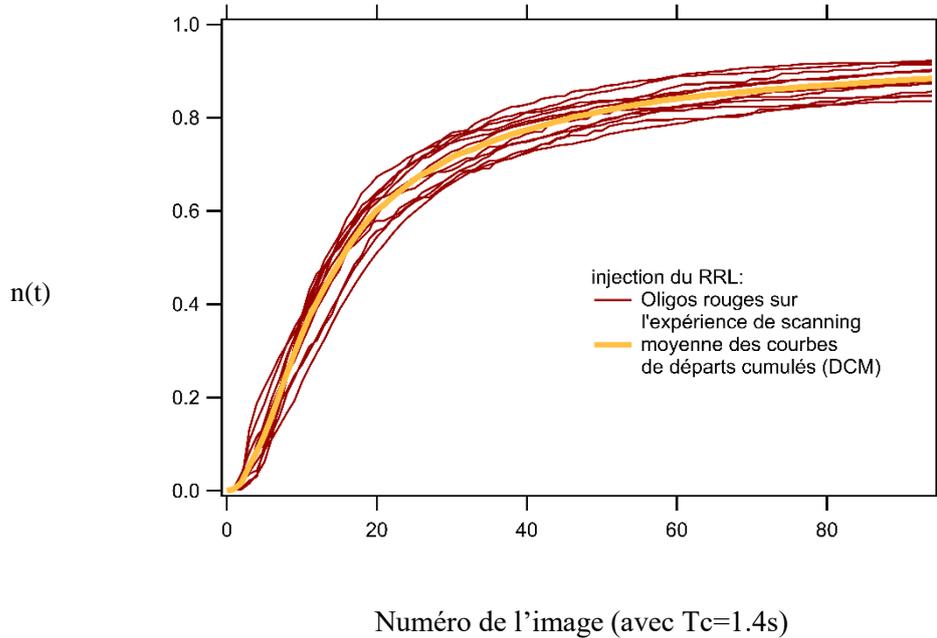


FIGURE 4.7 – Courbes de départs cumulés sélectionnés pour les fluorophores rouges (en bordeaux) pour l'analyse finale. Représentation en orange de la moyenne pondérée des courbes de départs (DCM). $T_c=1.4s$

Nous mettons donc en place un critère de sélection des courbes pour l'analyse. On prendra en compte pour la moyenne pondérée uniquement les courbes de la famille principale contenues dans la zone intermédiaire (cf graphe 4.7).

4.2.2 Etude de la cinétique de départ

Intérêt de l'utilisation d'un système biologique "contrôle"

Lors d'une expérimentation, il est primordial de pouvoir quantifier les différentes sources de bruit (photoblanchiment, départs spontanés, autres phénomènes biologiques ...) qui ne sont pas dues au scanning. Pour cela, on a recours à un système biologique rapporteur "contrôle" qui aura les mêmes oligofluorophores UP et DN mais qui ne pourra être scanné. Ce système rapporteur nous permettra donc d'évaluer les bruits multiples parasites et de les soustraire à l'expérience. Ainsi, on sera capable d'évaluer uniquement les instants de départs des primers UP/DN dus au scanning.

Courbes de départs cumulés moyennées (DCM) pour les expériences de contrôle et de scanning

Pour l'acquisition, on utilise le même protocole expérimental pour l'expérience du "contrôle" comme avec celui de l'expérience de scanning. Les films obtenus sont traités et analysés de la même façon.

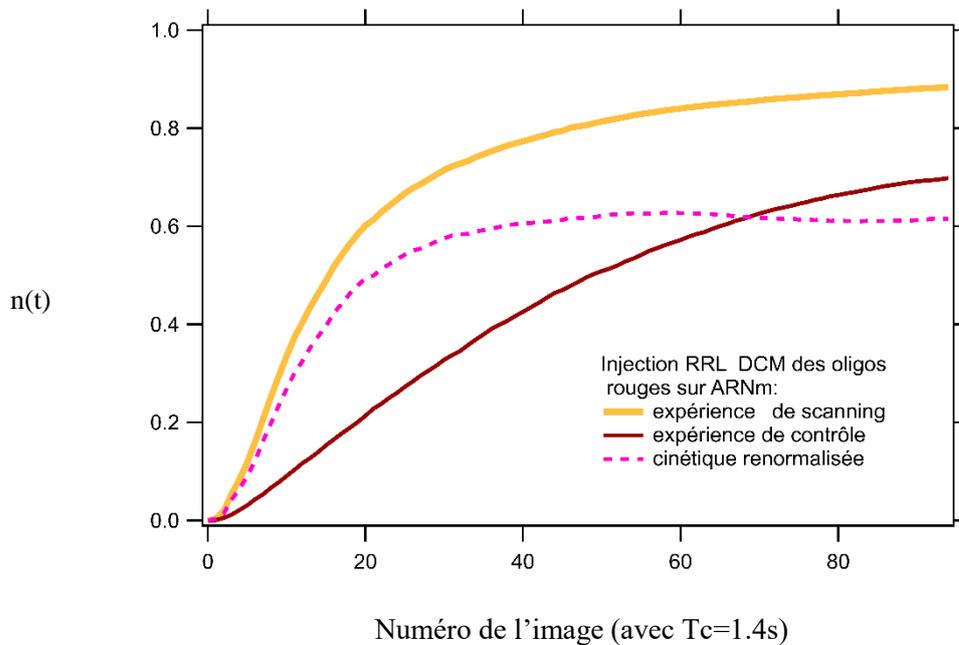


FIGURE 4.8 – Courbes de DCM pour les expériences de scanning (en orange), de contrôle (en marron) en fonction du temps (en nb d'images). La courbe renormalisée pour le scanning $n^{scanning}$ est donnée en fuschia avec pointillés. On a $T_c=1.4s$

On trace sur le même graphe (voir figure 4.8) : la courbe de DCM du contrôle $n^{contrôle}$ (en marron trait plein) et la courbe de DCM de l'expérience du scanning $n^{expérience}$ (en orange trait plein). Ces DCM nous renseignent sur la proportion de particules partantes entre l'instant initial et l'instant t . Les départs peuvent être dus à plusieurs évènements : photoblanchiment, scanning ou à des départs spontanés. Nous voyons qu'il y a moins de départs dans l'expérience du contrôle que dans l'expérience du scanning (cf graphe 4.8). En effet, les départs dus au scanning sont beaucoup plus importants que les autres sources de bruit pour l'expérience. Ainsi, on va pouvoir renormaliser la cinétique de départ de l'expérience de scanning $n^{expérience}(t)$ par la cinétique de départ de l'expérience du contrôle $n^{contrôle}(t)$.

Courbes de départs instantanés renormalisées (DIR) par le contrôle

L'allure des courbes de départs cumulés dans chaque couleur nous donne un aperçu de la cinétique de départs mais ne permet pas d'extraire directement les temps caractéristiques de cinétique. En effet, c'est la courbe de la

distribution des départs instantanés renormalisés (DIR) par le contrôle correspondant qui nous donnera l'accès aux informations sur la cinétique de scanning.

On obtient cet histogramme (voir figure 4.9) de départs instantanés à partir des instants de départs $T_i^{UP/DN}$ des molécules uniques colocalisés en plusieurs étapes :

- On renormalise la courbe de DCM de l'expérience de scanning $n_{moy}^{experience}(t)$ par la courbe de DCM du contrôle $n_{moy}^{contrôle}(t)$ par l'opération suivante :

$$n^{scanning}(t) = \frac{n_{moy}^{experience}(t) - n_{moy}^{contrôle}(t)}{1 - n_{moy}^{contrôle}(t)}$$

$n^{scanning}$ représente la fraction des molécules colocalisées de l'expérience de scanning renormalisée par l'expérience de contrôle. La courbe $n^{scanning}(t)$ est tracée sur le graphe 4.8 en trait fuschia pointillés. Elle est bien comprise entre les courbes de DCM $n_{moy}^{experience}(t)$ et $n_{moy}^{contrôle}(t)$. Cette courbe illustre principalement la proportion des molécules uniques colocalisées partantes entre l'instant initial et l'instant t en raison du scanning.

- On dérive cette courbe $n^{scanning}(t)$ en fonction du temps pour obtenir la courbe de départs instantanés de scanning renormalisée par l'expérience du contrôle (voir figure 4.9). On aboutit donc à une distribution des départs instantanés notée $P(t)$ par :

$$P(t) = \frac{d}{dt}(n^{scanning}(t))$$

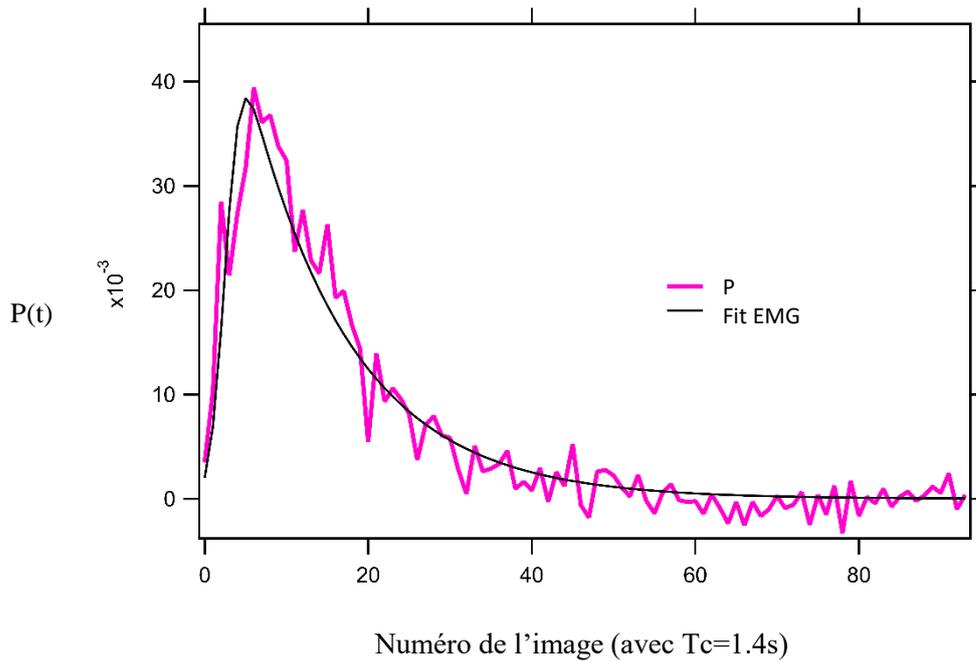


FIGURE 4.9 – Courbe de départs instantanés renormalisée (DIR) par le contrôle que l'on note P en fuschia. L'ajustement par la fonction EMG est représenté en noir. $T_c=1.4s$

Nous verrons dans le paragraphe suivant comment interpréter cet histogramme renormalisé afin d'en extraire les cinétiques de scanning qui nous intéressent.

4.3 Modèle biologique pour trouver les temps caractéristiques

Nous allons voir qu'il est possible de donner une interprétation biologique à l'allure de la courbe de départs instantanés obtenue (figure 4.9).

4.3.1 Le scanning : une dynamique à deux temps caractéristiques

Il y a une succession de deux événements lors de l'expérience de scanning. En effet, le PIC 43S interagit d'abord avec la structure IRES de l'ARNm avec un temps caractéristique noté τ . Une fois que le PIC 43S est recruté, celui-ci va scanner la région 5'UTR jusqu'à trouver le codon START. Lors de cette étape de scanning, le PIC détache les oligofluorophores UP/DN avec un temps caractéristique noté $t_1^{UP/DN}$. Ce temps t_1 est proportionnel au nombre de nucléotides que le PIC 43S doit scanner pour détacher le primer en question.

4.3.2 Modèle statistique choisi

Nous avons la succession de deux évènements avec deux temps caractéristiques. En probabilité, la succession de deux évènements est donnée par la convolution des densités de probabilité de ces évènements qui sont :

- le recrutement du PIC avec une densité de probabilité donnée par une exponentielle avec un temps τ .
- le scanning des N nucléotides jusqu'à détacher le primer qui correspond à une densité donnée par une loi Normale avec un temps caractéristique t_1 . Cette loi Normale résulte elle-même de la convolution de la densité de probabilité des N exponentielles décroissantes.

Ainsi, la convolution finale de ces densités de probabilité correspond à une exponentielle modifiée par une gaussienne que l'on note EMG. Rappelons que la courbe DIR représente une densité de probabilité renormalisée des instants de disparitions des marqueurs. Pour extraire la cinétique de départ nous choisissons comme modèle statistique une EMG pour l'ajustement de la courbe (voir figure 4.9) :

$$EMG(t, A, \mu, \sigma, \lambda) = A \frac{\lambda}{2} \exp\left(\frac{\lambda}{2}(2\mu + \lambda\sigma^2 - 2t)\right) \operatorname{erfc}\left(\frac{\mu + \lambda\sigma^2 - t}{\sqrt{2}\sigma}\right) \quad (4.1)$$

Avec :

A, qui représente l'efficacité de recrutement du PIC 43S sur l'IRES

μ , qui nous permet de déterminer le temps t_1 ⁴ qu'il faut pour détacher le marqueur.

$\frac{1}{\lambda}$, qui permet de trouver le temps caractéristique τ ⁵ qui caractérise le temps de recrutement du PIC 43S par l'IRES.

A partir de $t_1^{UP/DN}$, nous pouvons remonter à la vitesse de scanning ou scanning rate (SR) qui correspond au nombre de nucléotides effectifs scannés par seconde selon :

$$SR = \frac{\text{position du primer UP/DN en 5'UTR} - 15}{t_1^{UP/DN}} \quad (4.2)$$

avec :

la position du primer : qui est donnée en nucléotides. Dans l'équation (4.2), on retire 15 nucléotides qui correspondent à la fin de l'empreinte du ribosome lorsque celui est recruté par l'IRES (voir justification au chapitre 5).

Ainsi, on est capable de caractériser la cinétique de scanning sur les différents systèmes rapporteurs biologiques utilisés.

4. correspond à la partie gaussienne de l'ajustement EMG.

5. correspond à la partie exponentielle de l'ajustement

4.4 Conclusion

Nous avons présenté le principe de l'analyse de données dans ce chapitre.

Le traitement se fait en plusieurs étapes :

- un traitement d'image pour soustraire le fond (par le Rolling Ball) et renormaliser les signaux par une moyenne locale avec le traitement sur IGOR Pro.
- IGOR Pro permet de détecter les molécules uniques avec un critère de seuillage.
- les choix de sélection sur les traces temporelles des particules pour repérer uniquement les fluorophores qui ont un comportement canonique.
- le critère de colocalisation pour travailler uniquement avec des molécules uniques colocalisées.

L'accès aux temps de départ T_i de ces molécules uniques colocalisées nous permet grâce au modèle statistique (voir équation (4.1)) de trouver les informations sur la cinétique de scanning et notamment la vitesse de scanning SR du ribosome (voir équation (4.2)).

Chapitre 5

Résultats de la cinétique de scanning *in vitro* après recrutement sur l'IRES EMCV

Les résultats présentés dans ce manuscrit de thèse sont le fruit d'une collaboration avec l'équipe de Franck MARTIN et de son doctorant Antonin TIDU de l'IBMC (Institut de biologie moléculaire et cellulaire) de l'Université de Strasbourg. Tous les ARNm pour notre étude ont été ainsi fournis par nos collaborateurs.

Nos collaborateurs veulent étudier le phénomène de scanning après recrutement sur l'IRES EMCV "muté"¹. Ils cherchent dans un premier temps à mesurer la vitesse de scanning. Ils veulent également déterminer l'influence d'une séquence fortement structurée dans la région 5'UTR sur la dynamique de scanning. Ainsi, dans ce chapitre l'objectif est de montrer comment notre méthode de mesure en molécule unique par la microscopie de fluorescence TIRFm permet de répondre à ces questions. Dans un premier temps, nous présenterons les différents systèmes rapporteurs biologiques utilisés lors de notre étude pour les expériences. Puis, nous verrons les résultats obtenus et l'interprétation pour la cinétique de scanning *in vitro* après recrutement sur l'IRES EMCV.

1. Le codon START natif de l'IRES est supprimé pour forcer le scanning vers un autre codon AUG plus en aval (voir 5.1).

5.1 Présentation

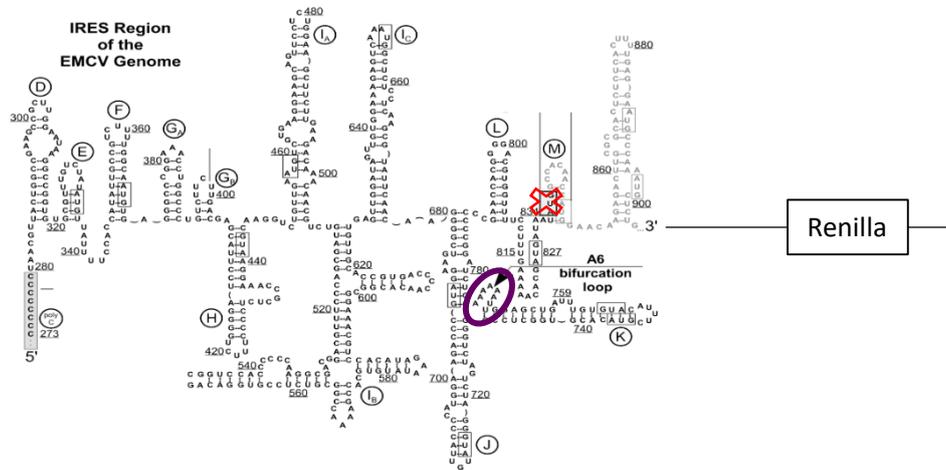


FIGURE 5.1 – Présentation de la structure de l'IRES EMCV mutée adaptée de [Bochkov and Palmenberg 2006] en amont d'un gène rapporteur (Renilla). La croix rouge montre le codon natif AUG qui a été muté pour permettre le scanning. La zone entourée en violet représente la boucle A6 où la délétion d'un A va générer une IRES inactive.

5.1.1 Présentation de différents systèmes rapporteurs biologiques

A l'aide d'une expérience de traduction *in vitro* par quantification sur gel², nos collaborateurs ont pu mettre en place des systèmes rapporteurs biologiques adaptés pour nos expériences de scanning et de contrôle. Ils ont utilisé des systèmes contenant l'IRES mutée en amont d'un gène rapporteur : la Rénilla (voir figure 5.1).

Systèmes biologiques rapporteurs pour l'expérience du contrôle

Il est important lors de nos mesures de cinétique de scanning de générer des systèmes rapporteurs "contrôles". Ces contrôles vont permettre de quantifier les sources de bruits parasites (tels que le photoblanchiment, les départs spontanés et d'autres phénomènes biologiques) présents dans l'expérience. En effet, on doit considérer uniquement les départs qui sont dus au scanning.

Ceci est rendu possible par une délétion d'un A dans la boucle A6 du domaine entouré en violet sur la figure (voir figure 5.1) qui donne une IRES inactive. En effet, nos collaborateurs ont démontré l'inactivité de cette IRES expérimentalement. Il y a une diminution de 91 % dans la synthèse de la protéine (voir figure 5.2) . Cette propriété sera utilisée pour générer des rapporteurs inactifs que l'on notera **A5**³. Ce sera un contrôle utilisé pour nos expérimentations.

2. Les ARNm utilisés par les biologistes ont la séquence codante pour la protéine Renilla luciférase. Le signal de cette protéine bioluminescente peut être quantifié.

3. La dénomination A5 pour dire que un A a été retiré dans la boucle A6.

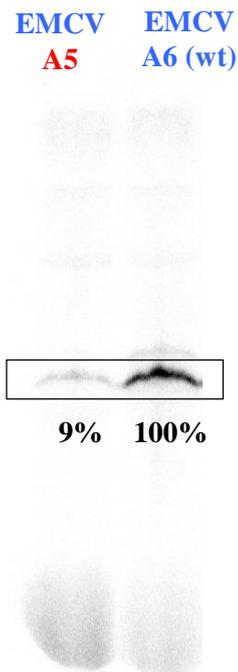


FIGURE 5.2 – Résultats de la quantification de la protéine Renilla Luciférase pour les IRES EMCV active A6 (contenant les 6A de la zone A6 entourée en violet de la figure 5.1) et inactive A5 (avec la délétion d'un A sur la boucle). Les efficacités de traduction ont été renormalisées par rapport au signal de l'IRES EMCV A6. Ces résultats proviennent de Antonin TIDU doctorant du laboratoire IBMC de l'université de Strasbourg

On utilisera également un autre système rapporteur comme contrôle dans nos séries d'expérimentations qui sont des IRES complémentaires⁴. Ce sont des IRES inactives que l'on nomme **cA6**. Nos collaborateurs ont aussi montré grâce à une expérience de traduction *in vitro*, qu'il y avait une très forte diminution de la synthèse de la protéine codée.

Il faut souligner que cette faible synthèse de protéines sur les ARNm contrôles (A5 et cA6) comparée à l'ARNm EMCV (non muté A6) démontre que :

- L'initiation est bien IRES dépendante pour l'ARNm EMCV dit A6. Cet résultat est en accord avec l'étude faite par Kaminski sur l'ARNm EMCV [Kaminski et al. 1990]. En effet, ils ont montré qu'il y avait bien une initiation IRES dépendante lors de leurs expériences.
- On a bien généré des systèmes contrôles.

Dans nos expériences, nous avons également pensé à utiliser un inhibiteur chimique appelé "hippuristanol" capable d'inhiber le facteur d'initiation eIF4a primordial au recrutement du PIC 43S sur l'IRES [Bordeleau et al. 2006] [Cencica and Pelletier 2016]. Ce contrôle hippuristanol sur A5 et A6 nous permettra donc de voir si les contrôles générés sont de bons contrôles pour nos expériences.

4. La séquence de la structure IRES correspond au brin complémentaire qui a été intégré en amont de la Renilla.

Systèmes rapporteurs biologiques pour l'expérience de scanning

L'IRES EMCV peut recruter directement le PIC 43S sur le codon AUG de la phase codante sans passer par une étape de scanning [Kaminski et al. 1990]. Le scanning de l'ARNm sera permis par la suppression du codon AUG natif (représentée par la croix rouge sur la figure 5.1). En effet, l'expérience de traduction sur cette IRES EMCV⁵ avec le START muté a permis aux biologistes de mesurer du signal de bioluminescence de la protéine traduite.

La comparaison des résultats biologiques avec l'expérience du contrôle (A5 et cA6⁶) montre que le scanning a bien lieu.

Présentation des différentes séquences introduites dans 5'UTR sur les expériences de contrôle et de scanning

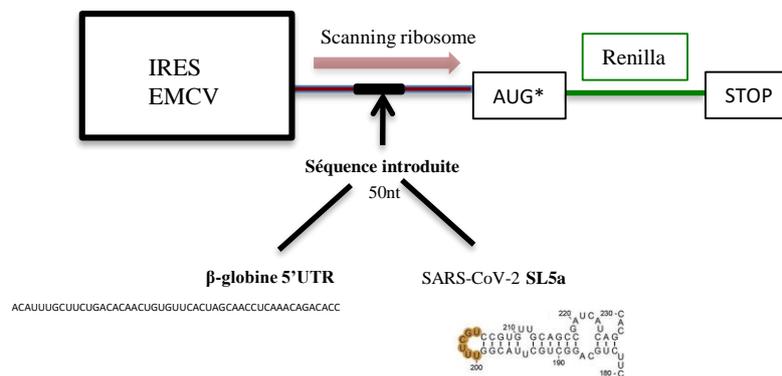


FIGURE 5.3 – Présentation des différents rapporteurs pour l'étude du phénomène de scanning où une séquence de 50 nucléotides a été introduite en 5'UTR. Cette séquence est soit linéaire (issue de 5'UTR de la β -globine) ou contient une structure en forme de tige-boucle (issue de la tige-boucle SL5a de la 5'UTR du SARS-CoV-2 [Miao et al. 2021]).

(* : Le codon AUG correspond à celui du gène rapporteur.)

5. L'IRES EMCV contient les 6A de la boucle entourée en violet sur la figure 5.1.

6. A5 et cA6 ont également eu leur codon AUG natif supprimé afin de limiter les différences de modifications avec A6 qui peuvent induire un biais expérimental.

Dans la zone 5'UTR suivant l'IRES EMCV a été introduite une séquence de 50 nucléotides (voir figure 5.3). Cette séquence est soit :

- linéaire, issue de la 5'UTR de la β -globine.
- structurée en tige-boucle ayant une énergie libre $\Delta G = -17.3$ kCal/mol [Miao et al. 2021], issue d'une partie structurée de la 5'UTR⁷ du SARS-COV-2 à 54 nucléotides en aval du codon AUG natif muté et 80 nucléotides en amont du codon AUG fonctionnel.

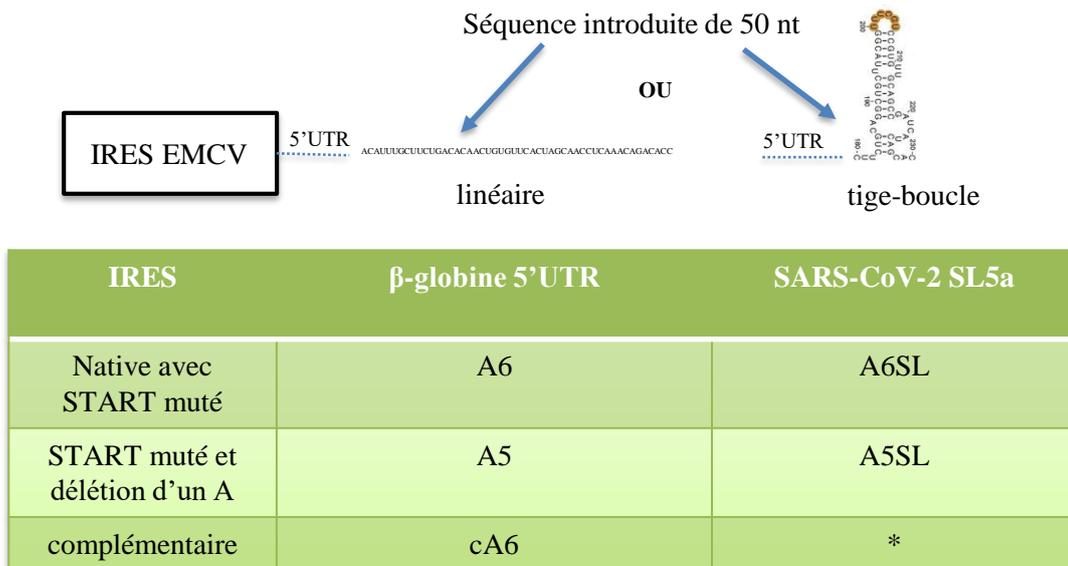


FIGURE 5.4 – Nomenclature des différents systèmes rapporteurs où une séquence de 50 nucléotides a été introduite en 5'UTR. Si cette séquence est linéaire (issue de la 5'UTR de la β -globine) , on appellera **A6** (l'IRES EMCV avec le codon START muté) pour l'expérience de scanning ; **A5** (l'IRES avec le codon START muté et la délétion d'un A dans la boucle A6) ou **cA6** (l'IRES complémentaire) pour les expériences de contrôle. Si la séquence introduite en 5'UTR est une tige-boucle : on utilisera la même dénomination que pour la β -globine mais on ajoutera SL à la fin (**A6SL** ou **A5SL**).

(* : On n'a pas utilisé le contrôle cA6 avec la tige-boucle.)

Ainsi, les dénominations des systèmes rapporteurs biologiques contenant la séquence linéaire de la β – globine en 5'UTR seront **A6** pour l'expérience de scanning et **A5**, **cA6** pour les expériences de contrôle (voir figure 5.4). Pour les systèmes contenant la tige-boucle en 5'UTR on utilisera **A6SL** comme dénomination pour l'expérience de scanning et **A5SL** pour celle du contrôle.

D'après les résultats de nos collaborateurs, la synthèse de la protéine est moins abondante lorsque la tige-boucle est introduite dans la région 5'UTR . En effet, on voit sur la figure 5.5 une diminution de 60% dans le signal mesuré.

7. issue de la tige-boucle SL5a de la 5'UTR du SARS-CoV-2

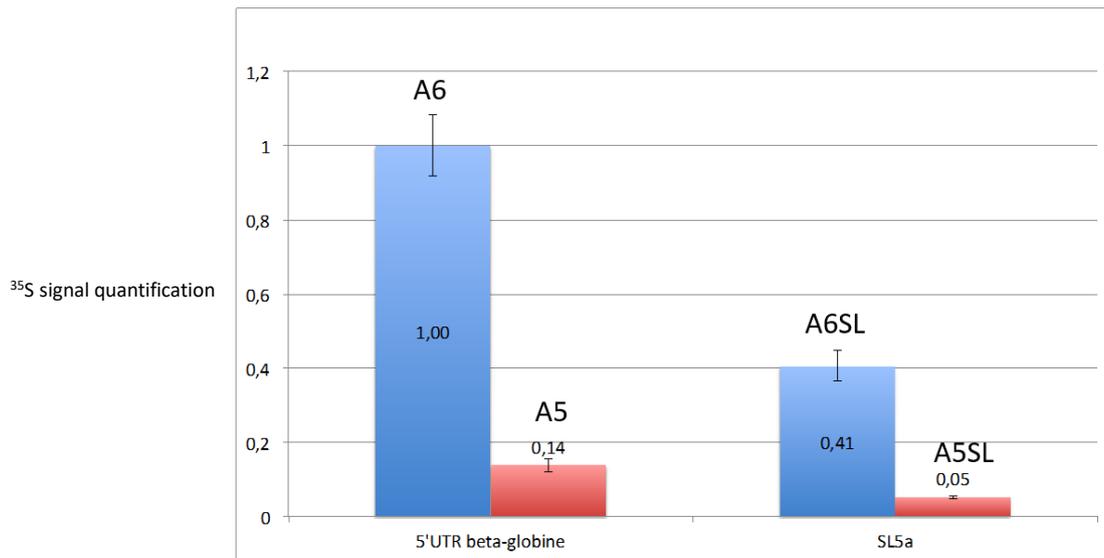


FIGURE 5.5 – Résultats de la quantification de la protéine Renilla Luciférase avec le marquage ³⁵S pour les différents systèmes rapporteurs contenant en 5'UTR la séquence linéaire (A6/A5) ou la tige-boucle (A6SL/A5SL). Les signaux de bioluminescence des protéines traduites ont été tous normalisés par rapport à ceux de A6. On observe une forte diminution du signal entre A6 et A6SL. Ces résultats proviennent de Antonin TIDU doctorant du laboratoire IBMC de l'université de Strasbourg

Résultats biologiques de nos collaborateurs

L'expérience de traduction *in vitro* par quantification sur gel a montré que :

- Le scanning a lieu avec l'IRES EMCV après suppression du codon natif (voir figure 5.1).
- L'initiation est IRES dépendante.
- A5 ou cA6 sont de bons contrôles.
- Il y a une forte diminution du signal de bioluminescence avec l'insertion de la tige-boucle SL5a.

Cependant, leur méthode de mesure permet uniquement de quantifier sur gel le signal de la protéine traduite mais la dynamique de scanning n'est pas directement accessible. Par conséquent, notre expérience de mesure par TIRFm en molécule unique sera une méthode complémentaire pour obtenir les informations sur la cinétique de scanning.

L'accès à la cinétique de scanning permettra à nos collaborateurs de trouver les réponses à leurs questions telles que :

- Quelle est la vitesse de scanning sur le système rapporteur ayant la séquence linéaire en 5'UTR ?
- Comment influe la structure en tige-boucle sur cette dynamique ?

Dans les paragraphes suivants, on tentera de leur apporter nos réponses à l'aide de notre méthode de mesure.

5.1.2 Notre système

Pour répondre à toutes ces questions, on utilise notre modèle de système rapporteur décrit dans le chapitre 2. En effet, on hybride des oligofluorophores UP et DN dans la zone 5'UTR afin de mesurer la cinétique de scanning avec notre microscope TIRFm.

Nomenclature

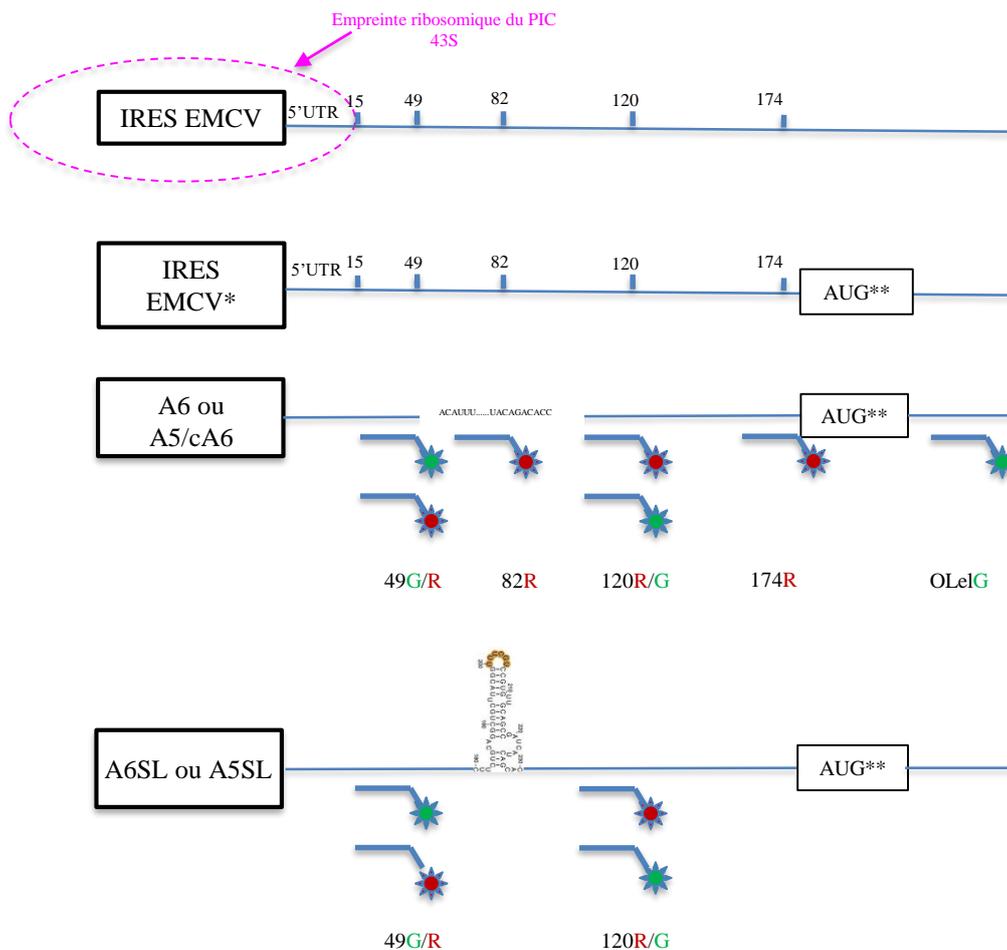


FIGURE 5.6 – Représentation des différents systèmes rapporteurs avec les oligofluorophores rouges (R) ou verts (G) hybridés sur 5'UTR. Sur ces schémas, on donne toutes les possibilités des emplacements des primers utilisés au cours de la thèse. Pour les ARNm avec la séquence linéaire introduite en 5'UTR, nous avons utilisé les marqueurs notés UP49G/R, UP/DN82R, DN120G/R, UP/DN174R et OLeIG. Pour les ARNm avec la tige-boucle en 5'UTR, nous avons utilisé les oligofluorophores UP49G/R et DN120R/G. On représente l'empreinte ribosomique du PIC 43S en rose avec des pointillés sur l'IRES EMCV non muté. L'empreinte du ribosome fait 30 nucléotides. La position 3' du PIC après recrutement par l'IRES EMCV (non muté) recouvre 15 nucléotides en aval du codon AUG natif supprimé dans la région 5'UTR.

(* : IRES EMCV avec le codon AUG natif supprimé.)

(** : Le codon AUG correspond au START du gène rapporteur Renilla. Il commence à la position 175 après l'IRES.)

Le concept de construction de nos systèmes rapporteurs est similaire à ceux utilisés par N.BARBIER lors de sa thèse ([Barbier 2017]) mais le design est modifié légèrement.

En effet, tous les ARNm auront une zone 5'UTR où viendront s'accrocher des sondes fluorescentes UP et DN. Ces sondes auront une séquence de 18 nt pouvant s'hybrider sur l'ARNm⁸. Le premier primer hybridé est noté UP et le second est appelé down DN. Pour caractériser un système biologique rapporteur, on repérera les positions des marqueurs UP et DN en comptant le nombre de nucléotides jusqu'à détachement complet du jalon fluorescent (UP ou DN). En effet, l'oligofluorophore (UP ou DN) pourra être considéré comme détaché lorsqu'il reste seulement 3 nucléotides hybridés à l'ARNm. Sur la figure 5.6, sont représentées les différentes positions des primers pour chaque ARNm. Pour la dénomination de chaque oligofluorophore, on associe l'emplacement (UP ou DN) avec la position sur la 5'UTR puis suivi de sa couleur (G ou R). Par exemple, le primer UP49G signifie que le marqueur est vert en position UP au niveau du 49ème nucléotide.

Sur la figure 5.6, on voit que la fin de l'empreinte du PIC 43S après recrutement par l'IRES EMCV non muté recouvre 15 nucléotides en aval du codon AUG natif supprimé. Ainsi, le nombre de nucléotides effectifs que le PIC va réellement scanner avant de détacher un primer est réduit au plus de 15 nucléotides. Donc, pour détacher le marqueur UP49R, le PIC scannera au minimum 34 nucléotides⁹

5.2 Méthode de mesure de la cinétique de scanning

5.2.1 Condition de molécule unique

Après l'hybridation des marqueurs UP et DN sur les ARNm¹⁰, sera injectée dans la cellule microfluidique, une solution contenant des systèmes rapporteurs à une concentration faible (inférieure à 30 nM). En effet, cette condition est nécessaire pour travailler dans les conditions de molécule unique.

5.2.2 Acquisition des signaux

Nos expériences ont été réalisées à 30 °C. L'acquisition du signal de fluorescence est effectuée lorsque l'extrait cellulaire¹¹ est injecté. En effet, le temps d'arrivée du RRL correspond à notre instant initial que l'on appelle t_0 où le phénomène de scanning peut démarrer. Lors de l'injection de l'extrait cellulaire¹², le PIC 43S sera recruté par l'IRES EMCV. Puis, le PIC pourra scanner de 5' en 3' la séquence 5'UTR jusqu'à trouver le codon START.

8. On utilisera également un Oligo OLeIG pour l'étude de l'élongation. Il aura une séquence de 29 nt pouvant s'apparier mais sera riche en A/U.

9. Dans le cas de l'IRES mutée (avec le codon AUG natif supprimé) on ne sait pas exactement où sera recruté avec précision le PIC. La position 3' du PIC peut être entre 0 et 15 nucléotides en aval du codon AUG supprimé.

10. Selon le protocole fourni en annexe.

11. On utilise le RRL.

12. Le RRL contient également les PIC 43S nécessaires au scanning.

Le PIC doit déplier des structures secondaires de manière à glisser sur des régions simples brins avant de les lire. Lorsque celui-ci rencontre une structure en double brin, comme celles formées par les primers UP (ou DN) appariés sur l'ARNm, il va être capable de les détacher grâce à une activité hélicase portée par le facteur eIF4a [Pause and Sonenberg 1992], [Hinnebusch 2014], [Svitkin et al. 2001], [Hinnebusch 2017]. Ainsi, au cours de cette opération de scanning, il y aura une perte du signal de fluorescence du marqueur UP à un instant t_{UP} lorsque le PIC 43S sera passé. Puis, on perdra également le signal du jalon DN à un instant t_{DN} (phénomène biologique détaillé dans le chapitre 1). En connaissant les instants de départ des primers, on peut déterminer la cinétique de scanning. Ainsi, la microscopie de fluorescence TIRFm en molécule unique avec la technique de marquage de fluorescence sur les systèmes rapporteurs permet d'accéder à la vitesse de scanning de chaque ribosome individuel (méthode décrite dans le chapitre 4).

5.3 Résultats

Les signaux de départ des marqueurs UP et DN sont enregistrés dans des films. Une fois que l'acquisition des films est faite, ils seront traités et analysés selon la méthode citée au chapitre précédent. Voici les résultats obtenus pour les différents systèmes rapporteurs biologiques présentés dans le paragraphe précédent.

5.3.1 Protocole pour obtenir les résultats

Pour chaque journée d'expérience, on procède selon la méthode d'analyse présentée au chapitre 4. Cependant, on prend la précaution de considérer uniquement les cellules peu chargées ayant un taux de colocalisation important (au moins de 35%) . Lors d'une même journée d'expérimentation, on superpose les courbes de départs cumulés d'un même marqueur pour les cellules contenant les mêmes échantillons. On se rend compte que la plupart des courbes de départs cumulés sont quasi-reproductibles dans une même journée. On sélectionne les courbes obtenues selon les critères énoncés au chapitre 4 pour obtenir les courbes de départs cumulés moyennées (DCM) de la journée. Ensuite, pour chaque position de l'oligofluorophore UP ou DN, on compare les différentes courbes moyennées des différentes journées analysées. On essaie de voir si les comportements des marqueurs pour une même position sont similaires en regardant les courbes de DCM.

5.3.2 Courbes de DCM pour les expériences de contrôle

Oligofluorophores rouges

On s'intéresse aux départs des marqueurs rouges en positions UP ou DN sur les ARNm A5 ou cA6 pour les expériences de contrôle. On superpose sur le même graphe 5.7, toutes les courbes de DCM pour toutes les positions étudiées (49, 82, 120, 174).

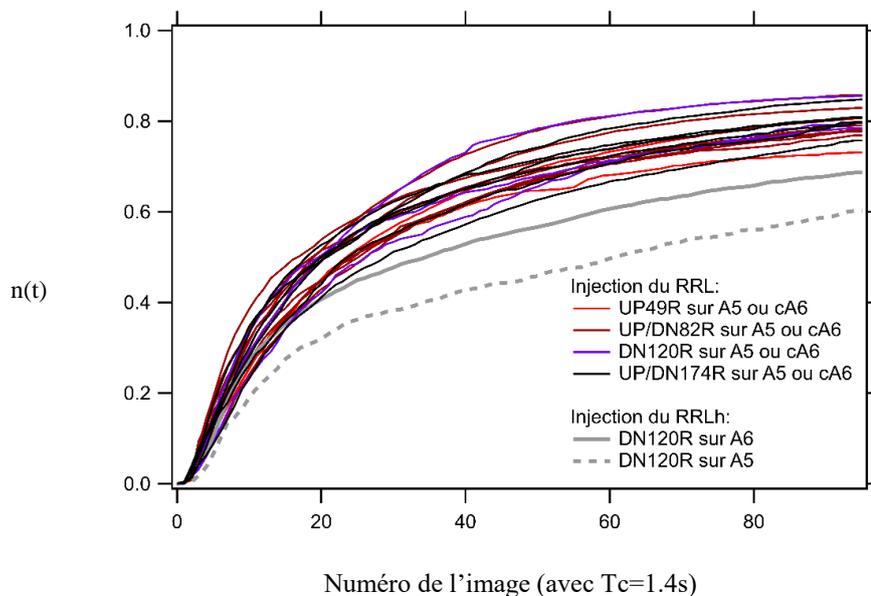


FIGURE 5.7 – Superposition des différentes courbes de DCM sur différentes journées d'expériences des marqueurs rouges sur les différentes positions : 49, 82, 120 et 174 sur les ARNm A5 ou cA6. En gris trait plein est représenté le contrôle A6 avec hippuristanol. En gris trait pointillé, le contrôle hippuristanol avec A5.

Puis, on y effectue la moyenne pondérée des courbes de DCM pour chaque position (voir figure 5.8). On voit que les courbes pondérées de DCM sont quasi-superposables et peu dispersées. En effet, les départs dans le contrôle ne peuvent être que dus au photoblanchiment ou à des départs spontanés et ne doivent pas dépendre de la position du marqueur.

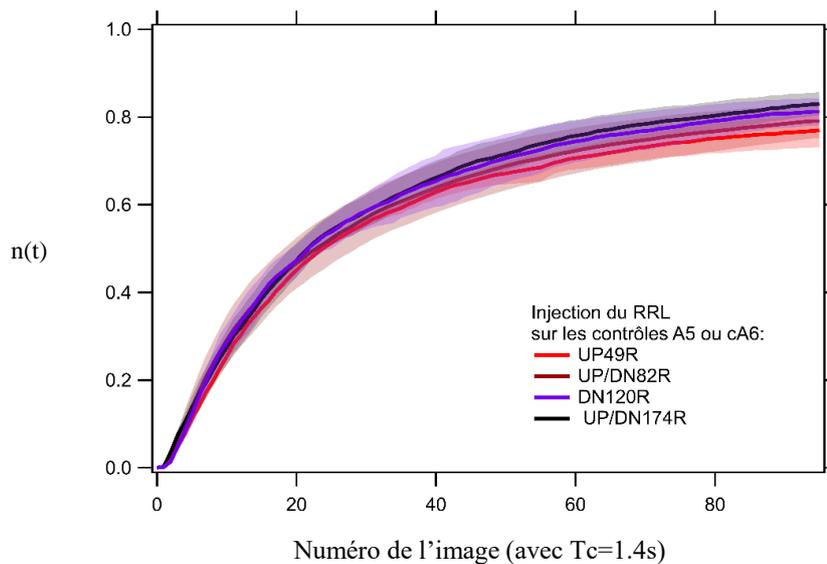


FIGURE 5.8 – Superposition des différentes courbes de moyennes pondérées de DCM sur différentes journées d'expériences des marqueurs rouges sur les différentes positions : 49, 82, 120 et 174 sur les ARNm A5 ou cA6. On y a représenté la dispersion.

Ainsi, dans notre démarche pour l'analyse finale, on décide de moyenner toutes les courbes de contrôle peu importe la position du marqueur (voir figure 5.9). On observe que la courbe pondérée finale de DCM pour les oligofluorophores rouges est légèrement au dessus des contrôles hippuristanol sur les ARNm A6 et A5. Ceci peut être expliqué par la présence d'un phénomène "biologique" en plus du photoblanchiment sur les échantillons contrôles. Une éventuelle hypothèse est que l'hippuristanol inhibe ce phénomène biologique en plus d'inhiber l'activité hélicase de eIF4a ce qui pourrait expliquer la différence de comportement dans les départs observés sur le graphe 5.9. Cependant, il faut noter que l'on a une statistique trop faible sur les expériences effectuées avec l'hippuristanol¹³. Une autre hypothèse est qu'une partie des ARNm contrôles (A5 ou cA6) arrive à recruter le PIC 43S dans nos conditions expérimentales *in vitro*.

13. On a effectué seulement quelques journées d'expériences avec l'hippuristanol.

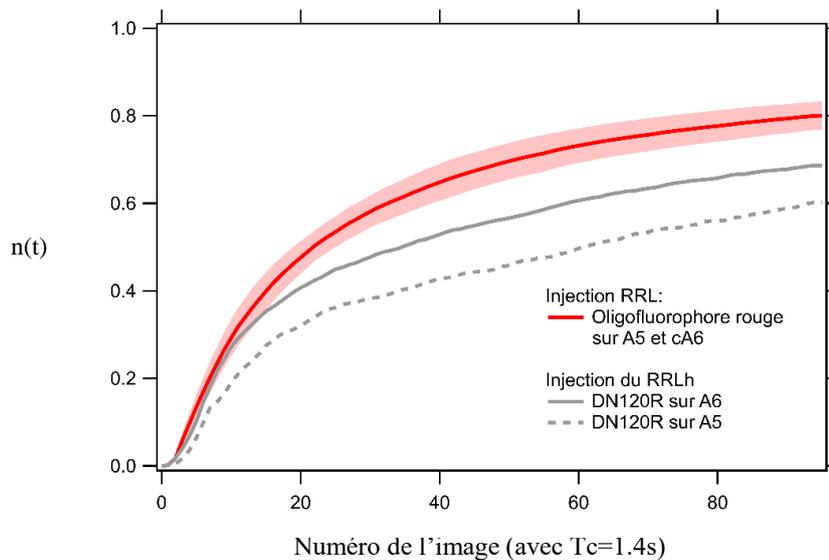


FIGURE 5.9 – Courbe finale de la moyenne de tous les DCM des les primers rouges sur toutes les positions (49, 82, 120 et 174) sur les ARNm A5 ou cA6. Les courbes contrôles avec l'hippuristanol (RRLh) sur A5 et A6 ont été représentées en gris.

Pour effectuer l'analyse des données (décrit dans le chapitre 4), on va dans toute la suite utiliser la courbe pondérée finale des DCM de tous les marqueurs rouges (voir figure 5.9).

Oligofluorophores verts

On effectue la même démarche pour les départs des oligofluorophores verts pour toutes les positions (49 et 120) sur les expériences de contrôle. On voit une plus grande dispersion des courbes peu importe les positions (voir annexe A, figures A.1 et A.2). On décide quand même de faire la moyenne pondérée des DCM de toutes les positions (voir figure 5.10). On utilisera cette moyenne pondérée finale verte pour le traitement des données pour obtenir la dynamique de scanning.

Comme pour les marqueurs rouges, on observe que les départs sont plus importants comparés aux contrôles hippuristanol sur A5 et A6. Le fait d'observer un comportement similaire est rassurant puisque ceci montre que "le phénomène biologique" supplémentaire ne dépend pas de la couleur du marqueur.

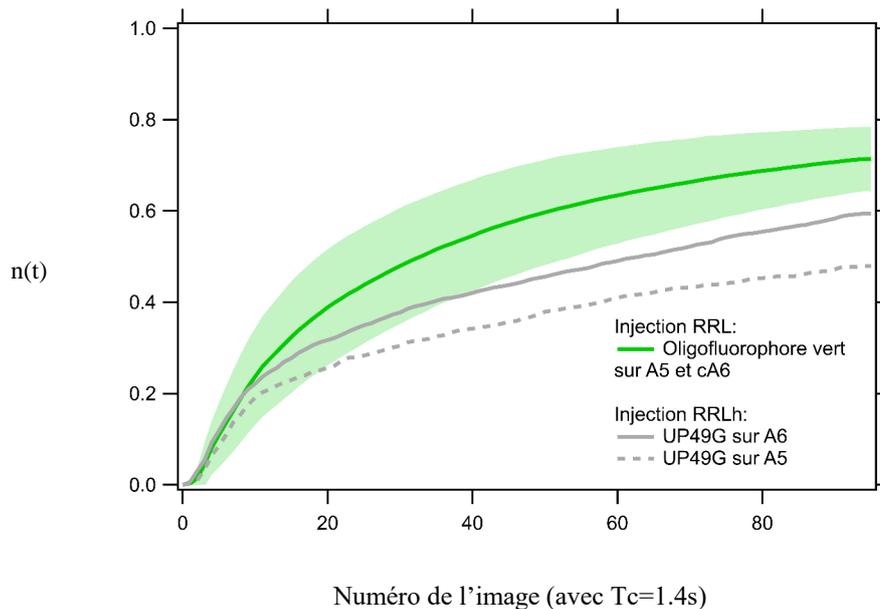


FIGURE 5.10 – Courbe finale de la moyenne de toutes les courbes de DCM des oligofluorophores verts sur toutes les positions (49 et 120) sur les ARNm A5 ou cA6. Les courbes contrôles avec l'hippuristanol (RRLh) sur A5 et A6 ont été représentées en gris.

5.3.3 Démarche pour obtenir les temps caractéristiques du processus de scanning : exemple de la position 49

Courbes de départs cumulés moyennées (DCM) pour l'expérience de scanning

On s'intéresse à la dynamique de scanning après recrutement sur l'IRES EMCV notamment sur la position 49 en 5'UTR. On regarde pour cela les départs des marqueurs UP49G sur A6SL/A6 ou UP49R sur A6. On superpose les courbes de DCM des marqueurs UP49G et UP49R pour les différentes journées d'expériences du scanning sur les ARNm A6SL et A6 (voir annexe A figure A.3 et figure 5.11). On observe aussi une forte dispersion comme pour les contrôles. Nous mettons également sur la même figure 5.12, les courbes finales contrôles rouges et vertes de DCM de l'expérience de contrôle.

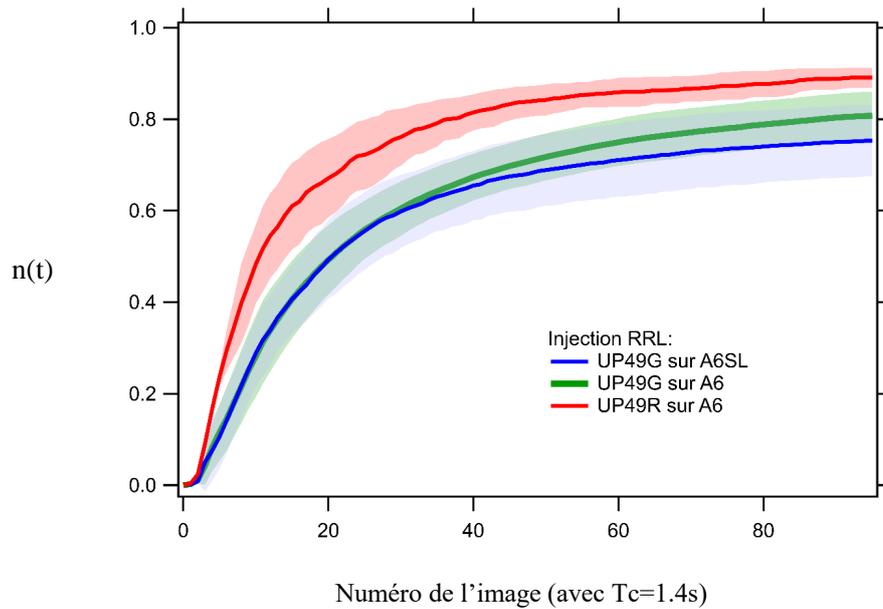


FIGURE 5.11 – Superposition des différentes courbes de moyennes pondérées de DCM du marqueur UP49 sur A6 et A6SL sur différentes journées d’expériences de scanning. La dispersion est également représentée.

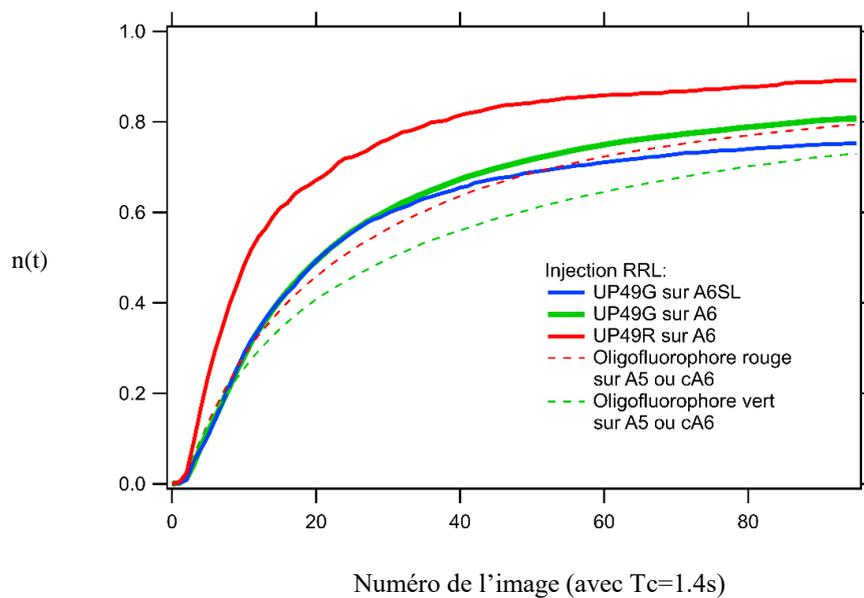


FIGURE 5.12 – Superposition des différentes courbes de moyennes pondérées de DCM du marqueur UP49 sur A6 et A6SL sur différentes journées d’expériences de scanning. Les courbes des contrôles verts et rouges sont représentées en traits pointillés.

Obtention des temps caractéristiques

On analyse les données obtenues pour les départs de UP49R/G sur **A6** et UP49G sur **A6SL** avec leurs contrôles finaux correspondants.

A partir des courbes de DCM nous pouvons extraire les informations sur la dynamique de scanning. Ainsi, on analyse avec la méthode présentée dans le chapitre 4. Chaque courbe de DCM sera analysée séparément. Ainsi, on obtient la courbe de départs instantanés renormalisée DIR pour chaque journée d'expérience (voir figure 5.13).

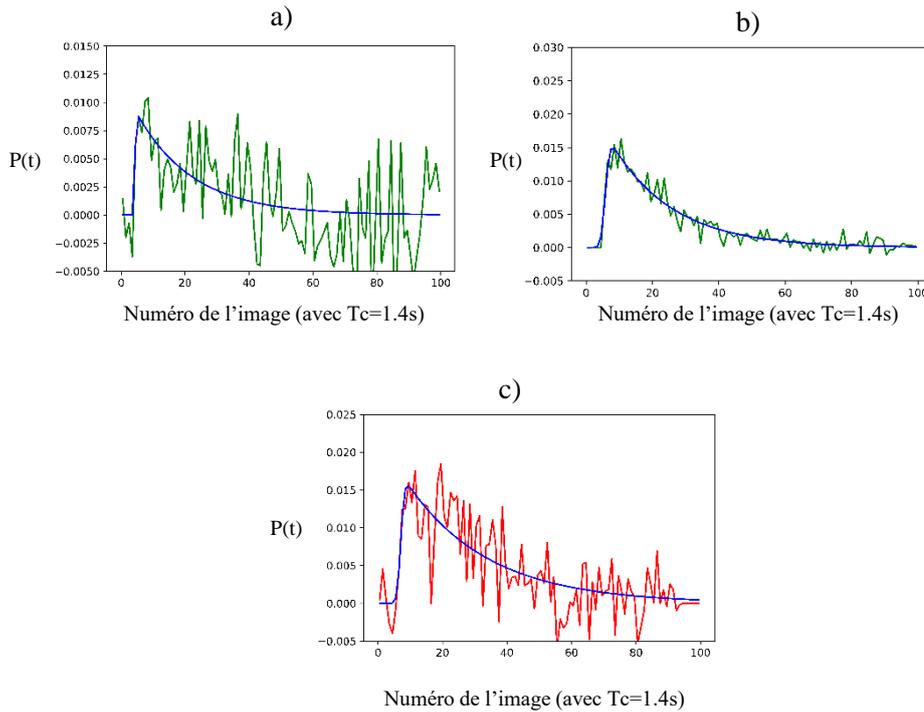


FIGURE 5.13 – Courbes de départs instantanés renormalisées DIR par les contrôles finaux rouges ou verts avec des durées de cycles $T_c=1.4s$: a) UP49G sur A6SL ; b)UP49G sur A6 ; c) UP49R sur A6 . Pour chaque DIR, un ajustement avec une EMG a été effectué en trait plein bleu.

Puis, on fait un ajustement avec une EMG ¹⁴ :

$$EMG(t, A, \mu, \sigma, \lambda) = A \frac{\lambda}{2} \exp\left(\frac{\lambda}{2}(2\mu + \lambda\sigma^2 - 2t)\right) \operatorname{erfc}\left(\frac{\mu + \lambda\sigma^2 - t}{\sqrt{2}\sigma}\right)$$

14. Fonction EMG décrite dans le chapitre 4

On rappelle que les paramètres de cet ajustement sont :

- A , qui nous renseigne sur l'efficacité de recrutement du PIC 43S sur l'IRES
- μ , qui nous permettra de déterminer le temps t_1 qu'il faut pour détacher le marqueur.
- $\frac{1}{\lambda}$, qui permettra de trouver le temps caractéristique τ qui caractérise le temps de recrutement du PIC 43S par l'IRES

Nous avons accès à la vitesse de scanning ("scanning rate" SR) à partir de t_1 qui correspond au nombre de nucléotides scannés par le PIC 43S par seconde selon la formule :

$$SR = \frac{\text{position du marqueur} - 15}{t_1}$$

avec :

- la position en nb de nucléotides
- t_1 en s

Ainsi, on obtient toutes les informations sur la cinétique de scanning avec les incertitudes associées¹⁵ (voir figure 5.15 a).

5.3.4 Dynamique de scanning

On procède de la même façon pour extraire les informations cinétiques pour les marqueurs rouges et verts se trouvant aux autres positions en aval sur 5'UTR de la β -globine (voir les figures 5.14 a-b-c-d et les tableaux de la figure 5.15 a-b-c-d). On obtient également les résultats de cinétique de scanning pour la tige-boucle sur A6SL (voir les figures 5.14 a-c et les tableaux de la figure 5.15 a-c).

15. Pour obtenir les résultats nous avons effectué l'analyse pour chaque journée d'expériences prises avec les mêmes conditions puis on a fait la moyenne et l'écart-type.

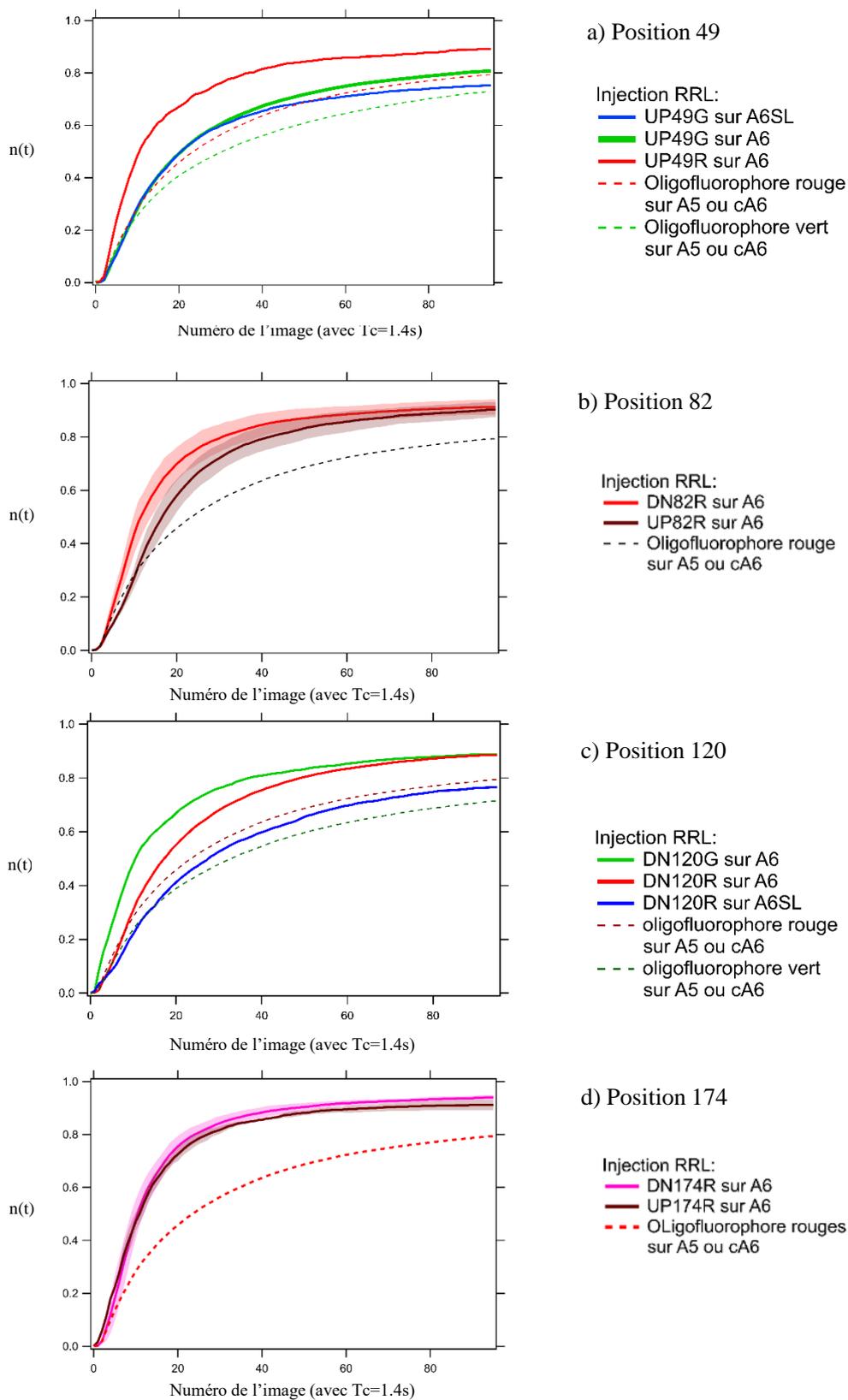


FIGURE 5.14 – Superposition des différentes courbes de moyennes pondérées de DCM pour les expériences de de scanning sur A6 et A6SL avec les contrôles globaux rouges et verts (ici la durée d'acquisition est $T_c=1.4s$) pour chaque position : a) 49 ; b) 82 ; c)120 ; d) 174.

	Durée de cycle Tc (s)	Efficacité de recrutement A	Temps long τ (s)	Temps courts t_1 (s)	Scanning Rate (nt/s)	Nb de journées d'expériences retenues
a) UP49G sur A6SL/contrôles verts	1.4	0.32 ± 0.19	16.1 ± 3.6	6.1 ± 3.6	6.4 ± 5.6	4
UP49G sur A6/contrôles verts	1.4	0.49 ± 0.05	26.4 ± 12.3	7.2 ± 4.9	7.1 ± 4.2	11
UP49R sur A6/contrôles rouges	1.4	0.48 ± 0.11	10.8 ± 9.6	4.5 ± 2.2	9.4 ± 5.4	3

	Durée de cycle Tc (s)	Efficacité de recrutement A	Temps long τ (s)	Temps court t_1 (s)	Scanning Rate (nt/s)	Nb de journées d'expériences retenues
b) DN82R sur A6/contrôles rouges	1.4	0.63 ± 0.08	14.7 ± 2.5	8.1 ± 1.5	8.6 ± 1.9	6
UP82R sur A6/contrôles rouges	1.4	0.58 ± 0.13	21.7 ± 3.5	13.1 ± 2.1	5.2 ± 0.9	2

	Durée de cycle Tc (s)	Efficacité de recrutement A	Temps long τ (s)	Temps court t_1 (s)	Scanning Rate (nt/s)	Nb de journées d'expériences retenues
c) DN120G sur A6/contrôles verts	1.4	0.52 ± 0.06	19.0 ± 7.0	5.1 ± 2.5	26.5 ± 17.5	3
DN120R sur A6/contrôles rouges	1.4	0.48 ± 0.11	17.7 ± 4.8	8.6 ± 0.9	12.4 ± 1.4	3
DN120R sur A6SL/A5SL	2.8	0.26 *	38.4 *	20.1 *	5.3*	1
DN120R sur A6SL/A5SL	5.6	0.20*	68.3 *	24.2 *	4.4*	1

	Durée de cycle Tc (s)	Efficacité de recrutement A	Temps long τ (s)	Temps court t_1 (s)	Scanning Rate (nt/s)	Nb de journées d'expériences retenues
d) UP174R sur A6/contrôles rouges	1.4	0.61 ± 0.01	17.7 ± 1.1	6.7 ± 3.5	17.7 ± 1.1	3
UP174R sur A6/contrôles rouges	2.0	0.80 *	7.8 *	7.4*	16 *	1
UP174R sur A6/contrôles rouges	2.8	0.84 *	6.3 *	4.1*	21 *	1
DN174 sur A6/contrôles rouges	1.4	0.74 ± 0.05	13.8 ± 1.1	5.8 ± 2.9	34 ± 18	3

FIGURE 5.15 – Tableaux donnant les résultats de la cinétique de scanning à partir des DCM des oligofluorophores sur les ARNm A6 ou A6SL. On y trouve les durées de cycle d'acquisition Tc(s), l'efficacité de recrutement A du PIC 43S par l'IRES, les temps longs τ (s) et courts t_1 (s), le scanning rate SR (nt/s) et le nombre de journées d'expériences retenues pour les marqueurs aux positions : a) 49 ; b) 82 ; c) 120 ; d) 174 .

(* = On a effectué l'expérience à une seule reprise donc on n'a pas d'incertitudes sur les mesures)

5.3.5 Résultats sur l'élongation : est-ce que le PIC 43S rentre en phase d'élongation ?

On aimerait savoir si le ribosome rentre en phase d'élongation. Pour obtenir la réponse à cette question un oligofluorophore vert noté OLeIG a été hybridé dans la séquence codante de l'ARNm **A6**.

Ne sachant pas la cinétique globale de détachement de cet oligo OLeIG, on a fait plusieurs essais en changeant la résolution temporelle pour avoir des courbes de traduction et de contrôles bien écartées (voir sur la figure 5.16). En effet, l'objectif est d'observer le phénomène biologique de traduction avec une précision satisfaisante tout en limitant le phénomène parasite de photoblanchiment.

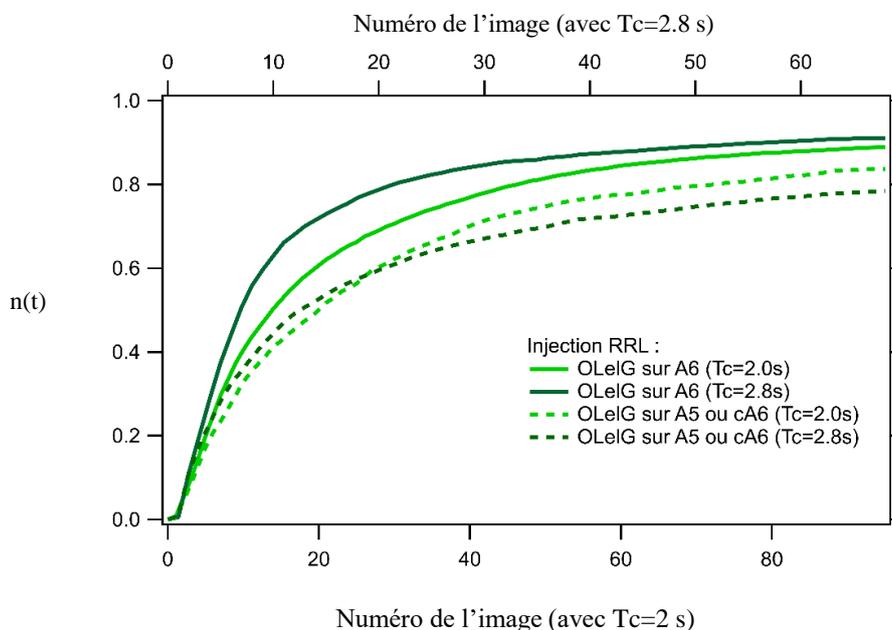


FIGURE 5.16 – Superposition des différentes courbes moyennées de DCM sur différentes journées d'expériences de traduction (en trait plein) du marqueur OLeIG pour différentes durées d'acquisition ($T_c=2.0s$ en vert clair et $2.8s$ en vert foncé). Les contrôles verts de OLeIG sur A5/cA6 pour $T_c=2.0s$ et $2.8s$ sont représentés en pointillés.

On donne les résultats de la cinétique pour l'élongation sur le tableau de la figure 5.17 obtenu avec la même fonction de fit EMG¹⁶.

16. L'explication donnant la raison pour laquelle le même ajustement a été effectué sera donnée dans le paragraphe "discussions".

	Durée de cycle T_c (s)	Efficacité de recrutement A	Temps long τ (s)	Temps court t_1 (s)	Nb de journées D'expérience retenues
OLeIG sur A6/contrôles verts	2.0	0.57 ± 0.14	20.5 ± 2.5	11.4 ± 6.9	2
OLeIG sur A6/contrôles verts	2.8	0.42 ± 0.04	18.2 ± 5.5	7.9 ± 0.7	2

FIGURE 5.17 – Tableau donnant les résultats pour l'élongation à partir de la cinétique de départ des primers OLeIG sur A6. On y trouve les durées de cycles T_c (s), l'efficacité de recrutement A, les temps caractéristiques longs τ (s), courts t_1 (s) et le nombre de journées d'expériences retenues

Dans la section suivante, nous interpréterons en détails :

- l'efficacité de recrutement du PIC,
- les résultats de cinétique de scanning sur la β -globine,
- l'influence de la tige-boucle sur cette dynamique,
- l'entrée en phase d'élongation.

5.4 Discussion

5.4.1 Efficacité de recrutement A

Les valeurs de l'efficacité de recrutement A (données dans les tableaux des figures 5.15 et 5.17) montrent qu'on a une grande efficacité (de l'ordre de 50-60 %) de recrutement du PIC pour les primers rouges et verts sur la β -globine. Ce résultat obtenu est cohérent avec la littérature où l'efficacité de recrutement du PIC avec le même extrait cellulaire a été de $50 \pm 1\%$ sur l'IRES CrpV et $30 \pm 1\%$ sur l'IRES HCV [Bugaud et al. 2017].

De plus, on voit également que le PIC 43S a la même efficacité de recrutement au niveau UP49G sur les ARNm A6SL et A6. Cependant, on voit que l'efficacité chute environ à 25% avec une tige-boucle en amont (avec DN120R sur A6SL). On a donc l'impression que le ribosome a du mal à avancer avec l'obstacle de la tige-boucle.

5.4.2 Vitesse de scanning

Allure des courbes de DCM

L'allure des courbes de DCM données aux figures 5.18 et 5.19 montre une différence des départs entre les expériences de scanning et celles du contrôle. En effet, les courbes de contrôle associées sont toujours plus basses que

l'expérience de scanning. Ceci montre donc que les départs dus au phénomène de scanning sont plus importants dans l'expérience de scanning.

Sur la figure 5.18 on a représenté toutes les moyennes pondérées des courbes de DCM (avec la dispersion) pour les primers rouges pour les expériences de scanning sur A6 et les expériences de contrôle. Lorsqu'on se concentre sur les oligofluorophores rouges, on voit que les comportements des marqueurs 49, 82 et 120 sont cohérents entre eux. En effet, l'allure des courbes concorde avec l'ordre de départ attendu (49, 82 puis 120). Cependant, la courbe correspondant au marqueur 174 est plus haute. Il est possible que les départs de ce marqueur soient dus à une initiation qui est non IRES dépendante. En effet, cette position est à cheval sur le codon START (voir figure 5.6).

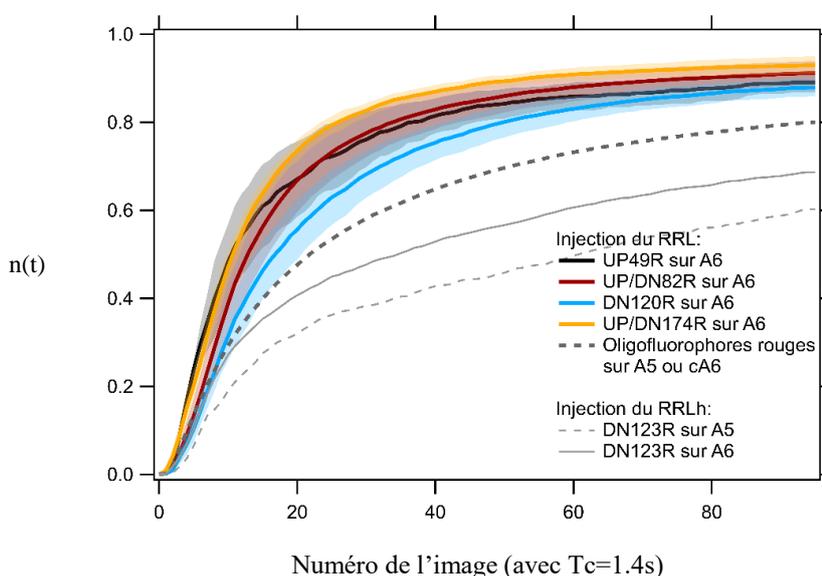


FIGURE 5.18 – Superposition des différentes courbes de moyennes pondérées de DCM du marqueur rouge sur les différentes positions (49,82,120 et 174) pour les expériences de scanning sur A6. On y représente la dispersion en zones colorées. Les courbes contrôles rouges (en traits pointillés gris épais) et hippuristanol sur A6 (en trait fin gris clair) et A5 (en traits pointillés gris clair) sont données.

Cependant, pour les marqueurs verts (voir figure 5.19), on a une incohérence sur la logique de comportement entre les marqueurs aux positions 49, 120 et OLeLG dans la dynamique de leurs départs. En effet, il aurait fallu obtenir comme ordre de départ des primers situés aux positions 49 puis 120 puis OLeLG. Ceci pourrait être expliqué par plusieurs raisons :

- En effet, on a une forte dispersion des courbes pour les marqueurs verts (pour les expériences de contrôle et de scanning).
- Le fait que le primer OLeLG soit détaché avant UP49G peut être éventuellement dû à une initiation non IRES dépendante qui démarre en parallèle (comme avec le marqueur rouge 174).

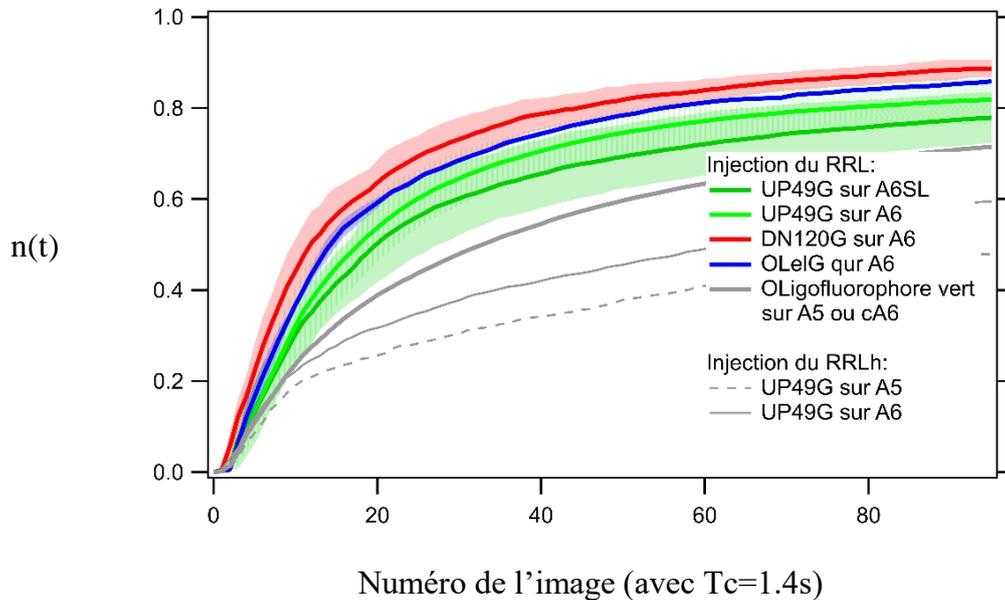


FIGURE 5.19 – Superposition des différentes courbes de moyennes pondérées de DCM avec les marqueurs verts sur les différentes positions (49 et 120) pour les expériences de scanning sur A6. On y représente la dispersion en zones colorées. Les courbes contrôles vert (en trait gris épais) et hippuristanol sur A6 (en trait gris fin) et A5 (en traits pointillés gris) sont données. $T_c=1.4s$.

L'allure des courbes donne un premier aperçu sur la dynamique de scanning. C'est l'analyse sur ces courbes qui nous donnera des informations plus concrètes (voir les tableaux 5.15) sur :

- l'influence de la couleur de l'oligofluorophore
- l'influence de la position du primer dans la zone 5'UTR
- la vitesse de scanning : est-elle indépendante de la position ?

Influence de la couleur du marqueur sur 5'UTR

La cinétique de scanning d'un primer, à une position donnée, dépend-elle de la couleur du marqueur ? On voudrait apporter nos réponses à cette question en observant les comportements des jalons rouges et verts de la position 49 et 120 dans la région 5'UTR sur la β -globine.

L'allure des courbes de DCM de UP49 ou DN120 diffère en fonction de la couleur R ou G du primer (voir figures 5.14 a-c). Les courbes ne se superposent pas parfaitement. Ceci peut être expliqué par la forte dispersion des courbes de DCM des marqueurs verts (voir figure 5.19 et ANNEXE figures A.4 et A.7) contrairement aux marqueurs rouges (voir figure 5.18) pour les expériences de scanning. La même observation a été faite également avec les courbes des contrôles verts (voir figure 5.10).

Les résultats des temps caractéristiques longs τ et t_1 obtenus pour les oligos UP49R et UP49G sont compatibles (voir tableau de la figure 5.15-a). Le même comportement est observé pour les marqueurs DN120G et DN120R

(voir tableau de la figure 5.15-c).

Avec nos données, on observe bien que la couleur du marqueur n'influe pas sur sa cinétique de départ.

Influence de la position du marqueur s'il est en UP ou DN sur 5'UTR

Cette fois-ci, on se demande si le fait d'avoir un oligo hybridé en amont ou en aval peut avoir une influence sur le comportement d'un jalon. A priori, on se dit qu'un oligo situé en aval ne doit pas gêner le départ du marqueur UP. Cependant, est-ce que le primer hybridé en amont peut potentiellement ralentir le départ de l'oligo DN ? Pour répondre à ces questions, on va s'intéresser aux comportements des oligos rouges UP/DN82R et UP/DN174R se trouvant sur la séquence linéaire de la β -globine dans la zone 5'UTR.

Pour l'analyse, on décide d'analyser séparément le comportement des marqueurs UP et DN. L'allure des courbes de DCM pour la position 82 montre une légère différence entre les primers rouges UP et DN (voir figure 5.14 -b). Cependant, les courbes pour UP174R et DN174R se superposent (voir figure 5.14-d). Au final, on obtient les résultats (donnés dans les tableaux de la figure 5.15 b-d). On obtient des temps caractéristiques longs τ et courts t_1 du même ordre de grandeur pour les oligos UP82R et DN82R. La même observation est faite sur les primers UP174R et DN174R¹⁷.

Ces résultats montrent que le jalon hybridé en amont (UP) en 5'UTR a peu d'influence sur la dynamique de scanning du primer DN. En effet, le PIC 43S peut scanner la séquence sans être perturbé par une séquence linéaire hybridée en amont grâce au facteur eIF4a qui a une activité hélicase qui permet d'ouvrir facilement les structures en double brin. La taille des oligos hybridés a été réfléchié et choisie au cours de la thèse de Nicolas FISZMAN [Fizman 2013]. En effet, l'équipe a choisi une taille adaptée pour la longueur des oligos. Il faut qu'ils puissent s'hybrider de manière efficace sur l'ARNm tout en restant stables sans perturber l'activité des ribosomes.

Finalement, ces résultats viennent appuyer notre hypothèse que la cinétique de scanning du primer UP ne dépend pas du primer DN qui est hybridé en aval.

17. La différence des temps courts et longs pour les marqueurs 82R et 174R en position UP ou DN peut être expliquée par le fait que le nombre de journées d'expériences retenues pour l'analyse finale n'est pas suffisant. Il serait intéressant d'augmenter pour voir les comportements.

Le scanning rate du PIC 43S est-il indépendant de la position du primer ?

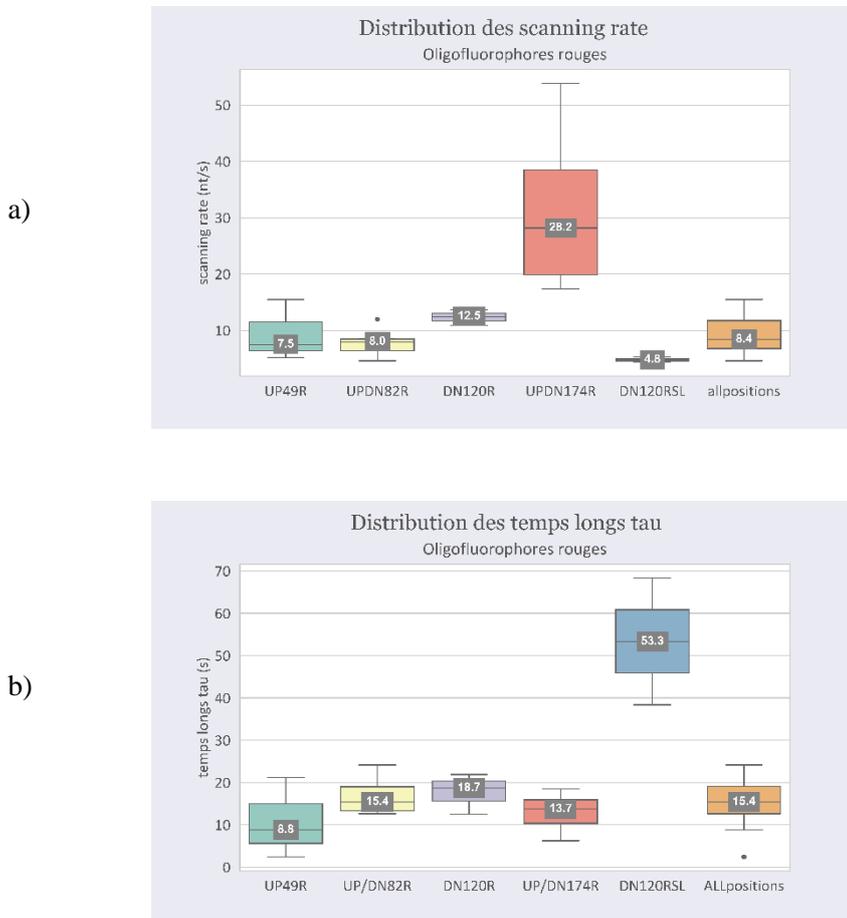


FIGURE 5.20 – Diagrammes en boîtes de la distribution : a) du scanning rate (nt/s) pour les marqueurs rouges UP49R, UP/DN82R, DN120R, UP/DN174R, DN120R SL (tige-boucle) et ALL positions (distribution globale de toutes les positions sauf pour la position 174 et 120SL) ; b) du temps long τ (s) pour les marqueurs rouges UP49R, UP/DN82R, DN120R, UP/DN174R, DN120R SL (tige-boucle) et ALL positions (distribution globale de toutes les positions sauf pour la position 174 et 120 SL) La valeur de la médiane est donnée.

On se demande si le PIC 43S lit la zone 5'UTR à la même vitesse. On représente la distribution des vitesses de scanning des marqueurs rouges UP49R, UP/DN82R, DN120R, UP/DN174R sur la β -globine (voir figure 5.20 a). Nous obtenons des valeurs compatibles pour les oligos aux trois premières positions (49, 82 et 120) mais pas pour la position 174. Le tracé des temps t_1 en fonction du nombre effectif de nucléotides à scanner (voir 5.21 a-b) montre globalement un comportement linéaire sur les départs des marqueurs situés en positions 49,82 et 120. La régression linéaire donne une droite qui passe par l'origine avec une pente correspondant à une vitesse de scanning SR de 11.1 ± 2.7 nt/s.

A priori, le PIC semble lire la séquence à la même vitesse à part pour UP/DN174R. Le primer 174R semble être détaché avant les autres oligos (49,82 et 120). Ce comportement différent du marqueur UP/DN174R est peut-être

dû à plusieurs raisons. Il faut rappeler que cet oligo est situé juste avant le codon START du gène rapporteur. Ainsi, il est possible que cet oligo soit confronté à une initiation non IRES dépendante ou à une hélicase qui vient le détacher.

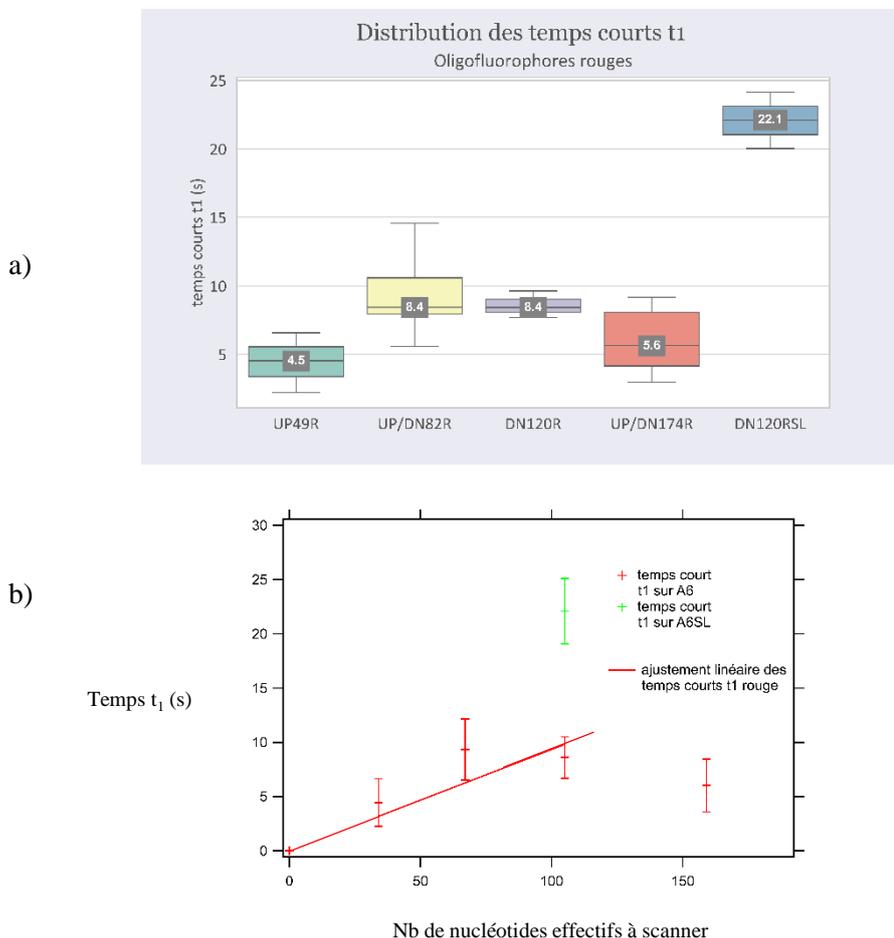


FIGURE 5.21 – Résultats des temps courts t_1 (s) :

a) Distribution des temps t_1 (s) des Oligofluorophores rouges : UP49R, UP/DN82R, DN120R, UP/DN174 , DN120R SL (tige-boucle). Représentation en diagramme en boîtes où la valeur de la médiane est donnée.

b) Graphe de t_1 en fonction du nombre effectif de nucléotides à scanner pour que l'oligofluorophore soit détaché. On a retranché 15 nucléotides pour chaque position. Ajustement linéaire passant par 0 et les positions 49, 82 et 120 (donc 34, 67 et 105 nucléotides effectifs). En vert, on a représenté le temps court t_1 correspondant au marqueur DN120R sur A6SL.

Ces résultats nous donnent une vitesse de scanning SR^{18} pour les jalons rouges de :

$$SR = 9.1 \pm 3.4 \text{ nt/s}$$

Nos résultats semblent donc être en accord avec les résultats de scanning *in vitro* récents. En effet, des études récentes *in vitro* sur des ribosomes eucaryotes dans des extraits cellulaires ont permis de mesurer des vitesses de

18. La valeur donnée correspond à la moyenne et l'écart type de ALL position de la figure 5.20

scanning. Premièrement, les résultats [Wang et al. 2022] et [Vassilenko et al. 2011] ont également montré la relation linéaire entre la taille de la 5'UTR et le temps de scanning du PIC. Il a été mesuré des vitesses de scanning avec des méthodes de mesure d'ensemble *in vitro* de 6 nt/s (dans l'extrait de Krebs à 30 °C [Vassilenko et al. 2011]), 8 nt/s (dans des extraits de germe de blé à 25 °C [Vassilenko et al. 2011]), 10nt/s (dans des extraits de levures à 26 °C [Berthelot et al. 2004]). L'équipe de Wang a mesuré 100 nt/s pour la vitesse de scanning en molécule unique *in vitro* avec des ARNm coiffés dans des extraits de levure [Wang et al. 2022].

Temps long τ : temps d'interaction avec l'IRES

Le temps long τ nous renseigne sur le temps d'interaction du PIC 43S avec l'IRES A6 (voir chapitre 4). Le temps τ devrait donc être le même pour tous les oligos rouges. On donne la distribution des τ pour les différents primers rouges sur A6 (voir figure 5.20 b). On a une dispersion des temps longs plus ou moins importante en fonction de la position du primer. Ceci peut être expliqué qu'il faut faire plus d'expérience de scanning pour les différentes positions. En effet, il faut aussi préciser que les journées d'expériences faites avec des conditions similaires par l'opérateur peuvent conduire à des comportements très différents. Certains paramètres comme le lot de RRL, la chimie de surface, la température, le tampon lors de nos dilutions peuvent provoquer des départs spontanés importants. Il a donc fallu retirer ces journées d'expérimentations dans nos statistiques. Au final seulement une fraction des expériences réalisées lors de la thèse ont pu être exploitables pour l'analyse finale des données.

Finalement, on trouve comme valeur moyenne de τ pour tous les oligos rouges¹⁹ :

$$\tau = 15.5 \pm 5.8 \text{ s}$$

Dans une étude *in vitro* effectuée par l'équipe, ils ont trouvé des temps long d'interaction de 38 ± 3 s avec l'IRES CrPV et 29 ± 4 s avec l'IRES HCV [Bugaud et al. 2017]. Ainsi, on a un temps long d'interaction avec l'IRES EMCV qui est comparable à celui de l'IRES HCV ce qui est rassurant.

19. On ne pas prend en compte les données du primer UP/DN174R en raison de son comportement anormal. La valeur est obtenue à partir de la moyenne et l'écart-type de ALL positions de la figure 5.20 b.

Résultats pour les oligos verts

L'analyse et l'exploitation des données pour les oligos verts furent difficiles. On avait beaucoup de dispersion (voir figure A.3). On a représenté le temps court t_1 en fonction du nombre de nucléotides effectifs à scanner pour les primers UP49G et 120G (voir figure 5.22). Avec la distribution des vitesses de scanning SR des marqueurs verts (donnée en figure 5.23 c), on trouve une valeur de la vitesse de scanning SR sur A6 :

$$SR = 7.8 \pm 4.8 \text{ nt/s}$$

De même avec la distribution des τ pour UP49G et DN120G sur A6, on trouve :

$$\tau = 22.2 \pm 11.0 \text{ s}$$

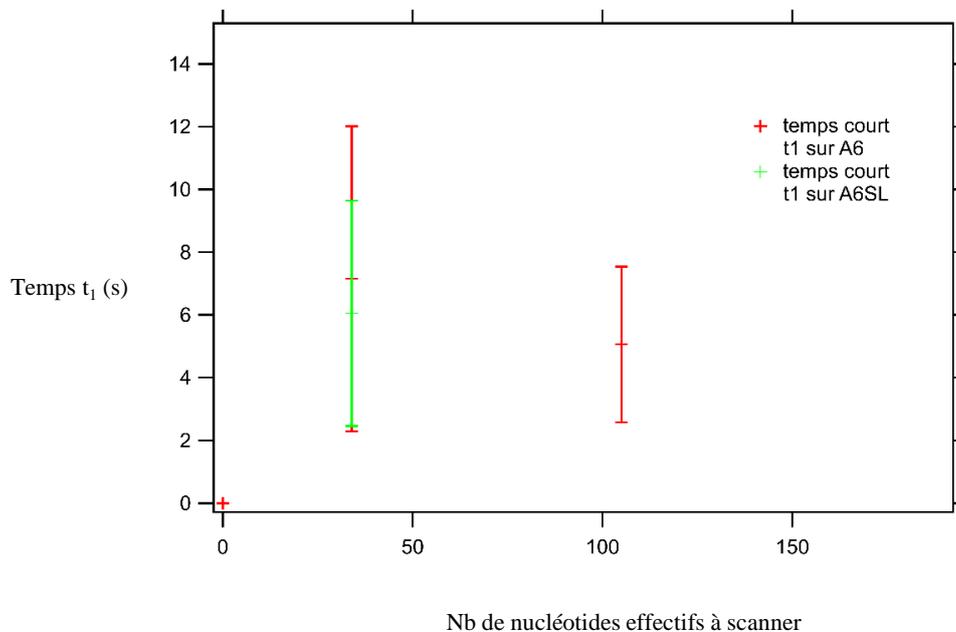


FIGURE 5.22 – Graphe représentant les temps courts t_1 verts en fonction du nombre effectif de nucléotides à scanner pour les primers UP49G, DN120G sur A6. On a retranché 15 nucléotides pour chaque position : 49, 120 (donc 34, 67 nucléotides effectifs). En vert, les valeurs des temps court UP49G sur A6SL sont représentées.

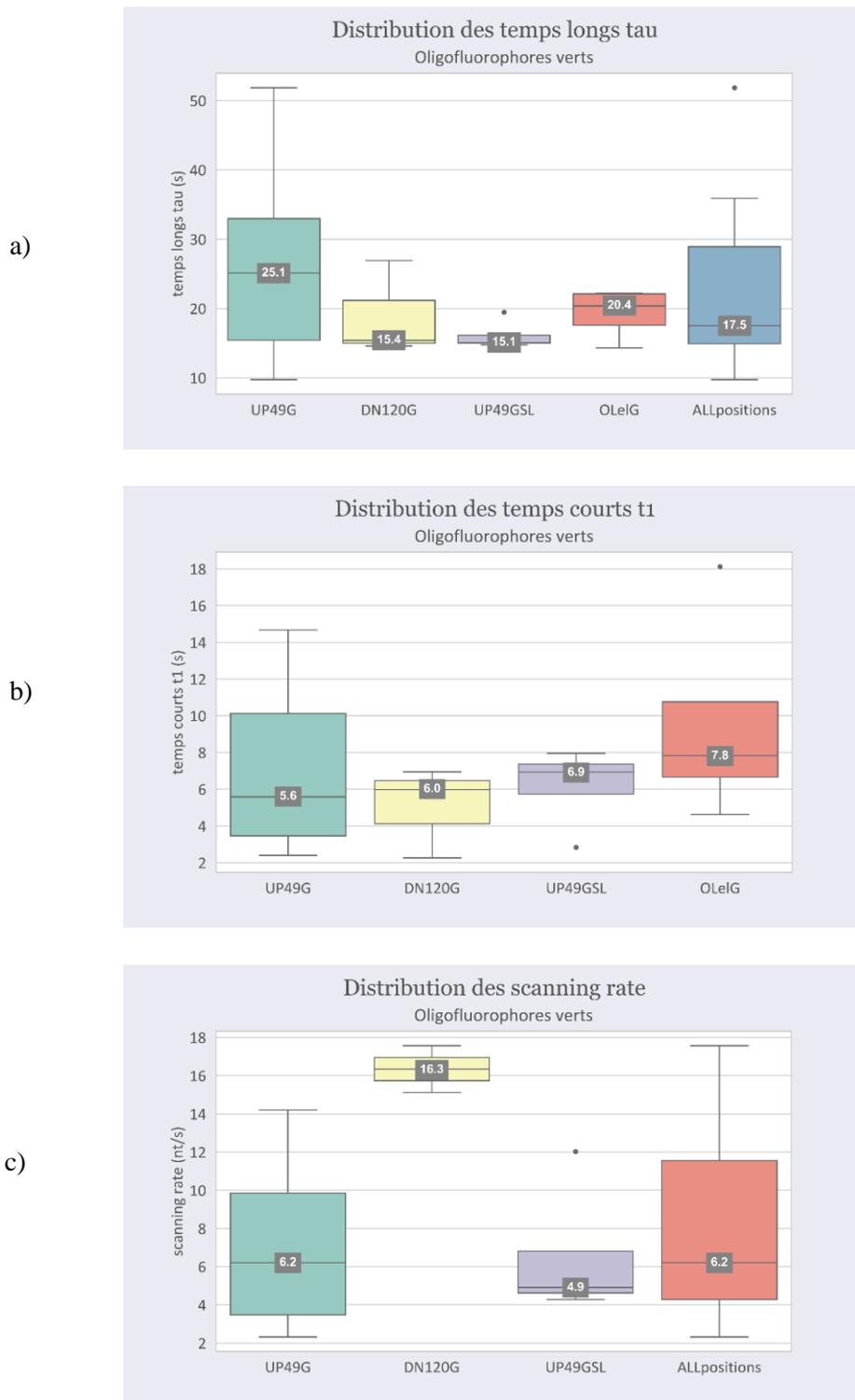


FIGURE 5.23 – Diagrammes en boîtes de la distribution :
 a) des temps longs τ (s) pour les marqueurs verts UP49G, DN120G, UP49G SL (tige-boucle), OLeIG, ALL positions (distribution globale sur toutes les positions sauf pour la position OLeIG)
 b) des temps courts t_1 (s) des Oligofluorophores verts : UP49G, DN120G, UP49G SL (tige-boucle), OLeIG, ALL positions (distribution globale sur toutes les positions sauf pour la position OLeIG)
 c) des scanning rate (nt/s) pour les marqueurs verts : UP49G, DN120G, UP49G SL (tige-boucle), ALL positions (distribution globale sur toutes les positions sauf pour la position OLeIG)
 La valeur de la médiane y est donnée.

Les temps caractéristiques verts ont une grande incertitude en raison de la dispersion et du manque de données. Cependant, les temps caractéristiques courts et longs entre les marqueurs des deux couleurs semblent être compatibles.

5.4.3 Influence de la tige-boucle

Oligo UP49G sur A6SL

On s'intéresse à l'influence de la tige-boucle dans la région 5'UTR sur la vitesse de scanning. La cinétique de départ des marqueurs UP49G et DN120R sur A6SL va nous renseigner sur l'impact de cette séquence structurée.

Les courbes de DCM de UP49G sur A6SL et A6 se superposent (voir figure 5.14 a). Cette allure montre que la tige-boucle n'influe pas sur les départs des marqueurs qui se trouvent en amont. En effet, d'après des résultats récents *in vitro* publiés, une tige-boucle peut influencer sur l'efficacité de recrutement du PIC si sa distance avec la coiffe est inférieure à 10 nucléotides [Kozak 1989],[Kozak 2002], [Babendure et al. 2006]. Or, notre tige-boucle est située à plus de 54 nucléotides de la zone de recrutement du PIC. On trouve des temps caractéristiques de scanning compatibles pour UP49G sur A6SL et A6 (voir tableau figure 5.15 a et figure 5.23).

On obtient pour UP49G sur A6SL :

$$SR = 6.4 \pm 5.6 \text{ nt/s}$$

$$\tau = 16.1 \pm 3.6 \text{ s}$$

Les résultats obtenus sont compatibles avec les valeurs des vitesse de scanning et de temps longs τ obtenus avec ceux de la β -globine.

Oligo DN120R sur A6SL

Puis, on étudie le phénomène de scanning lorsque la tige-boucle est en amont du marqueur DN120R sur A6SL. Nous ne savons pas comment sera impactée la cinétique de scanning du PIC 43S dans cette configuration. Est-il possible que le PIC soit fortement ralenti au niveau de la tige-boucle puis avance-t-il à la même vitesse ? Les courbes des DCM du marqueur DN120R sur A6SL sont plus "basses" que les courbes de DN120R sur A6 (voir courbe bleue trait plein de la figure 5.14 c). Ce comportement nous rassure car d'après les résultats de nos collaborateurs on s'attend à voir une difficulté du PIC 43S à ouvrir la séquence en tige-boucle.

Il faut savoir qu'au cours de nos expériences, nous avons effectué plusieurs choix de durée de cycle T_c pour avoir une résolution temporelle adaptée pour suivre le phénomène biologique tout en limitant le photoblanchiment (voir les figures ANNEXE A.8 et A.9). En effet, on voit sur la figure 5.14 c que la courbe de DCM sur A6SL (en bleu) prise avec une durée de cycle $T_c=1.4\text{s}$ se superpose avec le contrôle global rouge (en rouge pointillés). On se rend donc compte que la résolution temporelle choisie pour cette série d'expérience n'est pas suffisante

pour voir le phénomène biologique car on est prédominé par le photoblanchiment. Une des solutions trouvées pour nos expériences a été de faire des films avec des séquences Verte-Verte-Rouge VVR²⁰. L'augmentation de la durée du cycle de l'acquisition T_c conduit à une diminution en résolution temporelle mais le phénomène biologique (scanning) sera mieux perceptible. En effet, l'écart des courbes entre les expériences de scanning et celles du contrôle augmente (voir ANNEXE A , figures A.8 et A.9).

Pour obtenir les temps caractéristiques de scanning après la tige-boucle, nous avons considéré dans notre modèle statistique que l'on se retrouve dans le cas de deux événements longs qui correspondent à :

- l'interaction du PIC 43S avec l'IRES,
- le temps d'ouverture de la tige-boucle par le PIC 43S.

Après l'ouverture de la tige-boucle par le PIC, on s'attend à ce que celui-ci avance à la même vitesse de scanning. Afin de ne pas augmenter le nombre de paramètres ajustables, on décide de garder la même fonction de fit EMG (présentée au chapitre 4), on considère que le temps long obtenu est la somme des temps longs correspondant aux deux évènements longs.

Les résultats pour le scanning sur le marqueur DN120R sur A6SL et A6 sont donnés dans le tableau 5.15 c et les figures 5.21 a-b.

La distribution des temps longs τ sur A6SL est plus importante que sur A6 (voir figure 5.20 b) . En effet, on a en moyenne pour le primer DN120R sur A6SL :

$$\tau = 53.3 \pm 15.0 \text{ s}$$

En effet, on considère que ce temps long correspond à la somme des deux évènements longs cités plus haut. De plus, nous remarquons que nous n'avons pas vraiment un temps court t_1 compatible avec celui du marqueur DN120R sur A6 (pour $T_c=1.4\text{s}$). En effet, on n'a une statistique que sur deux jours qui a été retenue. Par ailleurs, on trouve une vitesse de scanning SR au niveau de DN120R sur A6SL :

$$\text{SR} = 4.8 \pm 0.7 \text{ nt/s}$$

Cette vitesse de scanning après la tige-boucle semble être inférieure à celle obtenue sur DN120R. Il est difficile de tirer une conclusion en raison de la faible statistique sur les expériences sur la tige-boucle. Il faudra faire plus de journées d'expérimentation avec A6SL.

Cependant, les résultats obtenus pour le marqueur rouge montrent quand même que la tige-boucle conduit à un fort ralentissement du phénomène de scanning au niveau de la tige-boucle. Ce résultat est en accord avec ceux de nos collaborateurs qui ont observé une diminution de l'efficacité de traduction de 60% après avoir introduit la tige-boucle (voir figure 5.5). Il faut noter que ce résultat obtenu est surprenant par rapport aux études faites *in vitro* par d'autres équipes [Kozak 1986], [Kozak 1989], [Leppek et al. 2018], [Vassilenko et al. 2011] , [Babendure et al.

20. Séquence VVR décrite au chapitre 3.

2006]. En effet, la tige-boucle employée ici a une énergie libre ΔG de -17.1 kcal/mol et est située à un emplacement qui n'est pas censé perturber l'efficacité de la traduction eucaryote. La tige-boucle est située à 54 nucléotides en aval du START muté de l'IRES EMCV et 80 nucléotides en amont du START du gène rapporteur. Sa stabilité est inférieure à -30 kcal/mol. La différence d'efficacité peut être aussi expliquée par le fait que la mesure a été faite sur un ARNm contenant une IRES contrairement aux autres équipes qui ont utilisé des ARNm coiffés. En effet, il est possible que le complexe de scanning ait une composition différente et donc sa vitesse peut varier.

5.4.4 Entrée en phase d'élongation

Nous voulons savoir si le ribosome rentre en phase d'élongation en observant les départs des marqueurs OLeIG.

Allure des courbes

On a l'impression que le marqueur OLeIG est détaché avant le primer UP49G lorsque l'on regarde l'allure des courbes de DCM données sur la figure 5.19. On a observé un comportement similaire avec les oligos UP/DN174R. Il est possible que l'on soit dans une compétition entre deux mécanismes de recrutement du PIC différents .

Cependant, pour chaque couple de courbes expérience/contrôle sur OLeIG prises avec des durées de cycles différentes, on a toujours la courbe de l'expérience de la traduction plus haute que le contrôle (voir figure 5.16). Ceci montre que le ribosome rentre en phase d'élongation. Lorsqu'on passe d'une durée de cycle $T_c = 2.0s$ à $T_c = 2.8s$, on voit que l'écart entre les courbes entre les expériences de traduction et celles du contrôle augmente (voir figure 5.16). En effet, pour des films de même durée pris avec des durées d'acquisition plus importantes ($T_c=2.8s$), les départs des marqueurs dus au phénomène de photoblanchiment seront moins importants. Ainsi, les départs dus au phénomène de traduction seront prépondérants lorsqu'on diminue la résolution temporelle.

Temps caractéristiques

Pour obtenir les temps de scanning on s'est également intéressé à notre modèle mathématique pour l'élongation. En effet, on se retrouve avec deux événements longs :

- l'interaction de la petite sous-unité (PIC 43S) avec l'IRES,
- le recrutement de la grande sous-unité 60S au niveau du codon START par le PIC 43S.

Ainsi, on utilisera la même fonction de fit EMG mais on considérera que le temps long τ correspond à la somme des deux événements longs cités. Par ailleurs, le temps t_1 doit être vu comme le temps nécessaire pour le PIC pour scanner la 5'UTR et le temps d'élongation pour détacher le marqueur OLeIG.

On trouve des temps courts t_1 compatibles pour OLeIG pour les deux durées de cycle (voir tableau 5.17). Cependant, on voit sur la figure 5.23-b que le marqueur OLeIG semble être détaché par le complexe 80S avant le primer

UP49G. La distribution de t_1 (figure 5.23 c) donne un temps court t_1^{21} :

$$t_1 = 9.7 \pm 5.9 \text{ s}$$

On trouve des temps longs τ compatibles pour les deux durées d'acquisition. En moyennant, on obtient un temps long global :

$$\tau = 19.3 \pm 3.7 \text{ s}$$

Ce temps long obtenu est légèrement plus long que le temps τ obtenu uniquement dû à l'interaction du PIC avec l'IRES sur la β -globine. D'après l'étude récente de WANG *in vitro* en molécule unique [Wang et al. 2022], ils ont observé que l'arrivée de la sous-unité 60S était l'étape limitante qui mettait 30 s sur leur ARNm coiffé. Il est difficile dans notre cas de trouver avec précision la valeur du temps long correspondant à seulement l'arrivée de la 60S en raison du manque de données.

5.5 Conclusions et futures perspectives

5.5.1 Scanning

L'étude du scanning *in vitro* en molécule unique avec la TIRFm sur la séquence de β -globine sur A6 a montré que le PIC 43S scanne 5'UTR à la même vitesse. Nos résultats sont cohérents avec les résultats de scanning récents [Wang et al. 2022],[Vassilenko et al. 2011],[Berthelot et al. 2004]. Cependant, notre méthode de mesure ne permet pas d'observer avec précision en temps réel le phénomène d'oscillation du ribosome lors de son trajet. En effet, le phénomène d'oscillation lors du scanning des ARNm coiffés chez les eucaryotes a été également observé par l'équipe de Matsuda *in vitro* [Matsuda and Dreher 2006]. Ces oscillations récurrentes ont été également observées dans l'étude récente de Wang [Wang et al. 2022] en molécule unique. Toutes ces observations expérimentales sont en accord avec le modèle de Berthelot qui dit que le PIC avance globalement de 5' à 3' même si la probabilité pour que le PIC oscille est non nulle [Berthelot et al. 2004].

L'anomalie du comportement de UP/DN174R montre qu'il y a peut être une compétition avec un autre mécanisme d'initiation avec une cinétique différente. En effet, le dernier codon hybridé de cet oligo est situé juste avant le codon START. Pour vérifier cette hypothèse nous pouvons déplacer le codon START plus en aval du marqueur. L'expérience de scanning sur ce nouvel ARNm pourra nous renseigner si on a à faire à un autre mécanisme d'initiation. Une autre possibilité serait d'utiliser un inhibiteur de la première translocation tel que la lactimidomycine. En effet, cet inhibiteur²² permet de stopper le PIC en empêchant l'élongation [Matsuda and Dreher 2006], [Schneider-Poetsch

21. On effectue la moyenne et l'écart-type de toutes les journées d'expériences avec OLElg prises avec les différentes durées de cycle Tc.

22. La lactimidomycine est un inhibiteur qui a une propriété thérapeutique intéressante puisqu'elle empêche la prolifération des cellules cancéreuses du sein *in vitro* et *in vivo*

et al. 2010].

La dispersion des données des marqueurs verts est difficile à comprendre. On pourrait peut être utiliser un autre laser avec une autre couleur (ex=bleu à la longueur d'onde 488nm). On hybriderait sur A6 les mêmes oligos UP49, DN120 mais B (blue) excitable avec le LASER bleu. Si l'on obtient des temps compatibles, peu dispersés avec les oligos rouges on pourrait exploiter l'histogramme de la différence des temps t_1 pour retrouver la vitesse de scanning SR.

5.5.2 La tige-boucle

Nos résultats montrent que la tige-boucle conduit à un fort ralentissement du phénomène de scanning au niveau de celle-ci. Ce résultat est différent des études faites *in vitro* par d'autres équipes [Kozak 1986], [Kozak 1989], [Leppek et al. 2018], [Vassilenko et al. 2011], [Babendure et al. 2006]. En effet, la tige-boucle employée ici a une stabilité faible (inférieure à -30 kCal/mol) et est située à un emplacement qui n'est pas censé perturber l'efficacité de la traduction eucaryote. Une hypothèse éventuelle est que la différence d'efficacité est due à nos ARNm qui contiennent une IRES contrairement aux expériences menées par d'autres équipes qui ont utilisé des ARNm coiffés.

Avec notre méthode de mesure, on peut potentiellement observer l'effet de la tige-boucle sur l'emplacement au niveau de la 5'UTR. Des études *in vitro* [Kozak 1989],[Babendure et al. 2006], [Kozak 1990], [Wang et al. 2022] ont montré que l'emplacement de la tige-boucle pouvait avoir un effet inhibiteur ou augmenter l'efficacité de la traduction. L'emplacement et la stabilité de la tige-boucle en 5'UTR peuvent être un moyen pertinent pour réguler l'efficacité de traduction.

5.5.3 Elongation

Nos résultats illustrent que l'on rentre en phase d'élongation (voir figure 5.16). Pour confirmer cette observation, on pourrait imaginer utiliser un inhibiteur qui agit uniquement sur les facteurs d'élongation utilisés par le ribosome lors de la traduction et qui est inerte face aux autres facteurs d'initiation. On peut penser à nouveau à la lactimidomycine et à la cycloheximide qui permettent de bloquer l'élongation au bout de la 3ème translocation ([Matsuda and Dreher 2006], [Schneider-Poetsch et al. 2010]). Au cours de cette expérience, si nous observons des départs de OLeIG sur A6 qui sont à la même hauteur que le contrôle, cela serait une preuve suffisante pour l'entrée en élongation du ribosome.

Par ailleurs, le marqueur OLeIG semble être détaché avant le marqueur UP49G. Donc, il est possible comme on l'a dit qu'il y a une compétition entre deux mécanismes d'initiation. On n'a pas le moyen de distinguer les départs des deux types d'initiation. Les temps caractéristiques obtenus pour ce marqueur OLeIG sont difficiles à être interprétés. En effet, on a une grande incertitude due à la dispersion des données et à un manque de statistique. L'idéal serait de refaire plusieurs journées d'expériences pour augmenter le jeu de données.

Il serait aussi intéressant de mettre un oligo OLeIR à la place du primer OLeIG. On pourrait voir si son temps de départ est cohérent avec les autres oligos rouges (49,82 et 120 ou avec 174). Si les temps obtenus pour le primer 174R et OLeIR sont cohérents, cela donnerait plus de crédibilité à notre hypothèse sur une éventuelle initiation non IRES dépendante qui rentre en jeu. On pourrait également déterminer la partie du temps long correspondant uniquement au temps de recrutement de la grande sous-unité 60S.

5.6 Conclusion du chapitre

Les résultats obtenus *in vitro* avec la méthode de la molécule unique avec le TIRFm dans ce manuscrit de thèse ont pu répondre aux questionnements posés par nos collaborateurs biologistes. On a pu mesurer une vitesse de scanning du PIC 43S pour les marqueurs rouges. Cette vitesse de scanning est constante pour les positions 49, 82 et 120. Ceci suggère que le ribosome avance à la même vitesse sur 5'UTR. On a également pu montrer le fort ralentissement du scanning avec la tige-boucle introduite dans la séquence 5'UTR. Finalement, on a pu observer que le ribosome rentrait en phase d'élongation. Pour avoir plus d'informations sur nos observations, l'idéal serait de poursuivre les expérimentations comme on l'a précisé dans le paragraphe discussion. En effet, l'étude de l'étape d'initiation avec le scanning sur la zone 5'UTR nous a permis de voir que l'on peut potentiellement réguler l'efficacité de la traduction *in vitro* avec des structures secondaires.

Conclusion générale

Au cours de ce projet de thèse nous avons étudié le phénomène de scanning eucaryote sur des ARNm à IRES à l'aide de la microscopie de fluorescence TIRF en molécule unique.

Nous avons expliqué l'intérêt de l'étude du phénomène de la traduction. En effet, un défaut dans la régulation de ce procédé peut entraîner des maladies comme certains cancers tels que le cancer du sein. On a également vu pourquoi il était primordial d'étudier des initiations non canoniques telles que les initiations IRES dépendantes. Effectivement, sous certaines conditions de stress cellulaire comme l'apoptose, la cellule aura recours à des structures IRES pour maintenir son bon fonctionnement si la voie classique (avec la coiffe) est bloquée. Par ailleurs, l'initiation est l'étape de la traduction qui est la plus limitante. Donc, avoir une connaissance précise de son déroulement et des différents acteurs peut permettre de comprendre la régulation de la synthèse peptidique. En effet, l'introduction de séquences structurées telles qu'une tige-boucle dans la région 5'UTR de l'ARNm pouvait avoir un effet inhibiteur sur la traduction. Comprendre ce phénomène peut donc ouvrir de futures perspectives pour des solutions thérapeutiques.

Nous avons effectué une étude en molécule unique avec la microscopie de réflexion totale interne (TIRF). L'étude en molécule unique nous donne des informations sur la dispersion de la vitesse de scanning que l'on n'obtient pas avec une méthode de mesure d'ensemble. En effet, tous les ribosomes ne vont pas commencer la traduction en même temps et ils n'iront pas forcément à la même vitesse.

Nous utilisons le TIRF qui a été conçu par l'équipe avant mon arrivée. L'avantage de ce microscope est que c'est une technique à champ large. Le TIRF permet d'observer des milliers de systèmes biologiques simultanément. Cet outil est idéal pour observer les molécules uniques. En effet, il permet de faire un sectionnement spatial axial car il permet d'exciter uniquement les molécules confinées sur un fin volume de l'ordre de 100 nm au-dessus de la lamelle de verre. Ainsi, ce microscope permet d'augmenter le rapport signal à bruit en diminuant le fond de fluorescence avec le sectionnement spatial. Cependant, ce microscope nécessite que les échantillons soient marqués et accrochés à la lame. Il existe plusieurs méthodes de marquage plus ou moins directes pour l'étude de la traduction. L'équipe a choisi le marquage de l'ARNm avec deux primers qui peuvent être excités avec le montage TIRF. Les primers ou oligofluorophores sont des oligonucléotides couplés à des fluorophores excitables avec nos deux LASER. Notons que notre méthode de marquage est moins invasive et risque de moins gêner la traduction comparé à des méthodes plus directes. L'accroche spécifique des ARNm est réalisée par une chimie de surface.

En regardant les instants de départs de nos primers, on peut en extraire la cinétique de scanning.

Notons qu'au cours de la thèse des améliorations ont été apportées au montage TIRF. En effet, un travail a été réalisé sur la cellule microfluidique et le scotch afin de déterminer avec précision l'instant d'arrivée de l'extrait cellulaire (RRL) qui est notre instant initial pour la prise de mesure. Par ailleurs, deux élargisseurs de faisceaux appelés FLAT Top ont été utilisés sur les deux voies d'excitation rouge et vert. On envoie seulement le centre élargi du faisceau gaussien qui a une intensité quasi-homogène. En effet, l'objectif a été d'homogénéiser l'éclairage de la surface d'observation afin que le taux de photoblanchiment soit le même partout. Effectivement, une des sources de bruit qu'on a voulu minimiser était le photoblanchiment.

Le montage nous a donc permis d'effectuer nos mesures de cinétiques de scanning. L'analyse et le traitement des données avec un modèle statistique nous a permis d'extraire les cinétiques de départ.

Nous avons pu mesurer avec notre méthode en molécule unique une vitesse de scanning sur ARNm à IRES EMCV de 8-10 nt/s et des temps d'interaction avec l'IRES de 16-22s. Grâce à notre méthode nous avons également pu voir l'effet d'une tige-boucle en 5'UTR qui induit un fort ralentissement du PIC. Ainsi, l'introduction d'une tige-boucle peut être une manière de réguler la synthèse peptidique. Nous avons aussi montré que le ribosome entrain en phase d'élongation. Tous ces résultats ont été obtenus avec notre méthode d'étude qui est plus simple à être mise en oeuvre comparée à l'étude faite sur le scanning par WANG [Wang et al. 2022]. Ils ont également mesuré des vitesses de scanning in vitro mais avec des procédés onéreux (ZMW) et des méthodes FRET (avec deux paires) qui sont laborieuses à être mises en oeuvre.

Nos résultats nous ouvrent donc de nouvelles perspectives expérimentales comme on l'a explicité dans le chapitre 5 (voir chapitre 5.5). Nous pouvons faire de nouvelles expériences :

- pour infirmer ou valider nos hypothèses sur la présence d'un autre mécanisme d'initiation avec une cinétique différente en changeant d'emplacement le codon START dans la séquence.
- utiliser le laser bleu à la place du vert pour comprendre d'où provient la dispersion des données. Il faudrait donc hybrider des oligofluorophores qui ont la même séquence que les oligos verts mais ayant des fluorophores compatibles avec le laser bleu.
- changer l'emplacement et la stabilité de la tige boucle afin de quantifier l'effet sur la traduction.
- utiliser un inhibiteur de la translocation pour bloquer le ribosome avant l'élongation afin de prouver que l'on a bien une entrée en phase d'élongation.
- utiliser un oligo OLeIR à la place de OLeIG pour savoir si son instant de départ est cohérent avec les autres primers rouges ou le primer 174R pour comprendre à nouveau si on a affaire à un mécanisme d'initiation autre.

Cette étude se termine donc avec une multitude de suggestions expérimentales pour le futur doctorant qui reprendra la suite.

Annexe A

Données expérimentales supplémentaires

A.1 Cas des contrôles avec les oligofluorophores verts

On a représenté la dispersion des courbes des DCM pour les contrôles verts dans les figures A.1 et A.2. On observe que les courbes des contrôles sont très dispersées pour toutes positions des marqueurs (49 et 120).

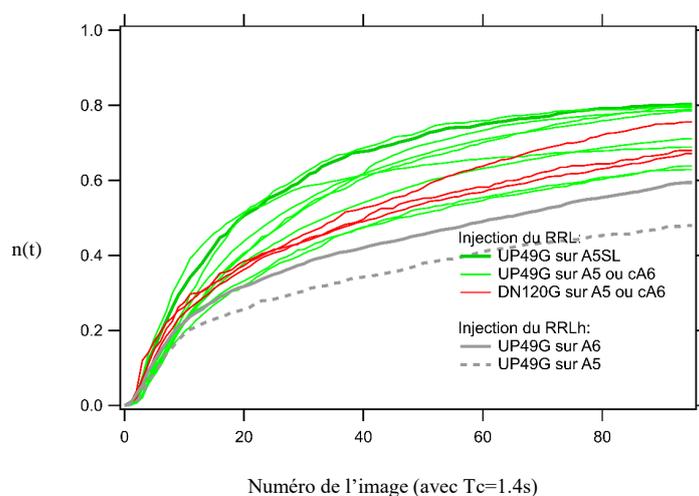


FIGURE A.1 – Superposition des courbes de DCM sur différentes journées d'expériences de contrôle des marqueurs verts sur les différentes positions : 49 et 120. Les contrôles hippuristanol y sont représentés.

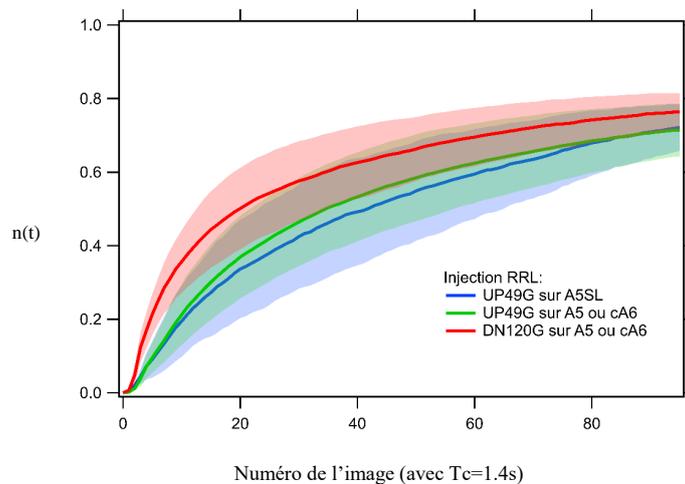


FIGURE A.2 – Superposition des différentes courbes de moyennes pondérées de DCM de contrôles des marqueurs verts sur les différentes positions : 49 et 120. La dispersion est représentée en zone colorée.

A.2 Expériences réalisées avec un oligo vert

On peut voir sur la figure A.3 la dispersion des courbes de DCM pour les marqueurs verts.

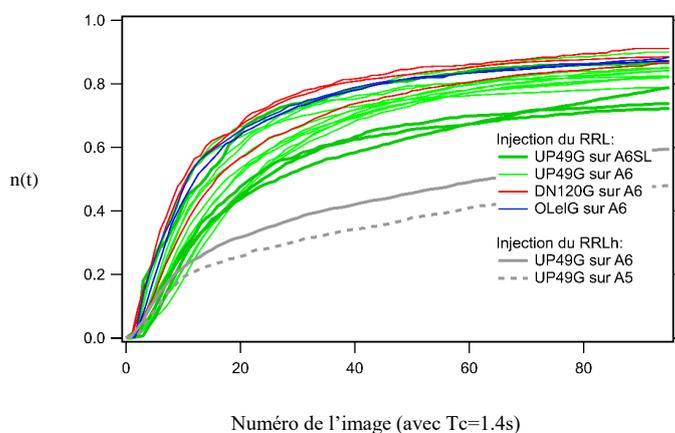


FIGURE A.3 – Superposition des différentes courbes de DCM sur différentes journées d'expériences de scanning des marqueurs verts. Les contrôles hippuristanol sur A6 et A5 sont représentés.

A.3 Etude des positions 49 et 174

A.3.1 Position 49

On a représenté sur la figure A.4 toutes les courbes de DCM pour la position 49. On observe les départs des oligos UP49G sur A6 et A6SL et des oligos UP49R sur A6. On observe pratiquement la même dispersion.

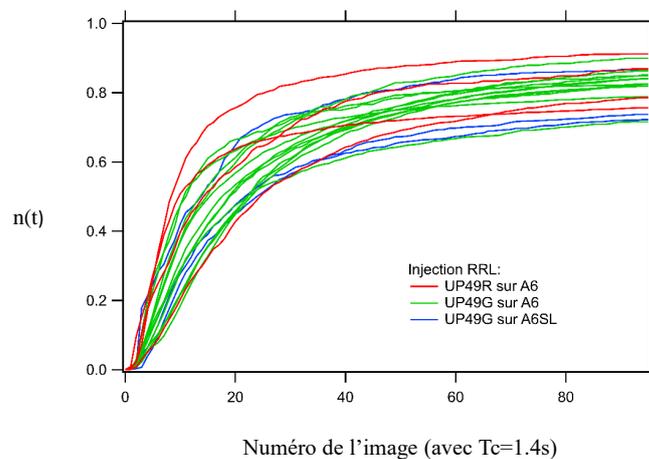


FIGURE A.4 – Superposition des différentes courbes de DCM sur différentes journées d'expériences de scanning du marqueur UP49 sur A6 et A6SL

A.3.2 Position 174

On a placé le marqueur 174R et on étudie son comportement pour différentes durées de cycle $T_c=1.4$ s et 2.8 s. Nous observons que l'écart entre les courbes de contrôle et d'expérience augmente avec l'augmentation de la durée de cycle. En effet, lorsqu'on augmente l'intervalle de temps entre deux images consécutives prises dans la même couleur, on observe plus de départs qui sont dus au phénomène biologique.

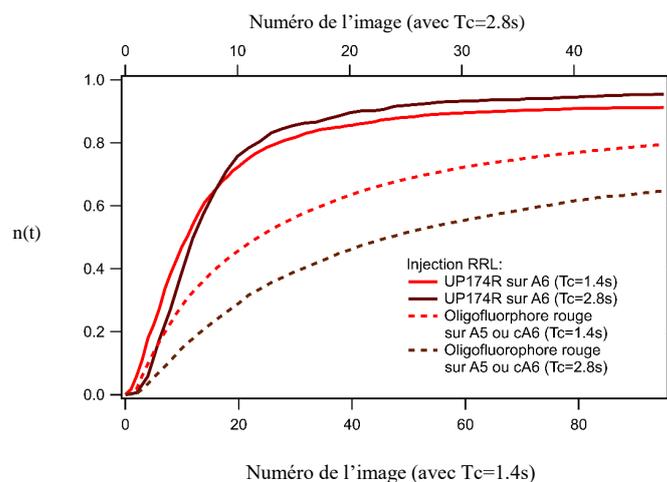


FIGURE A.5 – Superposition des différentes courbes de moyennes pondérées de DCM du marqueur UP174R pour différentes durées d’acquisition ($T_c=2.8s$ et $1.4s$)

A.4 Expériences réalisées avec les oligos rouge

On peut voir sur la figure A.6 la dispersion des courbes de DCM pour les marqueurs rouges.

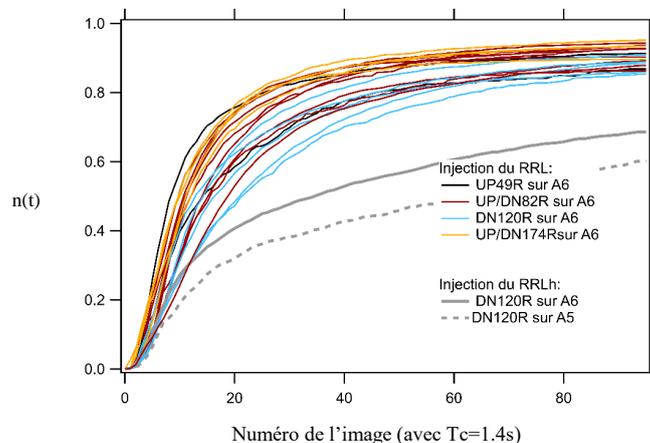


FIGURE A.6 – Superposition des différentes courbes de DCM sur différentes journées d’expériences de scanning des marqueurs rouges. Les contrôles hippuristanol sur A6 et A5 sont représentés

A.5 Cas de la position 120 et influence de la tige-boucle

Nous avons tracé les courbes de DCM des marqueurs DN120R sur A6 et A6SL et DN120G sur A6 (voir figure A.7). Les courbes de DN120G et DN120R sur A6 ne se superposent pas parfaitement. Par ailleurs, on observe que

la courbe de DN120R sur A6SL est bien plus basse que les autres courbes. En effet, on s'attend à voir une difficulté du PIC à ouvrir la tige-boucle.

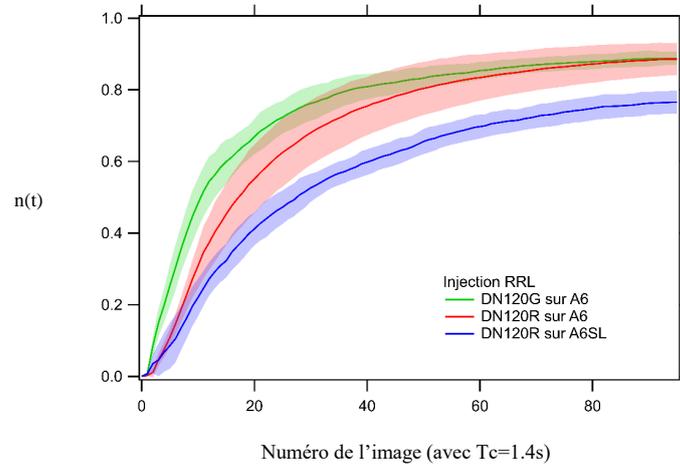


FIGURE A.7 – Superposition des différentes courbes de moyennes pondérées de DCM des différentes journées d'expériences de scanning des marqueurs DN120R sur A6 et A6SL et DN120G sur A6. La dispersion est représentée.

A.6 Influence de la durée de cycle d'acquisition

Pour les expériences réalisées à $T_c=1.4$ s, nous avons vu que la courbe de DCM de DN120G sur A6SL est au même niveau que la courbe globale de contrôle rouge (voir figure 5.14c). En effet, on se retrouve avec des départs dominés par photoblanchiment car on prend des images "trop souvent". Donc, on a effectué des séries d'expériences avec différentes valeurs de durées de cycle $T_c=1.4, 2.8$ et $5.6s$. On voit que lorsqu'on choisit d'avoir une résolution temporelle moins importante en augmentant la durée de cycle que l'écart entre les courbes de contrôles et d'expériences augmente (voir figures A.8 et A.9). La différence dans la proportion de départs entre A6SL/A5SL par lecture graphique est de :

- 5% pour $T_c=1.4s$
- 9% pour $T_c=2.8s$
- 8% pour $T_c=5.6s$

On observe bien une augmentation de la proportion de départs entre A6SL et A5SL avec l'augmentation de la durée de cycle T_c . Cependant, on se rend compte qu'il n'y a plus beaucoup de différence entre les départs pour les durées de cycle $T_c=2.8$ s et $5.6s$. En effet, on atteint un stade où on est dominé par des départs spontanés. On choisit donc dans notre série d'expériences de prendre une résolution temporelle de $2.8s$ pour le marqueur DN120 sur A6SL.

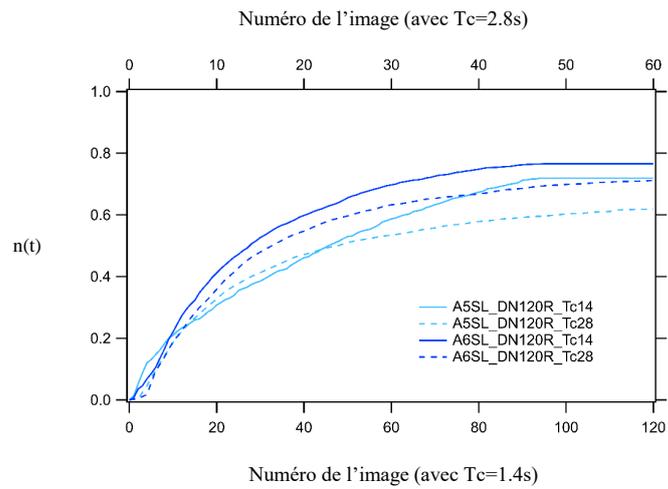


FIGURE A.8 – Comparaison des moyennes pondérées des courbes de DCM du marqueur DN120R sur A6SL et le contrôle A5SL avec des durées de cycles d'acquisition de $T_c=1.4s$ et $2.8s$.

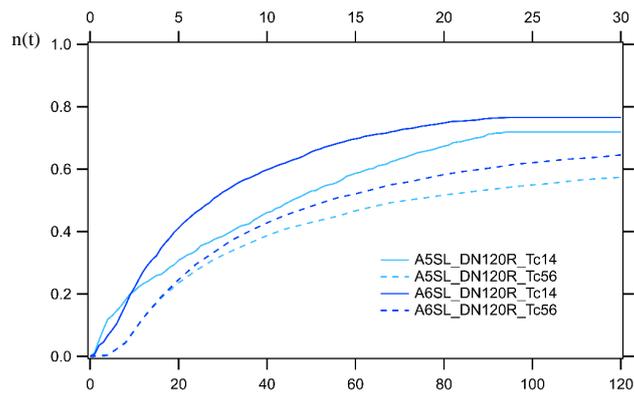


FIGURE A.9 – Comparaison des moyennes pondérées des courbes de DCM du marqueur DN120R sur A6SL et le contrôle A5SL avec des durées de cycles d'acquisition de $T_c=1.4s$ (en bas) et $5.6s$ (en haut).

Annexe B

Protocoles de préparation des échantillons

B.1 Protocole de nettoyage de la cellule microfluidique

A la fin de chaque journée d'expérience, il va falloir démonter la cellule microfluidique et nettoyer la partie réutilisable. Nous devons également nettoyer les lamelles pour une nouvelle expérience.

B.1.1 Nettoyage de la partie réutilisable de la cellule microfluidique

La partie réutilisable de la cellule microfluidique comprend une lame de verre percée de deux trous de 1mm de diamètre espacé de 4 cm. Au niveau des trous sont fixés un réservoir (un embout de pipette pasteur en verre) et un tuyau relié à une aiguille.

A la fin de l'expérience, la cellule est démontée et on récupère la partie réutilisable que l'on laisse incuber un bain de RNaseZAP (Thermo Fisher). On injecte cette solution dans les tuyaux pour les nettoyer. On laisse reposer les cellules une dizaine de minutes avant de les placer dans un bain d'eau distillée pendant 10min. Puis, on les laisse à l'air libre sécher. On peut également faire passer de l'air dans les tuyaux pour retirer les traces d'eau. La partie réutilisable est ainsi prête pour une éventuelle expérience le jour suivant.

B.1.2 Nettoyage des lamelles de microscope

Les lamelles de microscope qui constituent la partie non réutilisable de la cellule microfluidique sont également lavées. En effet, on veut retirer toute trace d'impuretés fluorescentes qui peut ajouter du bruit de fond à notre mesure. Pour cela on effectue le protocole suivant :

- Une vingtaine de lamelles sont disposées dans un rack qui sera disposé dans un récipient.
- On verse de l'acétone pure dans le récipient jusqu'à recouvrir les lamelles que l'on va faire passer dans un bain à ultra-sons pendant 20min.
- On retire l'acétone du récipient puis on y réitère l'opération avec le bain à ultrason avec de l'eau distillée deux fois.
- On laisse sécher les lamelles à l'air libre.

Les lamelles sont donc prêtes pour de nouvelles expériences.

B.2 Protocole pour fabriquer les réservoirs ou joint PDMS

B.2.1 Liste de matériel

- PDMS (Silicone Sylgard 184)
- bécher de 100 mL
- seringues de 10mL et 1mL
- baton de verre pour mélanger
- gants
- cristallisoir de 15 cm de diamètre avec un fond lisse
- pince
- punchers
- moules pour le réservoir

B.2.2 Protocole de préparation du PDMS

Verser 10mL de PDMS pour 1mL de curing agent dans le bécher. Prendre la précaution de verser l'agent goutte à goutte pour éviter les éclaboussures.

Touiller en grattant le fond du bécher avec le baton de verre jusqu'à ce que le mélange soit laiteux. Veuille à ce que le produit ne remonte pas trop sur les bords du récipient.

Mettre le bécher dans le bain à ultrasons pendant 5 min pour mieux homogénéiser le mélange.

Faire dégazer le mélange 30 min sous la cloche à vide.

Pendant ce temps, penser à préchauffer l'étude à 75 °C et préparer le cristallisoir et/ou le moule à réservoir.

Verser le mélange dans le cristallisoir.

Mettre à l'étuve à 75 °C pendant 2h.

Démouler le joint pour le tuyau et le réservoir.

B.2.3 Préparation de la cellule microfluidique

Le réservoir en PDMS et le joint¹ seront punchés et nettoyés avec du scotch pour retirer les traces de doigts. Les surfaces à coller seront placées au plasma cleaner. A la sortie du plasma cleaner, il faut rapidement coller le réservoir et le joint sur la lame de verre au niveau des trous de la lame à l'aide d'un microscope d'observation. Puis, on met les cellules microfluidiques à l'étuve pendant 2 h à 75 °C.

B.3 Préparation de la chimie de surface

B.3.1 Tampons

Pour réaliser la chimie de surface on aura besoin de plusieurs tampons pour diluer des composants chimiques ou rincer la cellule. Les tampons borate et TRIS sont essentiels pour réaliser la chimie de surface.

Tampon Borate

Pour l'injection du mélange de PEG-Silane / PEG-Silane biotinylé il nous faut du tampon Borate.

Recette du Tp Borate pour 100mM

- peser 309 mg de H_3BO_3
- ajouter environ 78 μ L de NaOH à 10M jusqu'à obtenir un pH=8.8
- compléter avec 50 mL d'eau distillée

Préparation du Tp TRIS 5X

- mettre 1.5g de TRIS dans 30mL d'eau distillée. Le pH vaut 11.5
- ajouter quelques mL de HCl à 1M jusqu'à obtenir un pH=7.5.
- mettre 3.62g de NaCl.
- compléter jusqu'à 50mL avec de l'eau distillée. Cette solution peut être conservée à température ambiante.

B.3.2 Protocole pour la chimie de surface

Juste après avoir collé les lamelles de verre activées au plasma cleaner (selon un protocole précis) avec le scotch double face, nous avons environ une dizaine de minutes pour effectuer la chimie de surface. Le protocole est le suivant :

- La première étape de la passivation consiste à prendre un aliquot de PEG-Silane d'environ 20mg (conservé à -80°C) et de le diluer dans 700 μ L de Tp Borate. Puis, on y dilue également un aliquot de PEG-Silane

1. On coupe un petit cube de 0.5cm de côté dans une galette de PDMS d'environ 1mm d'épaisseur.

biotinylé de 5 μ L (dilué à 200g/L dans du méthanol et conservé à -80°C sous forme d'aliquot de 5 μ L). On injecte 40 μ L de ce mélange dans chaque réservoir. On n'oublie pas de remplir les réservoirs avec 100 μ L de tampon de rinçage : le TRIS 1X.

- Après incubation du PEG-Silane et PEG-Silane biotinylé pendant 1h à température ambiante, on rince les cellules avec le TRIS contenu dans les réservoirs.
- On prend un aliquot de neutravidine de 5 μ L (obtenu à partir de 10mg de neutravidine dans 1mL d'eau distillée et conservée au congélateur à -80°C) qu'on complète jusqu'à 400 μ L avec du TRIS. On injecte dans les réservoirs 40 μ L de cette solution. La neutravidine doit incuber au moins 5min dans la cellule à température ambiante.

Ainsi, on a des sites d'accroches spécifiques pour l'ARNm.

B.4 Préparation de l'échantillon

Le système rapporteur biologique doit être préparé pour l'étude en molécule unique avec le TIRFm. En effet, il faut hybrider l'ARNm avec les oligofluorophores et l'oligo biotinylé pour l'accroche spécifique sur la lamelle.

B.4.1 Préparation de la solution mère d'ARNm pour l'hybridation

- 2 μ L ARNm à 5 μ M (1 μ M final)
- 2 μ L oligofluorophore rouge 10 μ M (2 μ M final)
- 2 μ L oligofluorophore vert 10 μ M (2 μ M final)
- 2 μ L oligo-biotinylé 10 μ M (2 μ M final)
- 2 μ L tampon T4DNA ligase

La solution mère est incubée pendant 5min à 68°C, puis 5min à 45°C puis 5min à 0°C.

Afin de travailler en condition de molécule unique nous devons diluer la solution mère afin d'avoir des concentrations finales en espèces marquées de l'ordre du nM. Pour ce faire nous utilisons le Tp R pour la dilution. Son protocole de préparation est le suivant :

Préparation du Tp R (pour 1mL final)

- 80 μ L d'acétate de potassium à 1M
- 20 μ L d'Hepes à 1M (pH=7.5)
- 2.5 μ L d'acétate de magnésium à 1M
- 2 μ L de DTT à 1M
- 895 μ L d'eau ultrapure

Nous diluons l'hybridation avec un facteur 1/2500 ou 1/5000 dans le Tp R en fonction des échantillons. Cette solution fille est incubée pendant 2min à 30 °C. Avant d'injecter cette solution diluée dans l'échantillon, nous rinçons d'abord la cellule avec le Tp R.

Nous nous assurons toujours que l'on a une couverture peu chargée travaillable pour notre étude en molécule unique avant l'injection de l'extrait cellulaire.

B.4.2 Préparation de l'extrait cellulaire

Préparation du RRL

- 17.5 μ L de RRL pur (PROMEGA)
- 6 μ L d'eau ultrapure
- 1 μ L de SuperasIn
- 0.5 μ L d'acides aminés -Cys

Préparation du RRLh

Recette de l'hippuristanol à 62.5 μ M avec 2.5% DMSO

- mettre 1 μ L d'hippuristanol à 10mM dans 4 μ L de DMSO
- puis prendre 0.5 μ L de cette solution dans 20 μ L d'eau ultrapure

Recette du RRL avec hippuristanol

- 17.5 μ L de RRL pur (PROMEGA)
- 5 μ L d'eau ultrapure
- 1 μ L d'hippuristanol à 62.5 μ M avec 2.5% DMSO
- 1 μ L de SuperasIn
- 0.5 μ L d'acides aminés -Cys

B.4.3 Prise de mesure

Nous rinçons dans un premier temps la cellule contenant l'échantillon biologique avec le tampon R. Puis, nous injectons la solution de RRL² au moment de la prise de la mesure de cinétique.

2. L'extrait cellulaire a été au préalable préparé et chauffé à 30 °C.

Bibliographie

- Aitken, C. E. and Lorsch, J. R. (2012). A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19 :568–576.
- Algire, M. A., Maag, D., Savio, P., Acker, M. G., Tarun, S. Z., Sachs, A. B., Asano, K., Nielsen, K. H., Olsen, D. S., Phan, L., et al. (2002). Development and characterization of a reconstituted yeast translation initiation system. *RNA*, 8(3) :382–397.
- Armache, J.-P., Jarasch, A., Anger, A. M., Villa, E., Becker, T., Bhushan, S., Jossinet, F., Habeck, M., Dindar, G., Franckenberg, S., et al. (2010). Cryo-EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(46) :19748–19753.
- Arst Jr, H. N. and Sheerins, A. (1996). Translational initiation competence, 'leaky scanning' and translational reinitiation in *areA* mRNA of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 19(5) :1019–1024.
- Audigier, S., Guiramand, J., Prado-Lourenco, L., Conte, C., Gonzalez-Herrera, I. G., Cohen-Solal, C., Récasens, M., and Prats, A.-C. (2008). Potent activation of FGF-2 IRES-dependent mechanism of translation during brain development. *RNA*, 14(9) :1852–1864.
- Babendure, J. R., Babendure, J. L., Ding, J. H., and Tsien, R. Y. (2006). Control of mammalian translation by mRNA structure near caps. *RNA*, 12 :851–861.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, 289(5481) :905–920.
- Barbier, N. (2017). *Etude des erreurs programmées du ribosome par microscopie de fluorescence en molécule unique*. PhD thesis, Université Paris-Saclay. Thèse de doctorat dirigée par Karen Perronet et Olivier Namy.
- Belin, S., Beghin, A., Solano-González, E., Bezin, L., Brunet-Manquat, S., Textoris, J., Prats, A.-C., Mertani, H. C., Dumontet, C., and Diaz, J.-J. (2009). Dysregulation of ribosome biogenesis and translational capacity is associated with tumor progression of human breast cancer cells. *PLoS ONE*, 4(9) :e7147.

- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*, 334(6062) :1524–1529.
- Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2010). Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science*, 330(6008) :1203–1209.
- Berthelot, K., Muldoon, M., Rajkowitsch, L., Hughes, J., and McCarthy, J. E. (2004). Dynamics and processivity of 40S ribosome scanning on mRNA in yeast. *Molecular Microbiology*, 51 :987–1001.
- Blanchard, S. C. (2009). Single-molecule observations of ribosome function. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(1) :103–109.
- Blanchard, S. C., Gonzalez Jr, R. L., Kim, H. D., Chu, S., and Puglisi, J. D. (2004a). tRNA selection and kinetic proofreading in translation. *Nature structural & Molecular Biology*, 11(10) :1008–1014.
- Blanchard, S. C., Kim, H. D., Gonzalez Jr, R. L., Puglisi, J. D., and Chu, S. (2004b). tRNA dynamics on the ribosome during translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(35) :12893–12898.
- Bochkov, Y. A. and Palmenberg, A. C. (2006). Translational efficiency of EMCV IRES in bicistronic vectors is dependent upon IRES sequence and gene location. *BioTechniques*, 41(3) :283–292.
- Bordeleau, M.-E., Mori, A., Oberer, M., Lindqvist, L., Chard, L. S., Higa, T., Belsham, G. J., Wagner, G., Tanaka, J., and Pelletier, J. (2006). Functional characterization of IRESes by an inhibitor of the RNA helicase eIF4A. *Nature chemical biology*, 2(4) :213–220.
- Boulik, M. and Hellmann, W. (1978). Comparison of *Artemia salina* and *Escherichia coli* ribosome structure by electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(6) :2829–2833.
- Braunstein, S., Karpisheva, K., Pola, C., Goldberg, J., Hochman, T., Yee, H., Cangiarella, J., Arju, R., Formenti, S. C., and Schneider, R. J. (2007). A hypoxia-controlled cap-dependent to cap-independent translation switch in breast cancer. *Molecular Cell*, 28(3) :501–512.
- Bugaud, O., Barbier, N., Chommy, H., Fiszman, N., Le Gall, A., Dulin, D., Saguy, M., Westbrook, N., Perronet, K., and Namy, O. (2017). Kinetics of CrPV and HCV IRES-mediated eukaryotic translation using single-molecule fluorescence microscopy. *RNA*, 23(11) :1626–1635.
- Bustamante, C., Cheng, W., and Meija, Y. X. (2011). Revisiting the central dogma one molecule at a time. *Cell*, 144(4) :480–497.
- Capece, M. C., Kornberg, G. L., Petrov, A., and Puglisi, J. D. (2015). A simple real-time assay for in vitro translation. *RNA*, 21 :296–305.

- Carroll, R. and Derse, D. (1993). Translation of equine infectious anemia virus bicistronic tat-rev mRNA requires leaky ribosome scanning of the tat CTG initiation codon. *Journal of virology*, 67(3) :1433–1440.
- Cencica, R. and Pelletier, J. (2016). Hippuristanol - A potent steroid inhibitor of eukaryotic initiation factor 4A. *Translation*, 4 :e1137381.
- Chenik, M., Chebli, K., and Blondel, D. (1995). Translation initiation at alternate in-frame AUG codons in the rabies virus phosphoprotein mRNA is mediated by a ribosomal leaky scanning mechanism. *Journal of virology*, 69(2) :707–712.
- Conte, C., Ainaoui, N., Delluc-Clavieres, A., Khoury, M. P., Azar, R., Pujol, F., Martineau, Y., Pyronnet, S., and Prats, A.-C. (2009). Fibroblast growth factor 1 induced during myogenesis by a transcription–translation coupling mechanism. *Nucleic Acids Research*, 37(16) :5267–5278.
- Cornelis, S., Bruynooghe, Y., Denecker, G., Van Huffel, S., Tinton, S., and Beyaert, R. (2000). Identification and characterization of a novel cell cycle–regulated internal ribosome entry site. *Molecular Cell*, 5(4) :597–605.
- Davidovits, P. and Egger, M. D. (1969). Scanning laser microscope. *Nature*, 223(5208) :831–831.
- Ferguson, A., Wang, L., Altman, R. B., Terry, D. S., Juette, M. F., Burnett, B. J., Alejo, J. L., Dass, R. A., Parks, M. M., Vincent, C. T., et al. (2015). Functional dynamics within the human ribosome regulate the rate of active protein synthesis. *Molecular Cell*, 60(3) :475–486.
- Fizman, N. (2013). *Etude de la cinétique de la traduction eucaryote à l'échelle de la molécule unique*. PhD thesis, Institut d'Optique. Thèse de doctorat dirigée par Nathalie Westbrook.
- Fuchs, G., Petrov, A. N., Marceau, C. D., Popov, L. M., Chen, J., O'Leary, S. E., Wang, R., Carette, J. E., Sarnow, P., and Puglisi, J. D. (2015). Kinetic pathway of 40S ribosomal subunit recruitment to hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(2) :319–325.
- Gebauer, F. and Hentze, M. W. (2004). Molecular mechanisms of translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5 :827–835.
- Gonzalez-Herrera, I. G., Prado-Lourenco, L., Pileur, F., Conte, C., Morin, A., Cabon, F., Prats, H., Vagner, S., Bayard, F., Audigier, S., et al. (2006). Testosterone regulates FGF-2 expression during testis maturation by an IRES dependent translational mechanism. *FASEB Journal*, 20(3) :476–8.
- Halstead, J. M., Lionnet, T., Wilbertz, J. H., Wippich, F., Ephrussi, A., Singer, R. H., and Chao, J. A. (2015). An RNA biosensor for imaging the first round of translation from single cells to living animals. *Science*, 347(6228) :1367–1671.

- Hellen, C. U. and Sarnow, P. (2001). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes & Development*, 15(13) :1593–1612.
- Hinnebusch, A. G. (2014). The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annual Review of Biochemistry*, 83 :779–812.
- Hinnebusch, A. G. (2017). Structural insights into the mechanism of scanning and start codon recognition in eukaryotic translation initiation. *Trends in Biochemical Sciences*, 42 :589–611.
- Holcik, M. and Sonenberg, N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(4) :318–327.
- Hsu, K. S., Guan, B. J., Cheng, X., Guan, D., Lam, M., Hatzoglou, M., and Kao, H. Y. (2016). Translational control of PML contributes to TNF α -induced apoptosis of MCF7 breast cancer cells and decreased angiogenesis in HUVECs. *Cell Death and Differentiation*, 23 :469–483.
- Iwasaki, S. and Ingolia, N. T. (2017). The growing toolbox for protein synthesis studies. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(8) :612–624.
- Jackson, R. J. (2013). The current status of vertebrate cellular mRNA IRESs. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(2) :a011569.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11 :113–127.
- Joo, C., Balci, H., Ishitsuka, Y., Buranachai, C., and Ha, T. (2008). Advances in single-molecule fluorescence methods for molecular biology. *Annual Review of Biochemistry*, 77 :51–76.
- Kaminski, A., Howell, M., and Jackson, R. (1990). Initiation of encephalomyocarditis virus RNA translation : the authentic initiation site is not selected by a scanning mechanism. *The EMBO journal*, 9(11) :3753–3759.
- Kearse, M. G. and Wilusz, J. E. (2017). Non-AUG translation : a new start for protein synthesis in eukaryotes. *Genes & development*, 31(17) :1717–1731.
- Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., Arpagaus, S., and Ban, N. (2011). Crystal structure of the eukaryotic 60 S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6. *Science*, 334(6058) :941–948.
- Koch, A., Aguilera, L., Morisaki, T., Munsky, B., and Stasevich, T. J. (2020). Quantifying the dynamics of IRES and cap translation with single-molecule resolution in live cells. *Nature structural & molecular biology*, 27(12) :1095–1104.

- Kozak, M. (1978). How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell*, 15(4) :1109–1123.
- Kozak, M. (1986). Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(9) :2850–2854.
- Kozak, M. (1989). Circumstances and Mechanisms of Inhibition of Translation by Secondary Structure in Eucaryotic mRNAs. *Molecular and Cellular Biology*, 9(11) :5134–5142.
- Kozak, M. (1990). Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87 :8301–8305.
- Kozak, M. (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene*, 299(1-2) :1–34.
- Lacerda, R., Menezes, J., and Romão, L. (2017). More than just scanning : the importance of cap-independent mRNA translation initiation for cellular stress response and cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74 :1659–1680.
- Lapointe, C. P., Grosely, R., Johnson, A. G., Wang, J., Fernández, I. S., and Puglisi, J. D. (2021a). Dynamic competition between sars-cov-2 nsp1 and mrna on the human ribosome inhibits translation initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(6) :e2017715118.
- Lapointe, C. P., Grosely, R., Johnson, A. G., Wang, J., Fernández, I. S., and Puglisi, J. D. (2021b). Dynamic competition between SARS-CoV-2 NSP1 and mRNA on the human ribosome inhibits translation initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118.
- Leppek, K., Das, R., and Barna, M. (2018). Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nature reviews Molecular Cell biology*, 19(3) :158–174.
- Levene, M. J., Korlach, J., Turner, S. W., Foquet, M., Craighead, H. G., and Webb, W. W. (2003). Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science*, 299(5607) :682–686.
- Lomakin, I. B. and Steitz, T. A. (2013). The initiation of mammalian protein synthesis and mRNA scanning mechanism. *Nature*, 500 :307–311.
- Mailliot, J. and Martin, F. (2018). Viral internal ribosomal entry sites : four classes for one goal. *Wiley Interdisciplinary Reviews : RNA*, 9 :e1458.
- Matsuda, D. and Dreher, T. W. (2006). Close spacing of AUG initiation codons confers dicistronic character on a eukaryotic mRNA. *RNA*, 12 :1338–1349.

- Mattick, J. S. (2003). Challenging the dogma : The hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *BioEssays*, 25 :930–939.
- Mattick, J. S. (2004). RNA regulation : a new genetics ? *Nature Reviews Genetics*, 5 :316–323.
- Mercado, N. B., Zahn, R., Wegmann, F., Loos, C., Chandrashekar, A., Yu, J., Liu, J., Peter, L., McMahan, K., Tostanoski, L. H., et al. (2020). Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature*, 586(7830) :583–588.
- Merrick, W. C. and Pavitt, G. D. (2018). Protein synthesis initiation in eukaryotic cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(12) :a033092.
- Miao, Z., Tidu, A., Eriani, G., and Martin, F. (2021). Secondary structure of the SARS-CoV-2 5'-UTR. *RNA Biology*, 18(4) :447–456.
- Morfoisse, F., Kuchnio, A., Frainay, C., Gomez-Brouchet, A., Delisle, M.-B., Marzi, S., Helfer, A.-C., Hantelys, F., Pujol, F., Guillermet-Guibert, J., et al. (2014). Hypoxia induces VEGF-C expression in metastatic tumor cells via a HIF-1 α -independent translation-mediated mechanism. *Cell Reports*, 6(1) :155–167.
- Morisaki, T., Lyon, K., Deluca, K. F., Deluca, J. G., English, B. P., Zhang, Z., Lavis, L. D., Grimm, J. B., Viswanathan, S., Looger, L. L., Lionnet, T., and Stasevich, T. J. (2016). Real-time quantification of single RNA translation dynamics in living cells. *Science*, 352 :6292.
- Nakagawa, S., Niimura, Y., Miura, K.-i., and Gojobori, T. (2010). Dynamic evolution of translation initiation mechanisms in prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(14) :6382–6387.
- Ng, M. Y., Zhang, H., Weil, A., Singh, V., Jamiolkowski, R., Baradaran-Heravi, A., Roberge, M., Jacobson, A., Friesen, W., Welch, E., et al. (2018). New in vitro assay measuring direct interaction of nonsense suppressors with the eukaryotic protein synthesis machinery. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 9(12) :1285–1291.
- O'Leary, S. E., Petrov, A., Chen, J., and Puglisi, J. D. (2013). Dynamic recognition of the mRNA cap by *Saccharomyces cerevisiae* eIF4E. *Structure*, 21(12) :2197–2207.
- Pause, A. and Sonenberg, N. (1992). Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase : the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *The EMBO Journal*, 11(7) :2643–2654.
- Pestova, T. V., Lorsch, J. R., and Hellen, C. U. (2007). The mechanism of translation initiation in eukaryotes. *Cold Spring Harbor Monograph Series*, 48 :87.
- Petrov, A., Chen, J., O'Leary, S., Tsai, A., and Puglisi, J. D. (2012). Single-molecule analysis of translational dynamics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9) :a011551.

- Petrov, A., Grosely, R., Chen, J., O'Leary, S. E., and Puglisi, J. D. (2016). Multiple parallel pathways of translation initiation on the CrPV IRES. *Molecular Cell*, 62(1) :92–103.
- Petrov, A. and Puglisi, J. D. (2010). Site-specific labeling of *saccharomyces cerevisiae* ribosomes for single-molecule manipulations. *Nucleic acids research*, 38(13) :e143–e143.
- Piccirillo, C. A., Bjur, E., Topisirovic, I., Sonenberg, N., and Larsson, O. (2014). Translational control of immune responses : from transcripts to translatoemes. *Nature Immunology*, 15(6) :503–511.
- Pisarev, A. V., Unbehaun, A., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. (2007). Assembly and analysis of eukaryotic translation initiation complexes. In *Methods in Enzymology*, volume 430, pages 147–177. Elsevier.
- Pyronnet, S., Pradayrol, L., and Sonenberg, N. (2000). A cell cycle–dependent internal ribosome entry site. *Molecular Cell*, 5(4) :607–616.
- Raven, P. H., Johnson, G. B., Mason, K. A., Losos, J. B., and Singer, S. R. (2017). *Biologie, 4ème édition*. de Boeck.
- Ringnér, M. and Krogh, M. (2005). Folding Free Energies of 5'-UTRs Impact Post-Transcriptional Regulation on a Genomic Scale in Yeast. *PLoS Computational Biology*, 1(7) :1–8.
- Saini, A. K., Nanda, J. S., Lorsch, J. R., and Hinnebusch, A. G. (2010). Regulatory elements in eIF1A control the fidelity of start codon selection by modulating tRNA^{iMet} binding to the ribosome. *Genes and Development*, 24 :97–110.
- Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D. E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W. C., Green, R., Shen, B., and Liu, J. O. (2010). Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nature Chemical Biology*, 6(3) :209–217.
- Schüler, M., Connell, S. R., Lescoute, A., Giesebrecht, J., Dabrowski, M., Schroeer, B., Mielke, T., Penczek, P. A., Westhof, E., and Spahn, C. M. (2006). Structure of the ribosome-bound cricket paralysis virus IRES RNA. *Nature Structural and Molecular Biology*, 13 :1092–1096.
- Shah, P., Ding, Y., Niemczyk, M., Kudla, G., and Plotkin, J. B. (2013). Rate-limiting steps in yeast protein translation. *Cell*, 153 :1589.
- Shatsky, I. N., Dmitriev, S. E., Terenin, I. M., and Andreev, D. (2010). Cap-and IRES-independent scanning mechanism of translation initiation as an alternative to the concept of cellular IRESs. *Molecules and cells*, 30 :285–293.
- Silvera, D., Formenti, S. C., and Schneider, R. J. (2010). Translational control in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10 :254–266.

- Sokabe, M. and Fraser, C. S. (2017). A helicase-independent activity of eIF4A in promoting mRNA recruitment to the human ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(24) :6304–6309.
- Sonenberg, N. and Hinnebusch, A. G. (2007). New modes of translational control in development, behavior, and disease. *Molecular Cell*, 28(5) :721–729.
- Sonenberg, N. and Hinnebusch, A. G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes : mechanisms and biological targets. *Cell*, 136(4) :731–745.
- Sun, Y., Atas, E., Lindqvist, L., Sonenberg, N., Pelletier, J., and Meller, A. (2012). The eukaryotic initiation factor eIF4H facilitates loop-binding, repetitive RNA unwinding by the eIF4A DEAD-box helicase. *Nucleic Acids Research*, 40(13) :6199–6207.
- Sun, Y., Atas, E., Lindqvist, L. M., Sonenberg, N., Pelletier, J., and Meller, A. (2014). Single-molecule kinetics of the eukaryotic initiation factor 4A upon RNA unwinding. *Structure*, 22(7) :941–948.
- Svitkin, Y. V., Pause, A., Haghighat, A., Pyronnet, S., Witherell, G., Belsham, G. J., and Sonenberg, N. (2001). The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5'secondary structure. *RNA*, 7(3) :382–394.
- Tinoco, I. and Gonzalez, R. L. (2011). Biological mechanisms, one molecule at a time. *Genes & Development*, 25(12) :1205–1231.
- Topisirovic, I. and Sonenberg, N. (2011). mRNA translation and energy metabolism in cancer : the role of the MAPK and mTORC1 pathways. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 76 :355–367.
- Trachsel, H., Erni, B., Schreier, M. H., and Staehelin, T. (1977). Initiation of mammalian protein synthesis : II. The assembly of the initiation complex with purified initiation factors. *Journal of Molecular Biology*, 116(4) :755–767.
- Truniger, V., Miras, M., and Aranda, M. A. (2017). Structural and functional diversity of plant virus 3'-cap-independent translation enhancers (3'-CITEs). *Frontiers in Plant Science*, 8 :2047.
- van der Velden, A. W., van Nierop, K., Voorma, H. O., and Thomas, A. A. (2002). Ribosomal scanning on the highly structured insulin-like growth factor II-leader 1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(3) :286–297.
- Vassilenko, K. S., Alekhina, O. M., Dmitriev, S. E., Shatsky, I. N., and Spirin, A. S. (2011). Unidirectional constant rate motion of the ribosomal scanning particle during eukaryotic translation initiation. *Nucleic Acids Research*, 39 :5555–5567.
- Wang, C., Han, B., Zhou, R., and Zhuang, X. (2016). Real-time imaging of translation on single mRNA transcripts in live cells. *Cell*, 165(4) :990–1001.

- Wang, H., Sun, L., Gaba, A., and Qu, X. (2020). An in vitro single-molecule assay for eukaryotic cap-dependent translation initiation kinetics. *Nucleic Acids Research*, 48 :e6.
- Wang, J., Shin, B.-S., Alvarado, C., Kim, J.-R., Bohlen, J., Dever, T. E., and Puglisi, J. D. (2022). Rapid 40S scanning and its regulation by mRNA structure during eukaryotic translation initiation. *Cell*, 185 :e17.
- Wu, B., Eliscovich, C., Yoon, Y. J., and Singer, R. H. (2016). Translation dynamics of single mRNAs in live cells and neurons. *Science*, 352(6292) :1430–1435.
- Yan, X., Hoek, T. A., Vale, R. D., and Tanenbaum, M. E. (2016). Dynamics of translation of single mRNA molecules in vivo. *Cell*, 165(4) :976–989.