

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

Sommaire

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

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

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

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

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

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

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

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

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

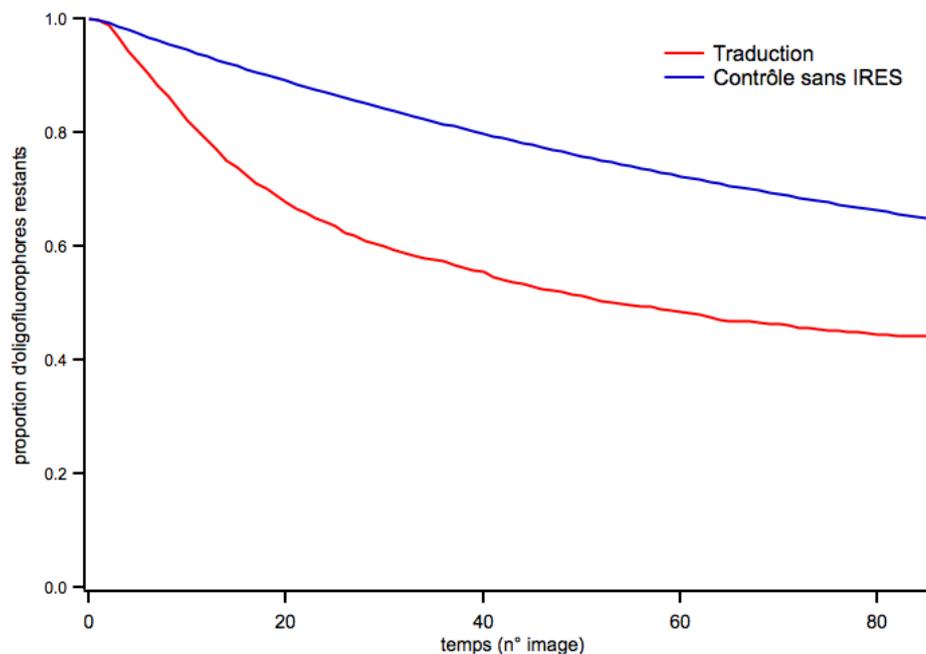


FIGURE 4.1 – Courbes de départs cumulés des oligofluorophores dans le rouge pour l'expérience de traduction (en rouge) et l'expérience de contrôle sans la structure IRES (en bleu).

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

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

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

4.1.1.2 Variabilité de l'acquisition cinétique

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

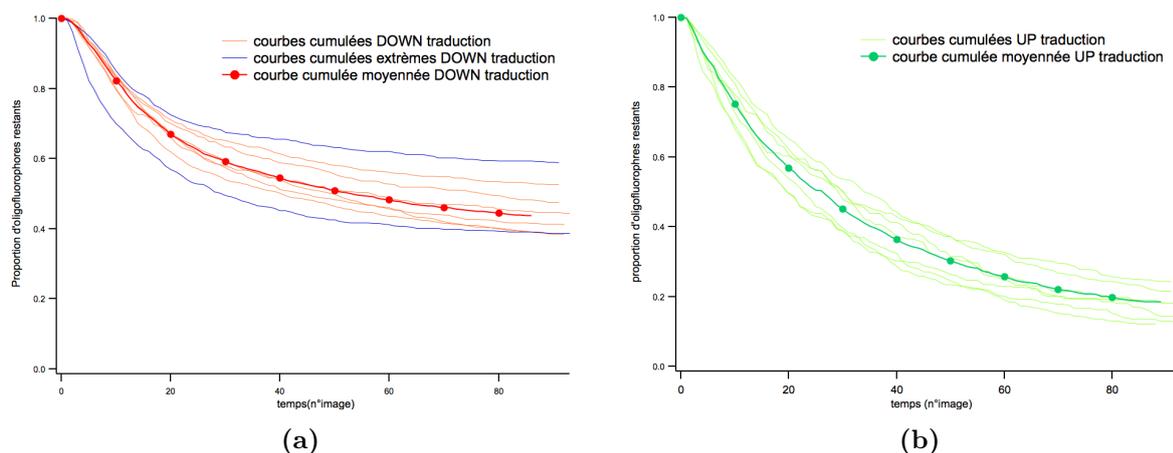


FIGURE 4.2 – (a) Ensemble des courbes de départs cumulés dans le rouge acquises sur une même journée d'expérience et dans des conditions expérimentales identiques. La courbe avec des marqueurs cercles est la moyenne pondérée de l'ensemble de ces acquisitions, mis à part les deux courbes bleues exclues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

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

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

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

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

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

4.1.2 Cinétiques de départs : histogramme et départs instantanés

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

4.1.2.1 Analyse des instants de départ dans une couleur

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

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

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

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

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

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

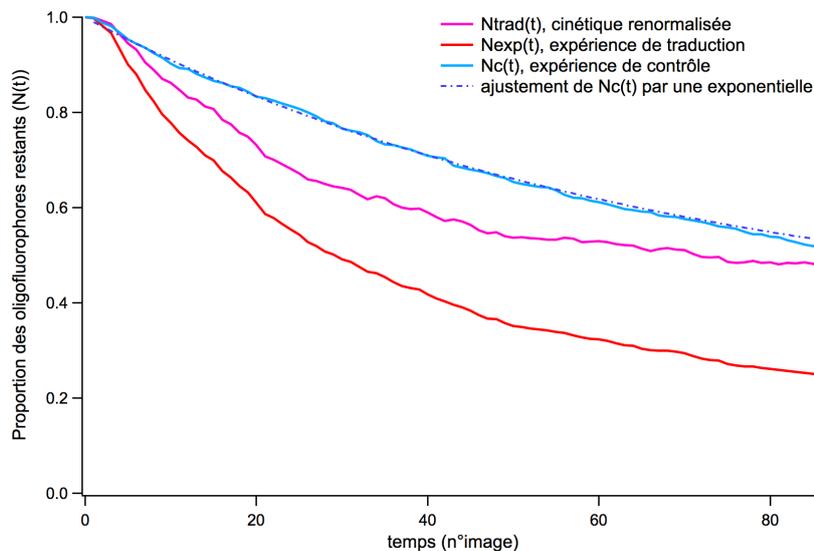


FIGURE 4.3 – Courbes de départs cumulés en fonction du temps pour une expérience de traduction (rouge), de contrôle (pointillés bleus avec en trait plein bleu son ajustement exponentiel) en fonction du temps. La courbe renormalisée est indiquée en fushia.

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

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

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

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

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

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

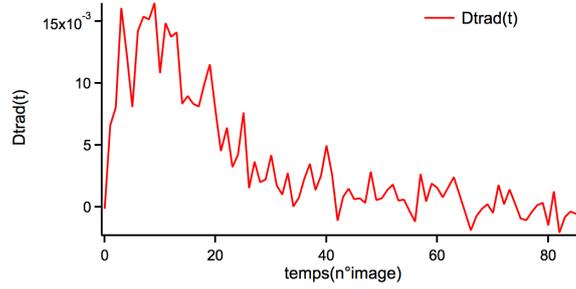


FIGURE 4.4 – Courbe brute représentant le taux de départs instantanés des jalons fluorescents ATTO DOWN en fonction du temps.

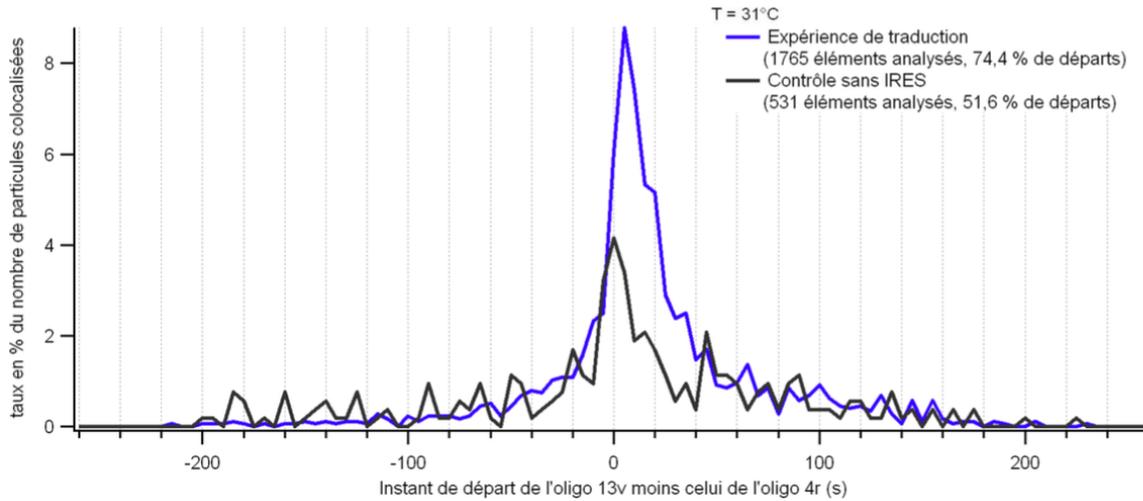


FIGURE 4.5 – Histogrammes des co-départs bruts pour les expériences de traduction (en bleu) et les expériences de contrôle (en noir). Chaque histogramme résulte de la concaténation des histogrammes de plusieurs échantillons afin d'obtenir une statistique suffisante.

4.1.2.2 Histogramme des co-départs

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

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

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

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

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

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

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

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

4.2.1 Système biologique



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

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

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

4.2.2 Une dynamique à deux temps : modélisation des courbes cinétiques

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

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

4.2.2.1 Modélisation de l'histogramme des co-départs

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

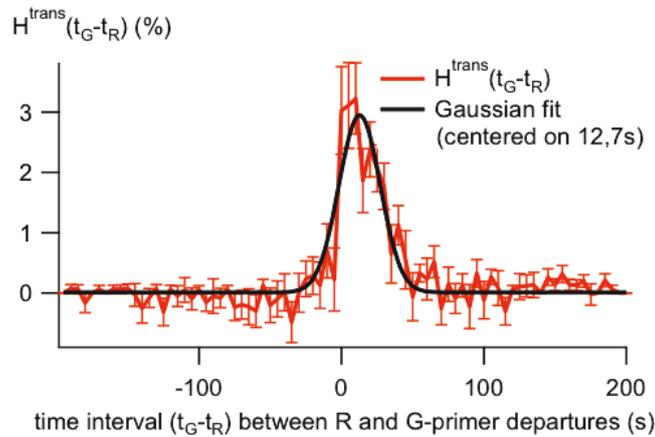


FIGURE 4.7 – Histogramme des co-départs résultant de la soustraction de l'histogramme de contrôle à l'histogramme de traduction. On ajuste cette distribution par une loi gaussienne centrée sur $T_{moy}^{G-DN} - T_{moy}^{R-UP} = 12,7 \pm 0,7s$.

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

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

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

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

4.2.2.2 Modélisation des cinétiques de départs instantanés

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

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

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

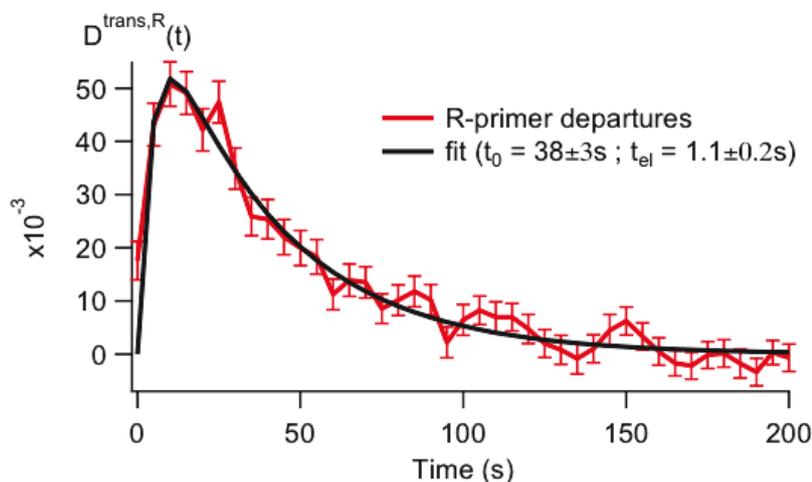


FIGURE 4.8 – Taux de départs instantanés $D^{trad}(t)$ pour le jalon ATR-UP12-(+5) sur un ARNm avec IRES CrPV en fonction du temps, et ajustement par la fonction $\mathcal{D}(t)$ (voir eq. ci-dessous). Les barres d'erreur sont obtenues par une procédure de bootstrap (cf. section 4.2.2.3).

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

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

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

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

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

4.2.2.3 Évaluation des barres d'erreur : bootstrap

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

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

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

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

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

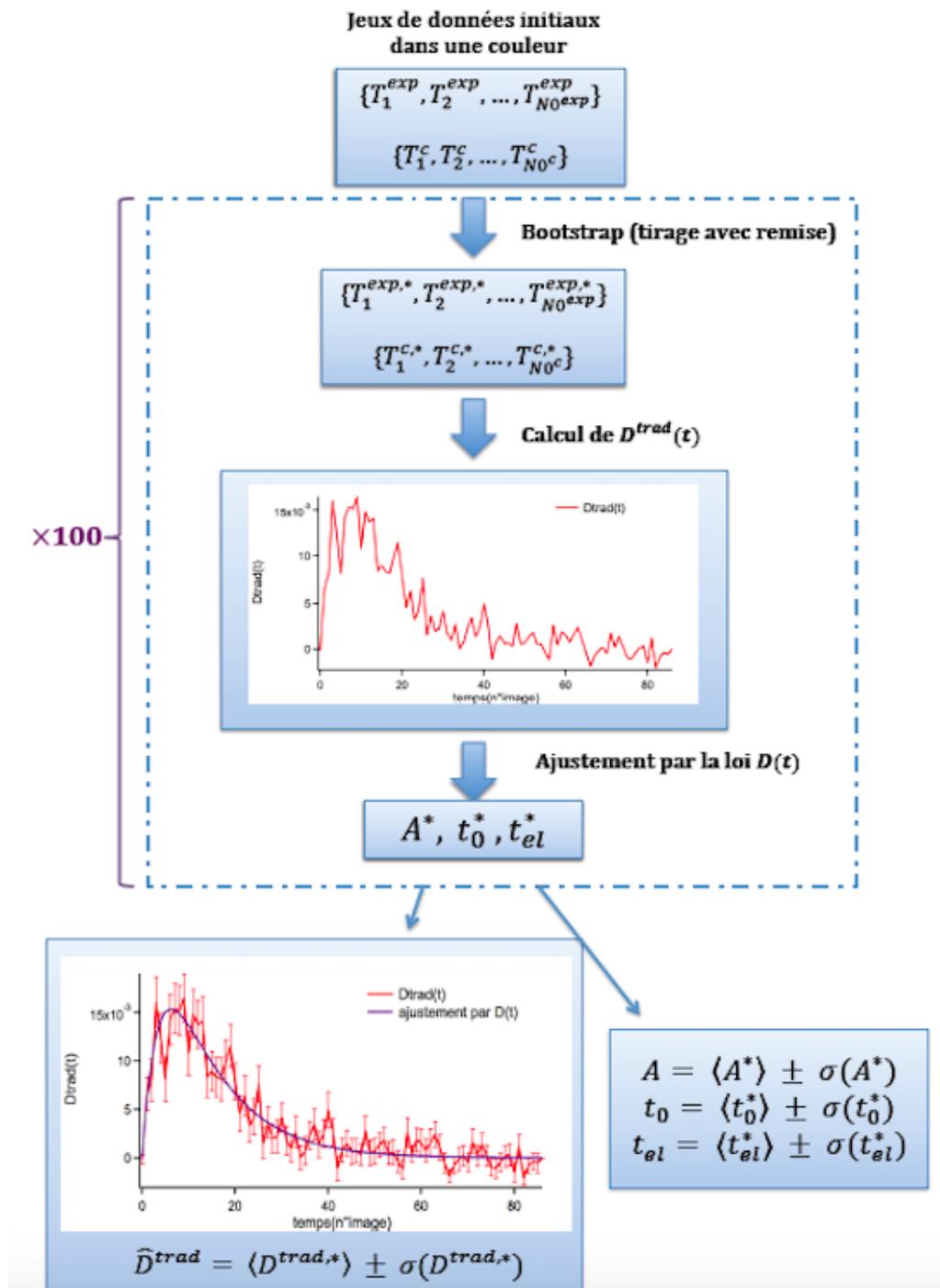


FIGURE 4.9 – Schéma récapitulatif des données en entrée et en sortie de la procédure de bootstrap effectuée dans le cadre de nos expériences.

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

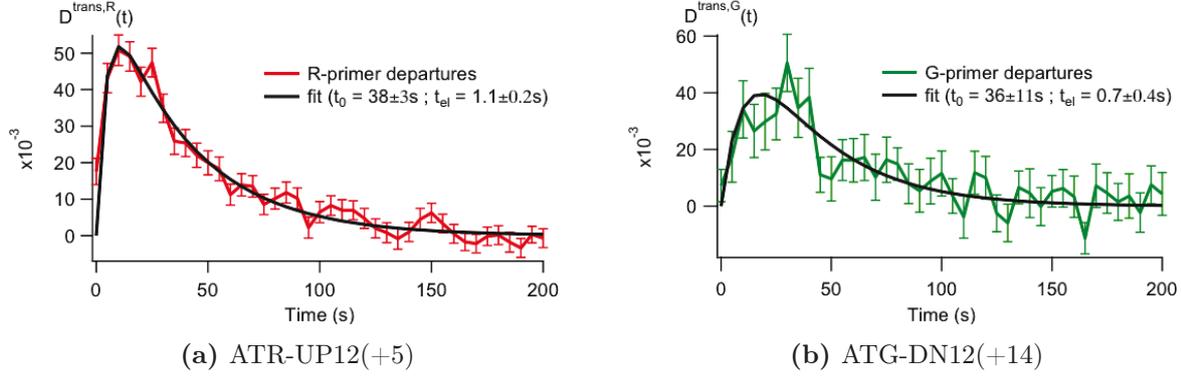


FIGURE 4.10 – Distribution $\langle D^{trad,*}(t) \rangle \pm \sigma(D^{trad,*}(t))$ du taux de départs instantanés des deux jalons ATR-UP12(+5) (A) et ATG-DN12(+14) (B) en fonction du temps. L'ajustement par $\mathcal{D}(t)$ et la détermination des barres d'erreur $\sigma(D^{trad,*}(t))$ sont réalisés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

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

4.2.3 Interprétation biologique des temps caractéristiques longs et courts

4.2.3.1 Bilan des mesures cinétiques

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

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

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

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

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

indique aussi un temps d'élongation avoisinant 1 s/codon. On constate que les paramètres cinétiques issus de la mesure réalisée en hybridant le premier jalon un peu plus loin sur l'ARNm (ATR-UP12(+8)) est cohérente avec les mesures cinétiques pour ATR-UP12(+5) et ATG-DN12(+14).

4.2.3.2 Temps caractéristiques long et court : confrontation à la littérature

Pour ce qui est du temps d'élongation court, son ordre de grandeur est cohérent avec les mesures réalisées dans la littérature et en particulier avec celles issues de récentes études *in vivo* [Yan 2016, Wu 2016, Tanenbaum 2014] en molécule unique. Celles-ci mesurent une vitesse d'élongation moyenne de 0,4 s/codon. Ce temps est inférieur à celui que nous mesurons, ce qui n'est pas choquant dans la mesure où nous travaillons *in vitro* avec des ribosomes qui ont été purifiés à partir du RRL et pré-incubés sur les ARN messagers.

Comment expliquer la présence d'un temps long dans la cinétique de traduction du ribosome ? Intuitivement on est tenté d'associer l'existence du temps long à la présence d'une IRES à l'extrémité de l'ARNm. Cet élément est très structuré et occupe initialement les sites A et P du ribosome grâce au domaine PKI², ce qui signifie que le ribosome est directement en interaction avec cette structure et doit s'en extraire.

Dans la littérature, plusieurs articles se sont intéressés aux mécanismes de l'initiation par une IRES CrPV. Nous avons présenté dans le chapitre 1 les articles [Petrov 2016] et [Fernández 2014], qui étudient l'interaction du ribosome et de la structure IRES lors de l'initiation, et en particulier le premier cycle de translocation qui correspond au passage du domaine PKI du site A au site P.

L'article [Zhang 2016] se concentre plutôt sur les premiers cycles d'élongation du ribosome et propose un modèle avec deux cycles d'élongation ralentis par la présence de l'IRES, suivis de deux cycles d'élongations canoniques, eux même ralentis. La force de ce travail est de pouvoir étudier toutes les sous étapes de l'élongation pour déterminer laquelle est cinétiquement limitante. En revanche ils utilisent un système largement hétérogène composé de ribosomes de crevettes, de facteurs d'élongation issus de levures et des ARN de transferts issus de bactéries *E. coli*. Bien qu'ils parviennent à observer une traduction effective, il n'en reste pas moins que la mesure n'est pas réalisée dans des conditions très physiologiques, et les temps d'élongation mesurés sont environ 40 fois supérieurs à ceux mesurés *in vivo*. Dans le cas des premiers cycles d'élongations après l'initiation par l'IRES CrPV, ils constatent que c'est l'évènement de translocation, étape de l'élongation qui s'accompagne d'un changement de conformation du ribosome, qui serait cinétiquement limitante.

4.2.3.3 Proposition d'un modèle cinétique

Il est donc raisonnable de faire l'hypothèse que le temps long mesuré lors de nos expériences est bien dû à l'interaction du ribosome avec l'IRES lors des premiers cycles d'élongation. Plus précisément il correspondrait à l'évènement ou aux évènements de translocation nécessaires pour que le domaine PKI, en vert sur la figure 4.11, soit intégralement extrait des sites A,P et E du ribosome.

2. cf. chapitre 1, section 1.3.5.1 page 36

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

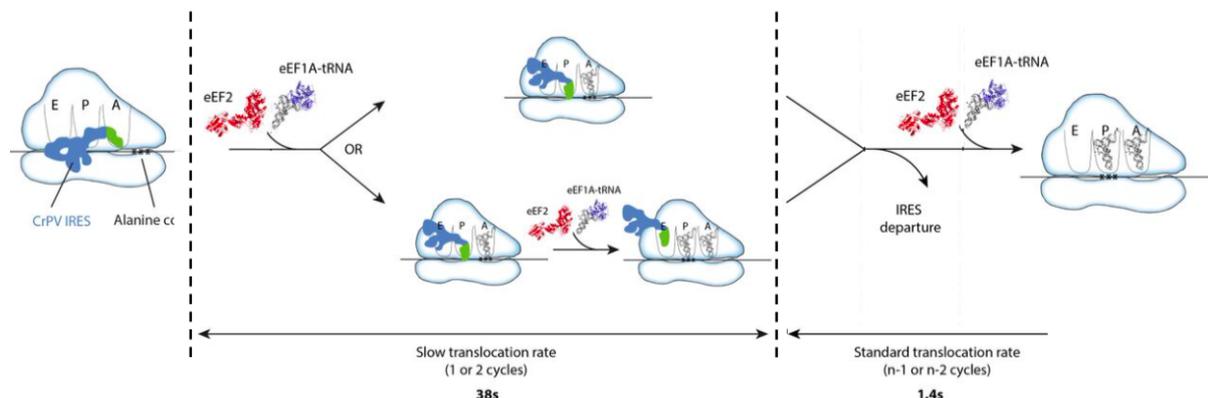


FIGURE 4.11 – Modèle descriptif de l'interaction d'un ribosome mammifère avec l'IRES CrPV durant le ou les deux premiers cycles d'élongation.

L'équipe de biologistes de l'I2BC avec lesquels nous collaborons sur le projet a proposé un modèle qui décrit l'existence d'un temps long correspondant aux premiers cycles d'élongation. La figure 4.11 schématise l'interaction du ribosome avec l'IRES lors des premiers cycles. L'IRES est initialement dans les sites A et P. Il faut à priori deux événements de translocation pour que l'IRES soit entièrement extraite du ribosome. Deux hypothèses sont alors envisageables pour le début de l'élongation :

- Hypothèse 1 : Seul le premier événement de translocation identifié par [Fernández 2014] est lent. Après le passage du site A au site P du domaine PKI, la phase d'élongation canonique commence bien que le ribosome soit encore en interaction avec l'IRES CrPV.
- Hypothèse 2 : Les deux premiers événements de translocation correspondant au mouvement du domaine PKI du site A au site P d'abord puis du site P au site E sont cinétiquement lents.

Le tableau de la figure 4.1 donne la valeur du temps d'élongation en s/codon en considérant chacune des deux hypothèses : celle d'un unique cycle d'élongation long (Hypothèse 1 notée Hyp 1 dans le tableau) et celle de deux cycles longs (Hypothèse 2 notée Hyp 2 dans le tableau). On constate que la différence au niveau du temps court est minime et incluse dans les barres d'erreur de la mesure. Nous n'avons pas la précision temporelle nécessaire pour réellement trancher entre ces deux hypothèses.

Ce modèle est cohérent avec les observations mécanistiques et dynamiques [Petrov 2016, Fernández 2014] décrites au chapitre 1, section 1.3.5, page 36, mais aussi avec celles de [Zhang 2016], qui eux se prononcent clairement pour deux cycles d'élongation lents plutôt qu'un seul. Après ces premiers cycles, l'IRES est extraite du ribosome et remplacée dans les sites A et P par des ARN de transfert. Commence alors une phase d'élongation classique avec une succession de cycles courts qui correspond au temps court d'élongation mesuré par deux biais (départs instantanés et histogramme des co-départs).

4.3. Un second contrôle biologique : expériences avec les ribosomes du RRL

4.3 Un second contrôle biologique : expériences avec les ribosomes du RRL

Pré-incuber les ribosomes sur l'ARN messenger était, lors des premières expériences, un moyen de limiter les difficultés en s'assurant que le ribosome soit déjà en position d'initier la traduction dès que l'extrait cellulaire est injecté dans la cellule microfluidique. Seulement l'extrait cellulaire lui-même contient des ribosomes dits endogènes. Pour vérifier que les cinétiques présentées dans la section précédente sont bien spécifiques aux ribosomes pré-incubés sur nos ARNm et qu'il n'y a pas présence de deux populations cinétiques différentes, nous avons réalisé des expériences de contrôle sans pré-incuber les ribosomes. De cette manière on caractérise la cinétique propre aux ribosomes endogènes.

4.3.1 Description de l'ARNm

Notre système biologique est accroché en surface. Au moment où l'on souhaite commencer les acquisitions, on injecte le RRL. Les ribosomes du RRL vont alors diffuser jusqu'aux ARN messagers et initier la traduction.



FIGURE 4.12 – Système biologique rapporteur utilisé pour les expériences de contrôle avec les ribosomes du RRL : CrPV-UP(+2)-DN(+18).

Pour réaliser ces expériences, nous utilisons le système biologique schématisé sur la figure 4.12. Par rapport au système décrit précédemment, le premier oligo UP est cette fois-ci couplé à l'ATTO vert et le second oligo DOWN à l'ATTO rouge. Nous effectuons ce changement car nous souhaitons éloigner le second jalon fluorescent pour ces nouvelles expériences. Il est cette fois 16 codons après le premier jalon. Nous éloignons le second jalon dans la perspective d'ajouter dans de futures expériences des obstacles entre les deux jalons. Nous cherchons à augmenter cette distance progressivement pour vérifier que l'on est toujours capable de mesurer une cinétique de traduction. L'oligonucléotide DOWN est couplé à l'ATTO rouge car c'est celui des deux qui a la durée de vie avant photoblanchiment la plus longue. Il est donc moins probable que ce marqueur blanchisse avant que le ribosome n'ait eu le temps de le détacher de l'ARNm. L'ARNm possède toujours une structure IRES CrPV à son extrémité 5'.

4.3.2 Courbes cinétiques avec les ribosomes du RRL

On réalise les mesures cinétiques en faisant l'acquisition d'une séquence image toutes les 2,5 s. En effet les améliorations apportées au montage optique décrites dans le chapitre 3 nous ont permis de diminuer notablement le photoblanchiment de nos marqueurs.

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

Aussi, nous pouvons nous permettre d'éclairer plus régulièrement les marqueurs sans que le photoblanchiment ne soit limitant pour la mesure. Nous espérons de fait avoir une meilleure précision sur nos mesures cinétiques en augmentant la résolution temporelle.

En observant les cinétiques de départs cumulés acquises dans ces nouvelles conditions, c'est à dire sans pré-incuber de ribosomes, on constate que l'écart entre la traduction et le contrôle sans IRES est faible. En prenant en compte la variabilité des mesures, il nous a fallu accumuler un grand nombre d'expériences pour séparer les courbes moyennes de traduction et de contrôle. Le tableau 4.2 résume le nombre de systèmes cumulés dans chaque couleur pour construire les cinétiques de la figure 4.12.

	ATG-UP12(+5)	ATR-DN12(+21)	Colocalisés
Traduction	3146	2759	910
Contrôle	2871	2725	1067

TABLE 4.2 – Tableau indiquant la statistique pour chacune des expériences de traduction avec des ribosomes du RRL et de contrôle sans IRES discutées dans cette section.

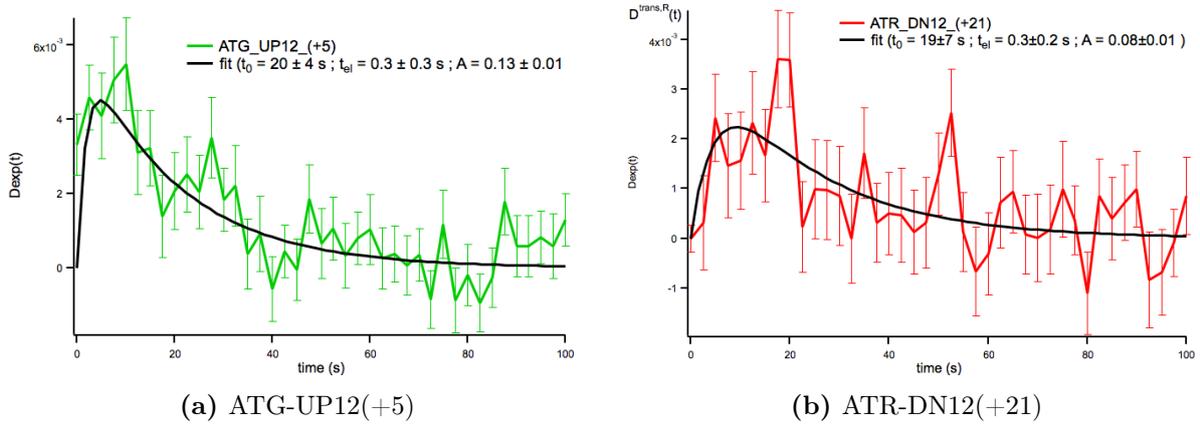


FIGURE 4.13 – Distribution du taux de départs instantanés $D^{trad}(t)$ des deux jalons ATG-UP12(+5) (a) et ATR-DN12(+21) (b) en fonction du temps. L'ajustement par $\mathcal{D}(t)$ et la détermination des barres d'erreur sont réalisés à l'aide de la procédure de bootstrap. On réitère la procédure 1000 fois.

On trace les courbes de départs instantanés dans les deux couleurs après avoir effectué une procédure de bootstrap sur les échantillons statistiques dénombrés dans le tableau 4.2. Le premier constat que l'on peut faire en observant ces distributions, c'est qu'elles sont très bruitées, ce qui est représentatif du faible écart entre traduction et contrôle sans IRES. Il est difficile dans ces conditions, même en effectuant une procédure de bootstrap d'évaluer les paramètres cinétiques avec une bonne précision. Les paramètres cinétiques sont résumés dans le tableau 4.3.

Nous discuterons les temps caractéristiques mesurés dans la section suivante. Le paramètre A qui caractérise l'efficacité globale ne dépasse pas 13% pour ces expériences.

4.3. Un second contrôle biologique : expériences avec les ribosomes du RRL

Jalon	$t_{el}(s/codon)$	$t_0(s)$	A(%)
ATR-DN12(+21)	$0,3 \pm 0,2$	19 ± 7	8 ± 1
ATG-UP12(+5)	$0,3 \pm 0,3$	20 ± 4	13 ± 1

TABLE 4.3 – Tableau récapitulatif des paramètres cinétiques mesurés lors des expériences de contrôle avec les ribosomes du RRL.

4.3.3 Comparaison des cinétiques des ribosomes endogènes et des ribosomes pré-incubés

Le premier critère de comparaison possible entre les deux populations de ribosomes est bien un critère cinétique. Nous avons constaté que la cinétique des ribosomes endogènes était différente de celle des ribosomes pré-incubés. La vitesse d'élongation est beaucoup plus rapide (environ un facteur 4 de différence). Mais il reste que la précision de notre mesure sur ce paramètre, en particulier pour l'expérience sans pré-incuber les ribosomes, demeure limitée. Il doit donc être interprété avec prudence. De même le temps long est divisé par deux, on passe de environ 40 s à 20 s (cf. table 4.4).

Ribosomes	$t_{el}(s/codon)$	$t_0(s)$
Pré-incubés	$1,1 \pm 0,2$	38 ± 3
Endogènes	$0,3 \pm 0,3$	20 ± 4

TABLE 4.4 – Tableau comparatif des temps longs et courts pour l'expérience avec les ribosomes pré-incubés et le contrôle avec les ribosomes du RRL. On choisit de comparer les temps caractéristiques longs et court correspondants au départ du premier jalon fluorescent UP pour les deux conditions considérées.

Plusieurs interprétations sont possibles pour expliquer cette différence de cinétique. Les ribosomes pré-incubés ont été centrifugés dans une ultra-centrifugeuse à près de 100 000 g. Il est possible que cette étape de centrifugation ait un effet sur l'activité traductionnelle de ces ribosomes qui seraient moins actifs biologiquement.

Cette hypothèse nous encourage à privilégier les ribosomes du RRL qui constituent d'autant plus un système physiologiquement représentatif car non modifié. De plus, les études in-vivo [Yan 2016, Wu 2016] avancent des vitesses de traduction intra-cellulaires qui sont proches de celles que nous avons mesurées in-vitro pour les ribosomes du RRL. Les ribosomes du RRL s'avèrent être un système biologique adapté dans la suite de nos études pour nous approcher au plus près des conditions de traduction in-vivo. Seulement un autre élément vient contraster ce constat positif : l'efficacité globale des ribosomes du RRL.

4.3.4 Efficacité de reconnaissance et de traduction

L'efficacité globale est sensiblement différente entre les expériences avec et sans ribosomes pré-incubés. Le paramètre donnant cette efficacité, A , est évalué à 50% avec les ribosomes pré-incubés et seulement à 13% pour les ribosomes du RRL. La faible valeur de A est particulièrement flagrante sur la figure 4.14.

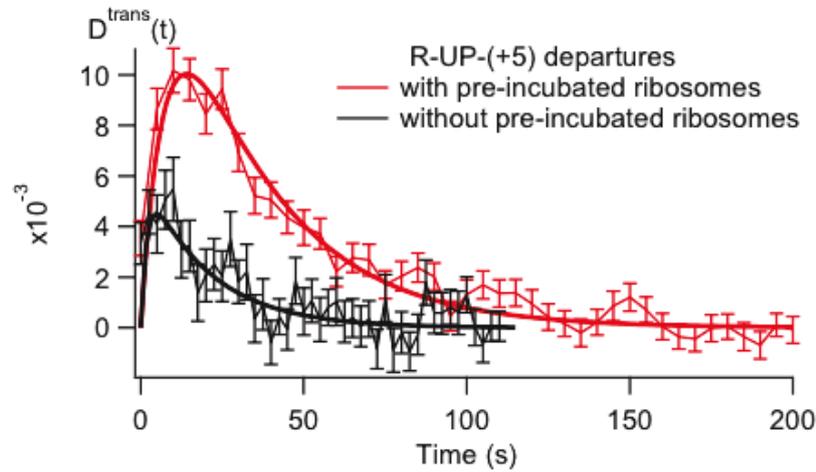


FIGURE 4.14 – Distribution du taux de départs instantanés $D^{trad}(t)$ en fonction du temps pour le premier jalon. La courbe noire correspond aux expériences avec les ribosomes du RRL et la courbe rouge correspond à l'expérience avec les ribosomes pré-incubés.

Cette observation indique qu'en molécule unique contrairement aux expériences réalisées en biologie moléculaire, les ribosomes du RRL ont des difficultés à s'initier sur les ARN messagers, même s'ils sont tous disponibles. Il s'agit plutôt d'une bonne nouvelle vis à vis de nos premières expériences. Elle valide que les cinétiques étudiées avec des ribosomes pré-incubés étaient bien spécifiques à ces ribosomes. Les 10% évalués dans des expériences avec seulement les ribosomes du RRL sont forcément surévalués par rapport à une expérience où une majorité des sites d'initiation sont occupés par des ribosomes pré-incubés. On peut donc considérer que les ribosomes du RRL ont un impact négligeable dans les expériences où sont présents des ribosomes pré-incubés.

La faible efficacité globale des ribosomes du RRL vis à vis de l'IRES CrPV constitue un véritable obstacle à leur utilisation pour nos expériences futures. Il y a très peu d'événements de traduction parmi l'ensemble des événements de départ ce qui explique qu'il soit difficile de construire une cinétique peu bruitée. Une conséquence importante de cette faible efficacité de traduction est que si les départs dans une couleur liés à la traduction sont faibles, les co-départs qui correspondent à un départ dans les deux couleurs pour un même ARN messager sont encore plus rares. On peut faire un simple raisonnement pour illustrer ce fait. Si 10% des jalons fluorescents partent par traduction dans chaque couleur alors la proportion de co-départs dus à la traduction sur l'ensemble de la population des particules colocalisées est :

$$P = 0,1 \times 0,1 = 0,01 = 1\%$$

soit à peine 1% de co-départs dus à la traduction. Dans ces conditions, nous ne sommes pas parvenus à établir un histogramme des co-départs, c'est pourquoi nous étudions uniquement les cinétiques de départs instantanés dans chaque couleur.

Puisque l'on envisage d'insérer des obstacles entre les deux marqueurs qui viendront probablement modifier la cinétique du ribosome, l'histogramme est l'outil le plus adapté pour mesurer ces variations de cinétique selon la séquence étudiée. Une autre difficulté s'ajoute lorsque l'on

4.4. Bilan : quelles conditions d'études choisir pour la suite du projet ?

veut intégrer des obstacles liés aux erreurs programmées dans la séquence étudiée. En effet les erreurs programmées de la traduction sont des événements rares, avec une faible probabilité d'occurrence. Si l'efficacité de traduction est très faible, alors la probabilité que l'on puisse mesurer un événement du type erreur programmée sera quasi-nulle. Par exemple si la probabilité d'occurrence d'une erreur programmée est de 10% et l'efficacité de traduction de 10% également, alors la probabilité de mesurer un événement rare sera : $P_{rare} = 0,1 \times 0,1 = 1\%$. On a donc tout intérêt à maximiser l'efficacité de traduction dans la perspective d'étudier les erreurs programmées.

4.4 Bilan : quelles conditions d'études choisir pour la suite du projet ?

Nos expériences sur les ribosomes non pré-incubés ont donné des résultats contrastés. Après ces tests, l'objectif était de déterminer si nous continuions le projet sans pré-incuber les ribosomes ou si cette pré-incubation était nécessaire. En effet, ne pas pré-incuber les ribosomes présente un double avantage. Les ribosomes du RRL ne sont pas modifiés, leur intégrité biologique est donc préservée, et utiliser ces ribosomes pour traduire c'est se rapprocher des conditions de traduction in-vivo, c'est à dire plus physiologiques.

Cette méthode permet aussi de s'affranchir de la purification et de l'accroche des ribosomes, donc de simplifier nos expériences puisque chaque étape supplémentaire peut introduire de nouveaux biais. Aussi nous comparons les paramètres cinétiques et l'efficacité de traduction de ces deux types d'expériences afin de choisir un protocole pour la suite.

Nous avons présenté dans les paragraphes précédents les principales caractéristiques, dans les conditions actuelles de l'expérience, de chaque population de ribosomes étudiés, caractéristiques qui sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Ribosomes	cinétique	modification bio	A	histogramme	erreurs programmées
Pré-incubés	lente	modifiés	50%	oui	adapté
Endogènes	rapide	non modifiés	10%	non	non adapté

TABLE 4.5 – Tableau récapitulatif des caractéristiques des deux populations de ribosomes étudiées.

La conclusion de nos observations est que dans les conditions actuelles de l'expérience, nous ne pouvons pas envisager des expériences d'erreurs programmées de la traduction eucaryote avec les ribosomes du RRL. En effet l'efficacité de traduction est un facteur primordial pour ces expériences. Seulement notre démarche s'inscrit dans la recherche des conditions les plus physiologiques et représentatives d'un système mammifère in-vivo que possible. Face à ce dilemme, nous décidons donc de poursuivre malgré tout avec les ribosomes endogènes non modifiés mais en faisant évoluer nos systèmes biologiques et nos conditions expérimentales dans le but d'augmenter l'efficacité de traduction de ces ribosomes. Nous verrons dans le prochain chapitre que cette nouvelle problématique nous a amenés à explorer plus loin l'initiation IRES dépendante.

4.5 Conclusion

Nous avons exposé dans ce chapitre les premiers résultats obtenus avec notre dispositif d'étude de la cinétique de traduction en molécule unique. En perfectionnant notre protocole expérimental et notre dispositif, nous sommes parvenus à réaliser des mesures cinétiques fiables et reproductibles.

L'étude de la cinétique de ribosomes préalablement pré-incubés sur un ARN messager rapporteur qui possède une IRES CrPV nous indique que la cinétique est nécessairement décrite par deux temps caractéristiques : un temps long et un temps court correspondant au temps d'élongation. Le temps d'élongation mesuré est cohérent avec la littérature et en particulier avec les résultats de récents articles sur la traduction eucaryote in-vivo. Le temps long est quand à lui évalué à 40 secondes. En s'appuyant sur des études structurales et cinétiques de l'IRES CrPV, on émet l'hypothèse que ce temps long correspond au temps nécessaire au ribosome pour s'extraire de l'IRES durant le premier ou les deux premiers cycles d'élongation. Ce temps caractérise donc l'interaction entre le ribosome mammifère et la structure virale de l'IRES CrPV.

Pour s'assurer que la cinétique mesurée est bien spécifique aux ribosomes pré-incubés sur les ARN messagers et ne résulte pas d'un mélange de deux populations, on réalise des expériences de contrôle avec uniquement les ribosomes du RRL non pré-incubés. On constate que dans ces conditions, le recrutement des ribosomes n'est pas efficace mais les cinétiques que nous parvenons à mesurer sont deux fois plus rapides que pour les ribosomes pré-incubés. Les ribosomes du RRL ne participent que très peu à la cinétique de traduction lorsque l'on réalise les expériences en pré-incubant les ribosomes.

En revanche, ces ribosomes endogènes ne sont pas modifiés, leur intégrité biologique est préservée. De plus, en ne pré-incubant pas, nous simplifions la réalisation de nos expériences. Aussi, même si ce n'est pas adapté dans les conditions expérimentales actuelles, nous souhaitons continuer les expériences avec les ribosomes du RRL. Mais pour cela, il est primordial de parvenir à augmenter grandement leur efficacité globale. Ce défi et les stratégies mises en place pour le relever feront l'objet du chapitre 5.