



HAL
open science

Elasticité de la chromatine, étude avec une pince optique

Cyrille Claudet

► **To cite this version:**

Cyrille Claudet. Elasticité de la chromatine, étude avec une pince optique. Biophysique [physics.bioph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT : . tel-00109955

HAL Id: tel-00109955

<https://theses.hal.science/tel-00109955>

Submitted on 26 Oct 2006

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.

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I

N° attribué par la bibliothèque

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UJF

Spécialité : Physique

préparée au Laboratoire de Spectrométrie Physique

dans le cadre de l'École Doctorale de Physique

par

Cyrille CLAUDET

soutenance le 15 décembre 2005

**Elasticité de la chromatine,
étude avec une pince optique**

Directeur de thèse :

François GRANER

Co-directeur de thèse :

Jan BEDNAR

JURY

M	Jean Louis VIOVY	, Rapporteur
M.	Christophe PLACE	, Rapporteur
M.	François GRANER	, Directeur de Thèse
M.	Jan BEDNAR	, Co-directeur de Thèse
Mme	Cendrine MOSKALENKO	, Examineur
M.	Bertrand FOURCADE	, Examineur

Merci !

Je tiens à remercier tout d'abord mes deux directeurs de thèse. Jan Bednar, pour m'avoir fait découvrir la biologie, même si je n'en ai retenu que quelques pouillièmes ; pour m'avoir enseigné la rigueur qui doit accompagner les expériences et enfin pour son encadrement : toujours présent pour discuter d'un point de détail ou de la philosophie de la chromatine plus généralement. Merci aussi à François Graner, pour son énergie débordante, ses conseils avisés, sa patience à traduire en "français" ce manuscrit et bien entendu pour sa recette de bulles géantes...

Un grand merci aux membres du jury, en particulier à Jean Louis Viovy et Christophe Place qui ont accepté la tâche de rapporteur, et qui ont éclairé à leur manière mon travail de thèse. Vifs remerciements à Cendrine Moskalenko et Bertrand Fourcade pour avoir examiné mon travail avec attention.

Je remercie nos collaborateurs :

- Stefan Dimitrov, dont les portes de ses frigos nous ont toujours été ouvertes et avec lequel nous avons disserté très longuement sur les expériences à réalisées. C'est aussi un peu grâce à lui que je m'y retrouve un peu mieux (ou "un peu moins pire...") dans la jungle des sigles employés dans le domaine de la chromatine.
- Dimitri Angelov du LR6 à l'ENS Lyon, pour ses reconstitutions de chromatine et pour les quelques discussions que nous avons eues notamment dans les courants d'air d'une gare lors d'un mois de Novembre particulièrement glaciale.
- Helmut Schiessel, qui m'a accueilli chaleureusement durant un mois au Lorentz Institut de Leiden, alors qu'il venait lui-même à peine d'arriver et qu'il commençait seulement à émerger de la paperasse. Merci pour cette initiation à la théorie en biophysique, et pour toutes ces discussions autour de la stabilité du nucléosome.

Les échanges quasi quotidiens avec le groupe biop (ex "bom", ex "phas2", ex "phas"...Vat-on réussir un jour à caser le sigle URSS??) ont été très enrichissants et ont toujours aiguisé ma curiosité. J'ai vraiment apprécié l'ambiance dans laquelle j'ai travaillé ces trois années. Merci à Dédé et Patrice pour les bidouilles précieuses de manips et quelques

autres bricoles.

Merci aussi à toutes les personnes qui animent les services du labo : merci à l'atelier où il est toujours possible d'y faire un saut pour faire des p'tits trous...dans du verre, pour réparer un pousse seringue défaillant suite à "une manipulation hasardeuse" ou même pour modifier le filetage d'une pédale de vélo... Merci au secrétariat pour trouver des solutions aux missions de dernières minutes. Une mention particulière à Jessie Sitbon pour son stoïcisme et sa patience (Si si, y'a pas d'entourloupe derrière :)).

Et bien sur, un grand merci à ce que Hélène à justement nommé "le peuple thésards". Pour toutes les soirées "jeu", les batailles d'eau, les délires à la cafet ou ailleurs, les activités diverses sur le terrain de jeu qui s'étend tout autour de Grenoble, merci ! Merci à Hélène, Sébastien, Marguerite, Max, partis voir du pays un peu plus tôt. Merci à Benjamin, entre autre compagnon de ballade avec spécialité gadoue, Beegee qui croit observer des similarités entre les galaxies et les cellules fluo et Julien, lui aussi désormais en cavale. Merci aussi à Christophe et Claire qui m'ont très gentiment accueilli chez eux ; à Pascale, Maud, Jan Paul, Jacek, Philippe, Stéphane pour tous ces cht'its moments partagés au labo ou sur les pentes plus ou moins abruptes et plus ou moins enneigées...

J'allais oublier...quand même... (sinon elle se fâche et balance des coups de pieds à droite, à gauche...) : une dédicace toute spéciale à Lika !

Un grand merci à mes parents qui m'ont permis de poursuivre mes études.

Merci à mon vélo, toujours aussi solide...parfois un peu crevé, mais bon...

Et enfin, un clin d'œil à Vale ;-)

Avant-propos

La structure de la "molécule de la vie" est résolue depuis 1953, mais la compréhension du traitement de l'information génétique par la cellule passe aussi par une compréhension globale de l'organisation et de la dynamique de la chromatine. C'est à l'heure actuelle un thème de recherche très actif.

Le génome des organismes eucaryotes est beaucoup plus grand que celui des procaryotes ; il est rangé dans un organite cellulaire : le noyau. L'ADN y est compacté avec un ensemble de protéines, la plupart étant de petites protéines basiques appelées histones. L'assemblage de l'ADN et de ces protéines est appelé chromatine. La brique élémentaire est le nucléosome : association d'environ 166 paire de base avec 9 de ces histones : 8 histones de cœur et une histone de liaison.

La chromatine est globalement divisée en deux régions : l'hétérochromatine, qui est très compactée et l'euchromatine moins dense (Fig 1). L'assemblage de la chromatine apparaît non seulement comme un moyen de compacter l'ADN mais aussi comme un régulateur de l'expression génétique : les zones les plus denses sont inaccessibles à la machinerie de transcription, l'ADN y est donc peu transcrit.

Ainsi, selon le tissu auquel elle appartient, une cellule exprime temporairement certains gènes et réprime de nouveau leur expression. Les gènes qui ne sont pas transcrits sont compactés dans l'hétérochromatine. Loin d'être une entité statique, la chromatine est animée d'une dynamique complexe encore mal comprise. La régulation des états de compaction met en jeu les interactions entre ADN et protéines. En particulier, les interactions ADN-histones semblent jouer un rôle de premier plan dans cette régulation, notamment en permettant le bon repliement de la chromatine via l'histone de liaison. L'activité de transcription est aussi contrôlée par les modifications chimiques des histones ou même le remplacement de ces derniers par un de leurs variants.

Néanmoins, il n'a été observé jusqu'alors que des corrélations entre ces modifications et les variations d'activité de transcription sans jamais pouvoir vraiment trancher qui est la cause ou la conséquence. Dans ce contexte, je me suis attaché, au cours de ma thèse, à la compréhension des interactions ADN-histones et à l'élasticité du nucléofilament, première étape de la compaction.

Ces modifications ont lieu à l'échelle du nucléosome et c'est à cette échelle que nous nous intéressons aux variations des propriétés mécaniques même si il peut y avoir des

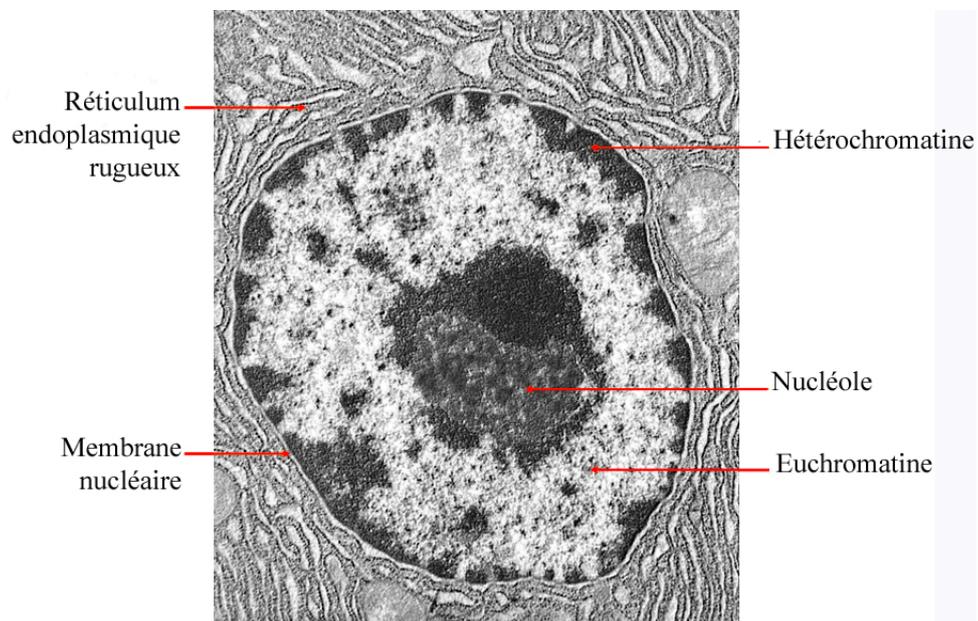


FIG. 1 – Image en microscopie électronique du noyau d’une cellule eucaryote. *L’hétérochromatine apparaît en noir, alors que l’euchromatine, moins dense, apparaît en clair (colorant). Le nucléole est le siège de la synthèse des ARN ribosomiaux [95]. D’après <http://academics.hamilton.edu/biology/kbart/image/nucleus.jpg>*

répercussions sur la structure globale. Les voies d'investigation sont nombreuses et complémentaires ; expériences de biologie, diffraction de rayons X donnant une information structurale, microscopie électronique et, plus récemment arrivée dans les laboratoires, expérience sur molécule unique.

Avec les méthodes de manipulation (traction ou torsion) de molécule unique, de nouvelles quantités physique deviennent accessibles aux mesures. Ce nouveau type d'expériences donne une information non plus d'ensemble, moyennée, mais une information sur un objet unique. L'étude renseigne sur les caractéristiques mécaniques de la molécule, la position, la vitesse, la processivité de moteurs moléculaires. Elle permet parfois de trancher entre différents scénarii de mécanismes moléculaires.

Les expériences sur molécule unique permettent d'aller tester directement les propriétés élastiques de fibres de chromatine ainsi que leurs éventuelles variations en rapport avec une modification chimique. L'acétylation des histones est corrélée avec un regain d'activité de transcription ; une des explications proposée invoque la diminution des interactions ADN-histones. En microscopie électronique, il n'apparaît aucune différence entre les fibres de 10 nm de chromatine non acétylée et hyper-acétylée. Aussi, plutôt qu'un changement de structure, nous pensons que cette modification chimique peut plutôt se manifester par une variation des propriétés élastiques de la fibre de chromatine.

C'est pour tester ce type d'hypothèse que nous avons réalisé une expérience de manipulation de molécule unique avec une pince optique. Nous avons choisi de réaliser une série de tests d'élasticité sur les fibres de chromatine. Ces fibres de chromatine ont diverses origines, sont reconstituées ou non, et en recoupant les informations nous avons tenté d'y voir plus clair dans la dynamique de cette fibre. Nous avons pu étudier la stabilité mécanique de nucléosomes reconstitués avec des variants des histones. Cette étude a été réalisée en collaboration avec des biologistes : Stefan Dimitrov, de l'Institut Albert Bonniot, de l'autre côté de l'Isère ; et Dimitar Angelov, de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon.

Dans un premier chapitre d'introduction je présenterai brièvement les connaissances actuelles sur l'ADN, la chromatine et ses transformations ; ainsi que les méthodes à notre disposition pour sonder leurs propriétés mécaniques, en particulier les pinces optiques.

Puis je développerai plus en détail les choix faits et les techniques expérimentales que nous avons mises en œuvre au cours de cette thèse : des pinces optiques aux préparations biochimiques de l'ADN et de la chromatine, en passant par la construction d'un dispositif magnétique visant à appliquer un couple aux molécules en étirement.

Je poursuivrai avec les résultats obtenus sur l'ADN nu, notre molécule de test, dont le comportement mécanique désormais bien établi n'est pas encore totalement compris. A la lumière de nos résultats, et d'autres déjà disponibles, nous proposerons une interprétation de la transition B-S dans nos conditions d'étirement.

Suivra une partie où nous exposerons l'ensemble des résultats issus de nos expériences portant sur la fibre de chromatine, reconstituée ou non. Nous exposerons aussi un modèle simple de nucléosome sous tension, qui est élargi à deux tours par rapport à [77].

Finalement, nous discuterons de ces résultats dans un cadre un peu plus large. Nous montrerons que les conditions dans lesquelles sont effectuées les expériences sur molécule unique sont loin d'être celles du noyau cellulaire. Cet apparent détail est en réalité d'une importance cruciale pour la stabilité d'un tel complexe ADN-protéines en constant équilibre, lorsqu'il est fortement dilué. Nous replacerons aussi ces résultats dans le contexte plus général de la régulation de l'expression génétique.

Table des matières

1	Introduction	1
1.1	ADN, structure & biologie	1
1.1.1	Structure primaire	1
1.1.2	Structure secondaire usuelle	1
1.1.3	Autres structures secondaires	5
1.2	L'ADN dans son milieu naturel	5
1.2.1	La chromatine, de l'ADN au chromosome	5
1.2.2	Variants d'histones de cœur et modifications chimiques	20
1.3	Expérience de mécanique sur molécule unique	24
1.3.1	Energie, force et temps	25
1.3.2	Quelques dispositifs	31
1.3.3	Comportement élastique de l'ADN : modèles	42
1.3.4	Comportement en torsion	46
1.4	Etirement d'une fibre de chromatine	46
1.4.1	Divers types de chromatine étudiés	47
1.4.2	Etirements sur les substrats chromatinien	49
2	Matériels et méthodes	53
2.1	Dispositif expérimental	54
2.1.1	Piège optique	54
2.1.2	Cellule d'expérimentation	59
2.1.3	Détection et sensibilité	61
2.1.4	Calibration	63
2.1.5	Force de Stokes	64
2.1.6	Analyse des fluctuations	64
2.1.7	Vers la pince magnéto-optique	68
2.1.8	Choix et préparation des billes	71
2.2	Préparations biochimiques	74
2.2.1	Préparation de l'ADN	74
2.2.2	Chromatine reconstituée	76
2.2.3	Chromatine native	80

2.3	Déroulement d'une expérience type	83
2.3.1	Incubation	83
2.3.2	Accrochage proprement dit	85
2.3.3	Etirement	85
3	Etirements d'ADN : Résultats et discussion	87
3.1	Résultats	87
3.1.1	$F \leq 60$ pN	87
3.1.2	Plateau B-S	88
3.1.3	Profils particuliers des plateaux de transitions	89
3.2	Discussion	98
3.2.1	Modèle de Cluzel & coll.	99
3.2.2	Modèle de Williams & coll.	99
3.2.3	Interprétations	99
3.3	Commentaire sur la méthode : effet de la protéine MENT	104
3.3.1	Expériences	104
3.3.2	Discussion	104
4	Résultats sur la chromatine	107
4.1	ADN et nucléoplasmine	107
4.2	Extraits d'œufs de <i>Xenopus Laevis</i>	110
4.2.1	Contournement des problèmes dus aux impuretés de l'extrait	110
4.2.2	Distributions	111
4.2.3	Cinétique de formation	113
4.2.4	Effet du tampon	114
4.2.5	Déplétion de la protéine B4	117
4.3	chromatine native et reconstituée sur 5S	117
4.3.1	Chromatine reconstituée sur une séquence répétée de 5S ADN-r d'oursin	119
4.3.2	Chromatine native	123
4.4	Conditions stabilisantes	125
4.4.1	Chromatine reconstituée sur une séquence 5S d'ADN-r	125
4.4.2	Chromatine native	127
4.5	Expériences de dilutions successives et analyse sur gel	128
4.5.1	Dilution de NCP	130
4.5.2	Dilution de nucléosomes	132
4.6	Modèle de déroulement du nucléosome	134
4.6.1	Brève description du modèle	134
4.6.2	1 tour puis N tours	135

5	Chromatine : Discussion	137
5.1	Extrait d'œufs de <i>Xenopus Laevis</i> et dilutions	137
5.1.1	Cinétique de formation à partir de l'extrait d'œufs de <i>Xenopus Laevis</i>	137
5.1.2	Qualité de l'extrait	138
5.2	Chromatine native et reconstituée : effet de la dilution	139
5.2.1	Comment interpréter la longueur déroulée de 24 nm?	139
5.2.2	Etude de la dilution	141
5.3	Dynamique et stabilité du nucléosome	145
5.3.1	Force nécessaire à la rupture d'un nucléosome.	145
5.3.2	Accès à l'ADN nucléosomal	150
6	Conclusion	159
6.1	Résumé	159
6.2	Perspectives	161

Notations et abréviations

- aa : acide aminé
- ADN : Acide Desoxyribonucléique
- ARN : Acide Ribonucléique
- ATP : Adénosine Tri-Phosphate
- bp : paire de base
- kbp : 1000 bp
- CAF : Chromatin Assembly Factor
- HAT : Histone Acetyl Transferase
- HDac : Histone Deacetylase
- HMG protein : High mobility Group protein
- Mnase : Nucléase Micrococcocale
- NCP : Particule de Cœur du Nucléosome
- dNTP : Nucléotide Tri-Phosphate
- SMC : Structural Maintenance of Chromosome

- AEBSF : 4-(2-Aminoethyl)benzenesulphonyl fluoride
- BSA : Bovine Serum Albumin
- EDTA : Ethylen Diamine Tetra-acetic Acid
- u : Unité, quantité d'enzyme pour "digérer" 1 μ g d'ADN en 1 h à 37°C dans un volume de 50 μ l.
- PAGE : Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
- TE : Tris-EDTA buffer
- PBS : Phosphate Sodium Buffer
- v/v : volume/volume
- w/v : weight/volume (poids/volume)

- AFM : Microscope à Force Atomique
- CEM : Cryo-Electron Microscopy
- DIC : Differential Interference Contrast
- EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay
- FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer

- FRAP : Fluorescence Recovery After Photo-bleaching
- NA : Numerical Aperture (ouverture numérique)
- OD : Densité optique
- PSD : Photo Sensitive Diode (diode photosensible)

- $\beta = 1/(k_B T)$
- deg : degré (géométrique)
- DFS : Dynamic Force Spectroscopy
- ΔL_k : Différence d'indice de liage ou différence du nombre de croisements topologiques
- ϕ : diamètre
- F^* : Force la plus probable
- FJC model : Freely jointed chain model
- fN : Femtonewton (10^{-15} N)
- nN : Nanonewton (10^{-9} N)
- pN : Piconewton (10^{-12} N)
- G : Gauss (10^{-4} tesla)
- g : accélération de la pesanteur
- B : Module de courbure
- k_B : Constante de Boltzmann
- L_0 : Longueur curvilinéaire
- L_D : Longueur de Debye
- L_K : Longueur de Kuhn
- L_p : Longueur de persistance
- η : Viscosité dynamique
- Re : Nombre de Reynolds
- r : taux de charge
- S : Section
- SE : Standard Error
- SD : Standard Deviation
- T : température
- ζ : extension relative
- v : vitesse
- WLC model : Worm Like Chain model
- Y : Module d'Young

Chapitre 1

Introduction

1.1 ADN, structure & biologie

1.1.1 Structure primaire

Les nucléotides sont les briques élémentaires qui constituent une molécule d'ADN. Elles ne sont au nombre que de quatre et sont constituées d'un sucre, le désoxyribose (le sucre ribose étant réservé à l'ARN), d'une base parmi quatre (Fig 1.1) et d'un groupement phosphate. Ces bases appartiennent à la famille des purines (adénine et guanine) ou à la famille des pyrimidines (thymine et cytosine). Ce sont des molécules quasiment planes qui peuvent s'apparier spécifiquement deux à deux, (Fig 1.1) : la guanine avec la cytosine et la thymine avec l'adénine. La première paire est maintenue par trois liaisons hydrogène et la seconde, plus fragile, par deux liaisons hydrogène.

Les nucléotides se succèdent linéairement ; une liaison covalente entre le groupement phosphate de l'un et le ribose du suivant assure la cohésion du brin ainsi formé. Ce brin de nucléotides est donc orienté. En se référant aux carbones du cycle du ribose concernés par les liaisons avec des groupements phosphates, une extrémité est annotée 5' et l'autre 3' : C5' pour le carbone lié au phosphate appartenant au même nucléotide et C3' pour celui lié au phosphate du nucléotide suivant, (Fig 1.2). Cette chiralité de la molécule d'ADN permet par exemple à des complexes de protéines de travailler efficacement sur l'ADN. Ainsi Les ARN-polymérase se déplacent de 5' vers 3' [95] ; Certaines topoisomérases (Topo II chez les procaryotes) sont capables de reconnaître la topologie locale d'un croisement de deux molécules d'ADN et de dénouer ainsi les noeuds constitués lors de la réplication [33][95].

1.1.2 Structure secondaire usuelle

De cet appariement spécifique découle la structure en deux brins anti-parallèles de la molécule d'ADN. Un brin de séquence donnée s'apparie, base à base, avec un brin de séquence complémentaire orienté dans l'autre sens (Fig 1.3). Dans une telle structure,

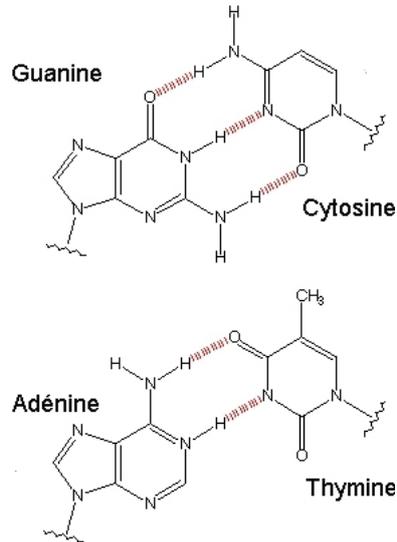


FIG. 1.1 – **Les quatre bases.** *Celles-ci s'apparient spécifiquement deux à deux. Les purines sont les bases constituées de deux cycles de carbone (A et G), les pyrimidines n'en ont qu'un seul (T et C). Les liaisons établies entre ces bases sont des liaisons hydrogène (en pointillés), deux pour le couple A-T et trois pour C-G.*

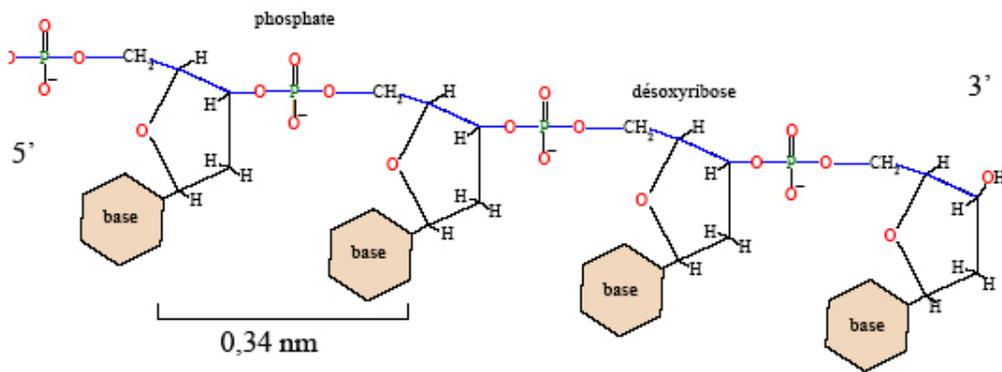


FIG. 1.2 – **Structure primaire de l'ADN :** *Succession linéaire et orientée 5'→3' de nucléotides. Chaque nucléotide est composé d'un sucre, le désoxyribose; d'un groupement phosphate, porteur de deux charges négatives; et d'une base.*

les bases sont orientées vers l'intérieur de la molécule du fait de leur hydrophobicité. Quant aux groupements phosphates, chargés négativement dans les conditions physiologiques, ils font face au solvant et confèrent à la molécule d'ADN son caractère soluble. Les bases semblent ainsi protégées en partie des altérations chimiques les plus courantes dans un milieu physiologique. Cet édifice moléculaire possède ainsi une stabilité suffisamment importante pour pouvoir stocker durablement l'information tout en étant suffisamment modulable au regard de l'évolution biologique. La structure élucidée par Watson et Crick est la forme B de l'ADN [158]. C'est la forme la plus courante ; la double hélice de la molécule d'ADN a un diamètre d'environ 2 nm et un pas d'hélice de 34 Å, (Fig 1.4 centre). Les paires de bases sont espacées de 3.24 Å. On compte donc en moyenne 10.5 paires de bases par tour d'hélice, (Fig 1.3). Ce nombre peut varier sensiblement avec la séquence d'ADN, mais aussi avec le pH, la salinité etc... de la solution ([153]).

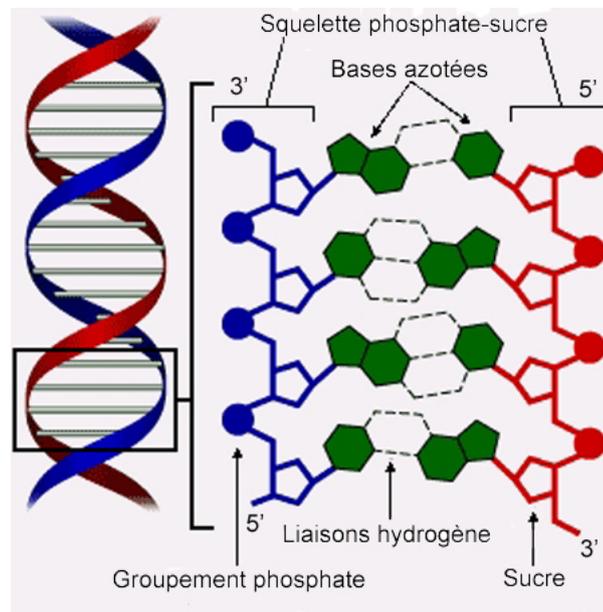


FIG. 1.3 – Schéma de la structure de l'ADN. A gauche, vue de côté de la structure B de l'ADN. La double hélice a un pas à droite de 3.4 nm qui comporte 10.5 paires de bases en moyenne. Le squelette de sucre-phosphate de chaque brin est identifié par une couleur, bleue ou rouge. Les bases appariées entre les brins sont figurées en gris. A droite, détail : Les deux brins de séquence complémentaire s'apparient base à base : A-T (deux liaisons hydrogène) et C-G (trois liaisons hydrogène). Les brins sont orientés à contre-sens l'un de l'autre. Adapté de http://evolution.berkeley.edu/evosite/history/images/dna_structure.gif

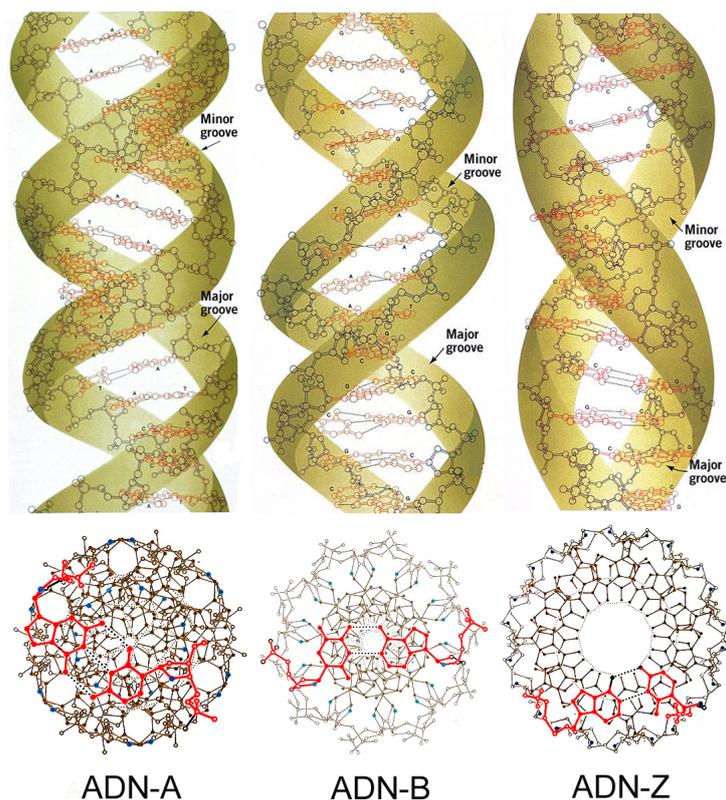


FIG. 1.4 – **Différentes structures secondaires.** *En haut, vues de côté de ces structures. En bas vues correspondantes selon l'axe de la molécule. Au centre la forme de l'ADN la plus courante : ADN-B. La molécule présente ainsi deux sillons ; le sillon majeur et le sillon mineur, tout deux, points de reconnaissance et d'ancrage pour diverses protéines. A droite la forme ADN-A avec un petit sillon très écrasé et donc inaccessible ; A gauche la forme ADN-Z ou forme zig-zag, caractérisée par un pas à gauche.*

1.1.3 Autres structures secondaires

Soumis à un stress d'origine chimique (salinité, pH) l'ADN peut adopter des conformations différentes de la forme B. Une contrainte mécanique exercée par un expérimentateur extérieur peut aussi provoquer un changement de conformation; et même les moteurs moléculaires sont capables d'opérer de telles transformations par un travail mécanique.

Même si ce ne sont pas les conformations les plus courantes au sein de la cellule, certaines ont tout de même pu être cristallisées et résolues par diffraction aux rayons X. C'est le cas de la forme A, (Fig 1.4 gauche), adoptée lorsque l'hydratation de la molécule est faible [153][88]; dans cette conformation, l'ADN est peu flexible. La forme Z (Fig 1.4 droite) est rencontrée *in vitro* à haute concentration saline ou en présence d'alcool [153]; les régions de la molécule ayant une forte proportion de bases C-G présentent elles aussi une conformation en ADN-Z [153].

1.2 L'ADN dans son milieu naturel

Dans ce qui va suivre, nous nous attacherons à donner un aperçu des connaissances actuelles sur l'arrangement de l'ADN dans le noyau cellulaire en détaillant les premières étapes de la compaction : En partant de la molécule d'ADN nue nous verrons comment celle-ci s'agence avec huit protéines histones pour former une NCP puis un nucléosome et une succession de nucléosome appelée nucléofilament. Ce nucléofilament se replie sur lui même pour former une fibre de chromatine dite "fibre de 30 nm", fibre qui est elle-même compactée dans des structures plus vastes sur lesquelles nous avons encore peu d'informations.

Nous en profiterons pour discuter quelque peu des modifications chimiques et des variants des histones dans le contexte de la régulation de l'expression génétique et nous expliquerons comment nos expériences peuvent compléter les études purement biologiques.

1.2.1 La chromatine, de l'ADN au chromosome

Avant même l'article de Watson et Crick sur la structure de l'ADN, plusieurs codes expliquant comment il était possible de traduire une séquence définie de nucléotides en une séquence correspondante d'acide aminées avaient été suggérés, mais c'est celui proposée *in fine* par Matthaei et Nirenberg confirmé au début des années 60 qui c'est révélé juste [108][83].

Mais pour saisir comment ce flux d'information est géré dans le noyau cellulaire, il ne suffit pas connaître la correspondance entre une séquence de nucléotides et une séquence d'aa. Il faut aussi comprendre l'organisation de la molécule d'ADN au sein du noyau cellulaire et les interactions entre ADN et protéines. Ce n'est qu'avec la maîtrise des techniques de gel en électrophorèse et séparation par chromatographie, développées plus tard qu'il a été possible d'isoler des complexes ADN-protéines. L'analyse sur gel des

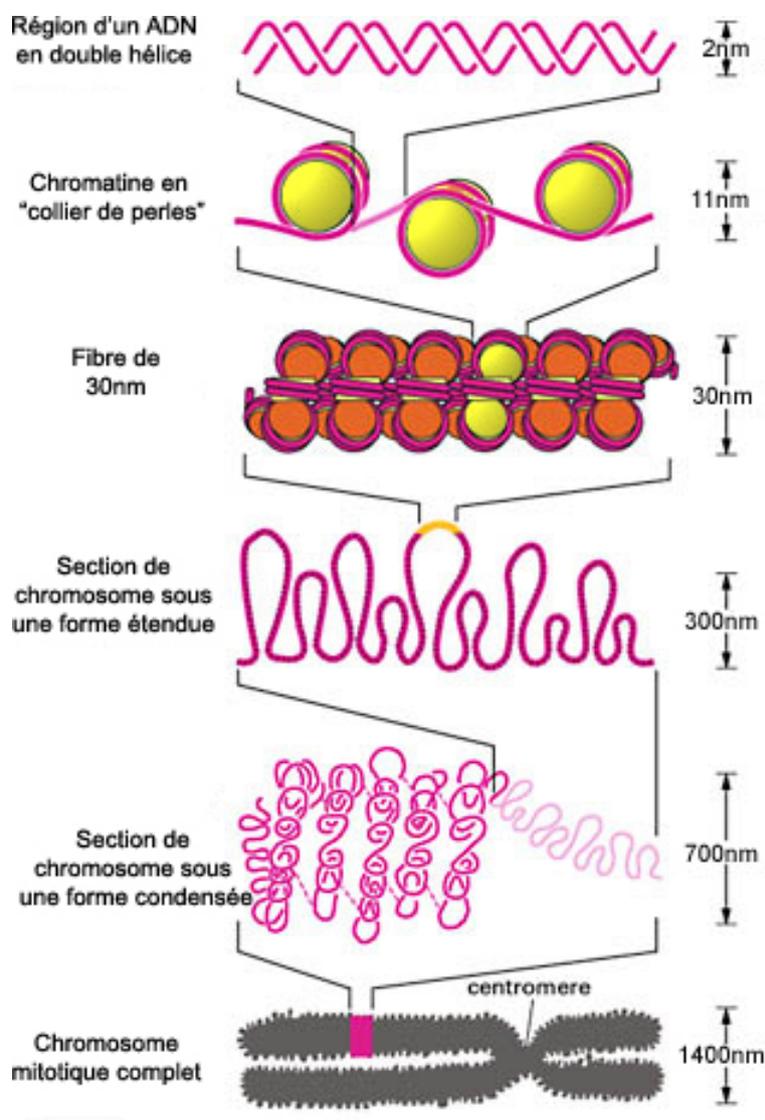


FIG. 1.5 – **Compaction de l'ADN : structure hiérarchique** La première étape consiste en l'enroulement de l'ADN autour d'une succession de cylindres protéiques (en jaune) appelés octamères d'histones. Cette fibre dite "de 10 nm" s'arrange ensuite en une fibre de 30 nm dont la structure fait l'objet de controverses. Les niveaux d'organisations supérieurs, des boucles de chromatine jusqu'au chromosome métaphasique, ne sont compris que très partiellement. Chaque molécule d'ADN est compactée en un chromosome mitotique $50000 \times$ plus court que la longueur curvilinéaire de la molécule d'ADN elle-même. Adapté de [2]

fragments d'ADN issus de la digestion de la chromatine par une enzyme nucléase, la nucléase micrococcale, révéla que des segments de 145 bp d'ADN étaient protégés de la digestion par l'enzyme, (Fig 1.6), [153].

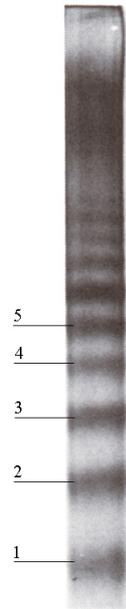


FIG. 1.6 – Gel d'électrophorèse d'ADN chromatinien auparavant digérée par la Mnase. *Ce gel révèle les longueurs des fragments d'ADN qui n'ont pas été digérés par la Mnase : Dans ces gels, les fragments les plus courts migrent plus loin que les fragments plus longs. Les bandes sombres montrent bien que les longueurs de ces fragments ne sont pas distribuées continuellement. Elles sont toutes des multiples entiers (chiffre de gauche) d'une longueur d'environ 145 bp correspondant à un nucléosome.*

Une association d'ADN avec un complexe de protéines pouvait expliquer ces résultats. Dès 1974 Kornberg proposait un complexe composé de quatre histones, chacune en double exemplaire [73]. L'ADN n'est pas couvert sur toute sa longueur par ces histones. L'association en complexe est plus ou moins périodique et dans chaque motif, appelé nucléosome, environ 145 bp d'ADN sont au contact avec les histones, (Fig 1.7). Cette structure a été ensuite visualisée par Olins & Olins [111] en microscopie électronique : elle a la forme désormais bien connue d'un collier de perles (Fig 1.8).

Structure des histones

Il existe cinq types majeurs d'histones : H2A, H2B, H3, H4 et l'histone de liaison H1 (H5 aussi chez les volatiles). Ces quatre premiers types d'histones, dits histones de cœur, sont parmi les protéines les plus conservées au cours de l'évolution des cellules eucaryotes, (Fig 1.9) [153]. Cela suggère que la chromatine des eucaryotes a évolué à partir d'un

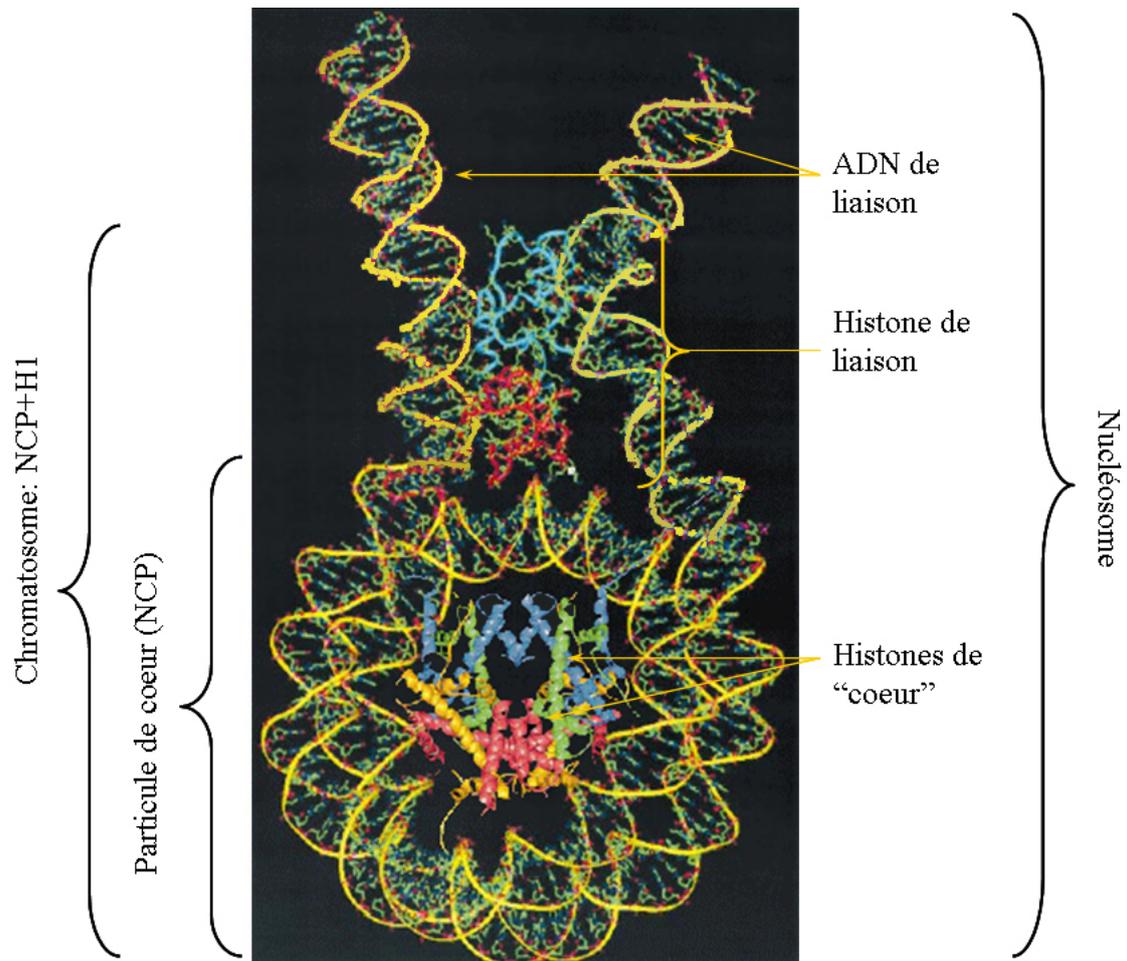


FIG. 1.7 – **Terminologie** : la particule de cœur du nucléosome (NCP) est constituée de huit histones de cœur autour desquels s’enroulent 147 bp d’ADN. On appelle chromatosome l’ensemble composé de la NCP, de l’ADN (~ 166 bp) au contact de l’histone de liaison et de l’histone de liaison, se situant à la sortie de la NCP, fermant celle-ci en rapprochant les ADN de liaisons entrant et sortant. Le nucléosome est l’ensemble du chromatosome et de l’ADN de liaison, reliant deux NCP consécutives. Montage d’après [23] [96]

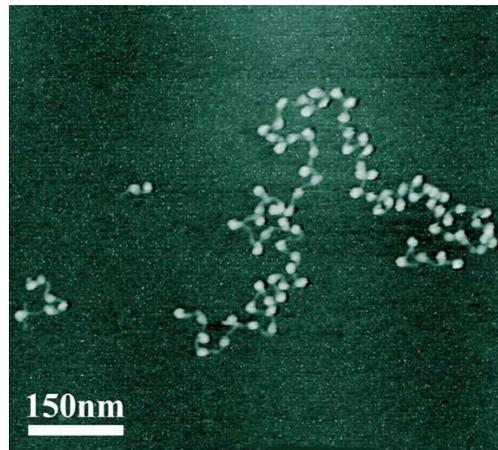


FIG. 1.8 – **Fibre de chromatine.** Image de chromatine issue de noyau d'érythrocyte de poulet obtenue avec un AFM-cryo. Aspect dit "en collier de perles" obtenu pour des concentrations salines faibles, autour de 10 mM. Chaque point blanc est un nucléosome. Ils sont liés entre eux par l'ADN de liaison. Image tirée de <http://www.people.virginia.edu/~zs9q/zsfig/chromatin.html>

ancêtre commun. Par exemple, entre les histones H4 du pois et du veau, sur 102 résidus au total, il n'y en a que deux de différents. Les histones H2A et H2B varient plus que les histones H3 et H4. Mais ces protéines histones sont bien plus conservées que la majorité des autres protéines.

La structure tridimensionnelle varie peu entre les histones : ce sont de petites protéines, de poids moléculaire moyen 14 kDa, constituées : d'une partie globulaire ; d'une queue N-terminale relativement longue, variant entre 12 aa et 37 aa (H2A et H3 du poulet) ; et d'une extrémité C-terminale plus courte, voire inexistante dans le cas de H3 ou H4. Seule la partie globulaire est structurée. Elle est composée essentiellement de trois hélices α reliées entre elles par deux boucles (Fig 1.10). Les histones sont, de loin, les protéines les plus présentes dans le noyau des cellules eucaryotes [153].

Certains résidus des queues N- et C-terminale des histones subissent des modifications chimiques en corrélation avec des événements tels la transcription ou la duplication d'ADN. La manière dont est affectée la chromatine par ces modifications chimiques n'est pas encore bien déterminée. Les connaissances actuelles ressemblent plutôt à un catalogue de corrélations faites entre modifications des histones et le recrutement de certains complexes protéiques. De toute évidence les histones, ne sont pas de simples protéines de compaction, elles jouent un rôle déterminant dans la régulation de l'expression génétique [55].

Ces modifications, dont nous traiterons par la suite (cf 1.2.2), sont aussi supposées altérer la stabilité des NCP ; Ainsi elles pourraient par exemple jouer sur le temps d'accessibilité de l'ADN nucléosomal à des facteurs de transcription. Pouvoir tester ces variations de stabilité en fonction de l'état chimique des histones est aussi une de nos motivations ini-

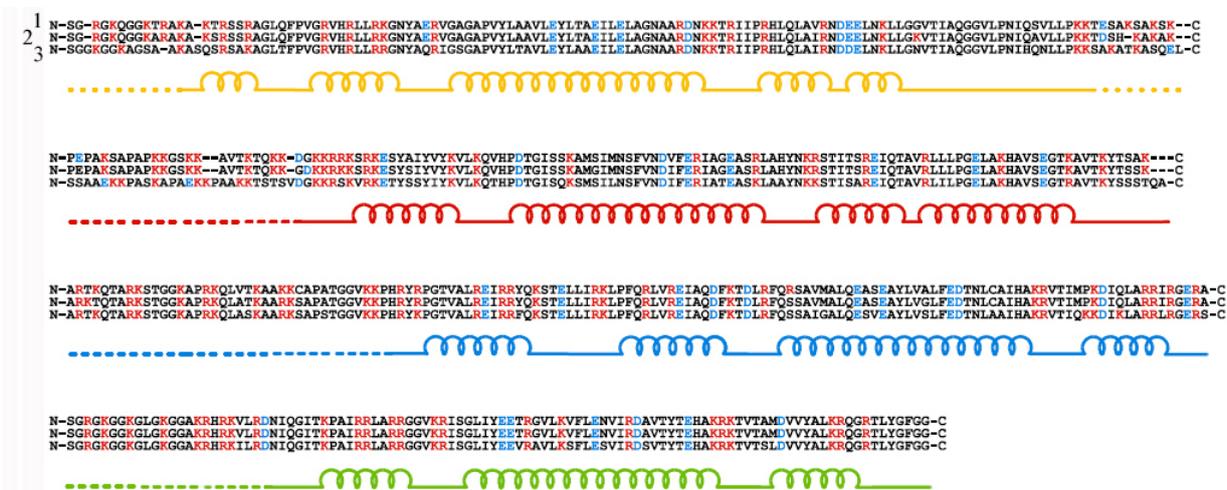


FIG. 1.9 – Comparaison des séquences nucléotidiques des quatre histones de cœur : *H2A* (jaune), *H2B* (rouge), *H3* (bleu) et *H4* (vert). Pour *xenopus laevis*, érythrocyte de poulet et enfin *saccharomyces cerevisiae* (levure), respectivement aux lignes 1, 2 et 3. Les nucléotides neutres sont en noir alors qu'ils sont en rouge s'ils sont chargés positivement et en bleu s'ils sont chargés négativement. Les histones suivent le même code de couleur que celui proposé dans la Fig 1.11. Les parties non structurées sont en pointillés. Les positions des hélices α sont elles aussi représentées.

tiales pour conduire nos expériences. Mais avant, allons voir d'un peu plus près comment ces histones sont associées avec l'ADN.

La particule de cœur, résolution atomique

La résolution de la microscopie électronique classique n'offre pas une résolution qui permette de saisir les détails de l'association ADN-histones à l'échelle atomique : Elle n'est pas limitée par la longueur d'onde associée aux électrons (exemple : à 200 keV, $\lambda \sim 6 \cdot 10^{-12}$ m), mais par l'ouverture du faisceau d'électrons qui ne dépasse pas 1° (*e⁻vertical*) (contre 65° parfois en microscopie classique) et surtout par le fait qu'il faille travailler avec un échantillon biologique avec un faible contraste : la résolution dans ces conditions est de l'ordre du nm.

Il faut donc envisager l'utilisation de la diffraction de rayons X, possible à condition d'avoir aussi pu réaliser un cristal de NCP suffisamment régulé. Les premiers cristaux ont été réalisés à la fin des années 70 [57]. Malgré leurs imperfections (variants d'histones présents, acétylation non contrôlée, séquences d'ADN mal définies) ils ont permis de déterminer l'arrangement globale de l'ADN par rapport aux histones. Pour améliorer la qualité des mesures de diffraction, il faut améliorer la qualité du cristal de nucléosomes. Pour cela, une séquence bien définie d'ADN a été sélectionnée et synthétisée : une sé-

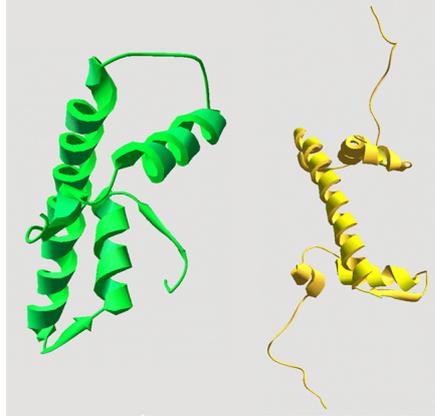


FIG. 1.10 – **Structure tertiaire des histones.** H_4 (en vert) et H_2A (en jaune). Les parties structurées, composées principalement de trois hélices α , sont visibles. Les queues N- et C-terminales sont partiellement définies; et les extrémités, sujettes à fluctuations, n'ont pas pu être résolues. D'après Protein Data Bank, "X-Ray Structure Of The Nucleosome Core Particle At 2.8 Å Resolution", <http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?job=graphics&pdbId=1AOI>

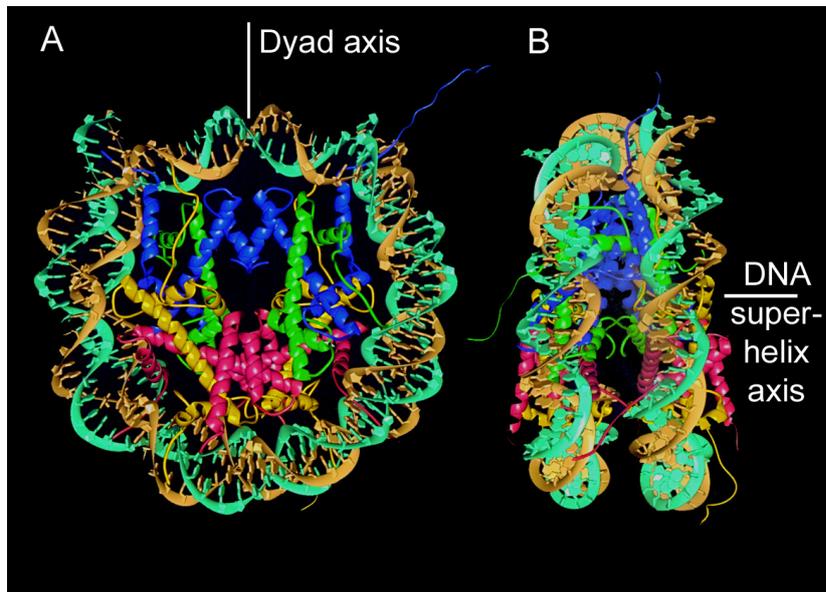


FIG. 1.11 – **Structure cristallographique de la NCP.** Résolution à 2.8 Å d'après [96]. Vues de dessus (A) et de profil (B). Les histones sont représentés selon le même code de couleurs que la Fig 1.9. Les brins de l'hélice d'ADN apparaissent en jaune et vert. Les extrémités N-terminale n'étant pas structurées et ne sont donc pas résolues par diffraction. Cependant les reconstructions montrent que les queues N-terminale de H_3 et H_2B , passent entre les deux boucles d'ADN.

quence palindromique d'ADN humain de 146 paires de bases, présentant une forte affinité pour l'octamère d'histones. Les histones, quant à eux, sont issues du génie génétique. Les dernières mesures de diffraction [118] résolues à 1,9 Å, révèlent des détails aussi précis que les liaisons entre ADN et histones, ou encore les variations d'hélicité de l'ADN le long de son axe lorsqu'il se trouve au contact des histones.

Le nucléosome est constitué d'une particule dite "de cœur", et de l'ADN, libre, entre deux particules de cœur consécutives, dit "ADN de liaison", et de l'histone de liaison (Fig 1.7). Les particules de cœur ressemblent à de petits cylindres, aux arêtes aplaties, de 6 nm de haut et de 11 nm de diamètre. Elles sont constituées de 146 bp s'enroulant en 1,65 tour d'une hélice à pas gauche autour d'un complexe de huit histones : l'octamère d'histones (Fig 1.11). Cet enroulement a presque une symétrie axiale : le pseudo axe de symétrie de l'octamère est appelé "axe de la dyade".

L'octamère d'histones est composé de deux copies de chaque histone H3, H4, H2A, H2B. Sa structure est tripartite : un tétramère central constitué de quatre histones (deux H3 et deux H4) est flanqué de part et d'autre de deux dimères H2A-H2B. Le pas moyen de l'hélice décrite par la molécule d'ADN autour de l'octamère est de 2.8 nm. Les dimères H2A-H2B sont remarquablement placés dans la continuité de l'hélice décrite.

Les queues des histones, non structurées, ne sont pas résolues par cette technique. Elles jouent pourtant un rôle essentiel dans la stabilité du nucléosome et même à une échelle au dessus, dans la stabilité de la fibre de 30 nm. Présentons maintenant la stabilité du nucléosome, seul en solution.

NCP en solution, stabilité

Les interactions électrostatiques ont un rôle prépondérant dans la complexation de l'ADN avec l'octamère d'histone (cf 1.3.1). Ainsi, en faisant varier les conditions salines, et donc les conditions d'écrantage, nous nous attendons à trouver des variations dans la configuration de cette association, (Fig 1.12). La cellule pourrait ainsi modifier la structure locale de la chromatine. *In vivo*, l'existence de gradient de concentration saline au sein du noyau n'est encore qu'une hypothèse. En revanche, *in vitro*, l'étude de la stabilité du nucléosome en fonction de ces concentrations nous permet de récolter une information sur la dynamique de celui-ci.

La stabilité de la NCP en solution dépend aussi d'autres paramètres : pH, température [16], et même de la concentration en chromatine elle-même [174][71]. Yager & al. ont fait la synthèse de nombreuses expériences sur le sujet [174] et ont tracé un diagramme de stabilité du NCP à 20°C, en fonction de la concentration saline et de la quantité en NCP. Plus récemment, avec le même jeu de paramètres, Khrapunov & al. [71], ont exploré la stabilité des NCP par des techniques de fluorescence. Les résultats sont cohérents et résumés dans la Fig (1.12).

La région 1 est la zone de stabilité des NCP complètes. Mais même dans cette zone l'octamère d'histone seul, sans ADN, n'est pas stable en solution : Il se décompose en

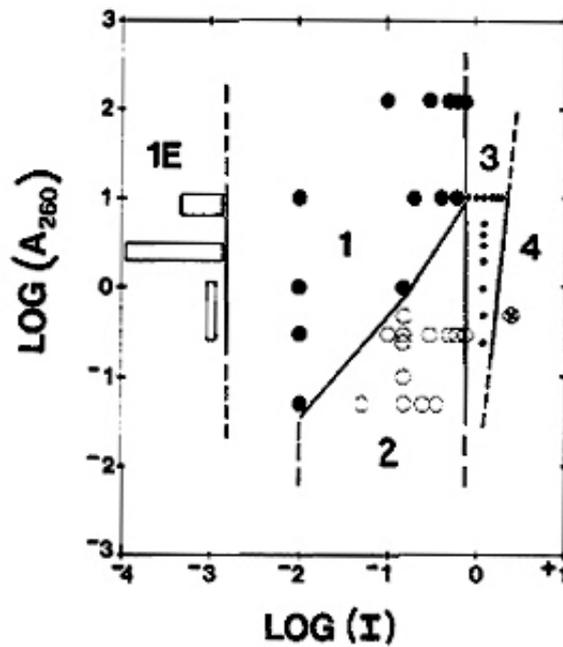


FIG. 1.12 – Diagramme de stabilité de la particule de coeur du nucléosome *En abscisse, Log de la concentration en sels monovalents. En ordonnée, Log de la concentration en ADN contenu dans les NCP. Cette concentration est évaluée en mesurant la quantité d'ADN en solution par absorption de lumière UV, à 260 nm. (1) Etat natif du nucléosome. (1E) A très faible concentration saline, en dessous de 1 mM en sels monovalents, le nucléosome est ouvert, les dimères H2A-H2B sont temporairement attachés au tétramère H3-H4. (2) et (3) Dissociation partielle du nucléosome : l'ADN et le tétramère H3-H4 restent associés mais les dimères H2A-H2B sont libérés dans la solution. (4) Vers 750mM et au-delà, le nucléosome est totalement dissocié, en ADN d'une part, et tétramère H3-H4 et dimères H2A-H2B d'autre part. Adapté de [174]*

un tétramère (deux H3 + deux H4) et deux dimères (H2A-H2B), stables séparément. Outre les interactions entre les résidus des dimères et ceux des tétramères, c'est l'ADN lui-même qui stabilise la structure en NCP : octamère complet + ADN. Et ce n'est qu'à plus haute concentration saline (à partir de 750 mM en sel monovalent) que l'octamère complet d'histones est stabilisé, même en l'absence d'ADN.

Et puis, à plus haute concentration saline encore, à 2M en sels monovalent, les histones ne se voient plus, ils sont tous indépendants.

Revenons maintenant à la stabilité de la NCP. Un accroissement de la concentration saline la déstabilise considérablement. Ce sont tout d'abord les dimères qui quittent la NCP, laissant l'ADN associé avec les tétramères. Dans cette zone (2 et 3) il existe aussi des octamères complets qui ne sont pas associés avec les molécules d'ADN. A concentration saline encore plus élevée, au dessus de 750 mM en sels monovalents, les seules particules stables sont l'ADN, les dimères et les tétramères et éventuellement des octamères. l'écrantage est tellement important, la longueur de Debye si petite ($L_D \leq 1$ nm), que ces particules ne se voient même pas.

Cette dissociation des NCP avec une concentration saline croissante est d'ailleurs largement mise à profit pour reconstituer des NCP artificiellement, à partir d'ADN et d'histones. Ces techniques de dialyse sont répandues et c'est ainsi que nous reconstituons certaines fibres de chromatine que nous utilisons ensuite dans nos expériences d'étirement (cf 2.2.2).

A concentration saline très faibles (<1 mM), les NCP adoptent une conformation ouverte, dite "relâchée", par opposition à l'état compact de la zone 1.

A concentration saline fixée, la variation de concentration en NCP peut elle aussi faire varier la stabilité des NCP : à une concentration saline physiologique en sels monovalents autour de 150 mM, il est possible de passer de la zone 1, où la NCP est stable, à la zone 2, où la NCP est partiellement décomposée. Pour cela, il suffit de diluer l'échantillon ; cet effet peut poser quelques problèmes d'interprétations des résultats d'expériences en molécules uniques sur la chromatine.

Histone de liaison, nucléofilament

Un autre acteur important pour la stabilité du nucléosome et la régulation génétique pourrait être l'histone de liaison.

Histone de liaison La cinquième histone est l'histone dite "de liaison". Cette histone participe au premier niveau de compaction de l'ADN au sein de la chromatine. La séquence de cette histone est beaucoup moins conservée que celle des histones de cœur. Plusieurs variants de cette histone, en proportions comparables, peuvent co-exister au sein d'un même organisme [153]. Certains de ces variants, si ils ont une séquence légèrement différente de la séquence originale, sont toutefois difficiles à séparer par les méthodes classiques d'électrophorèse. Ceux-ci sont nommés variants somatiques.

Pour l'espèce humaine, l'histone de liaison principale porte le sigle H1. Il existe plusieurs variants somatiques de H1 : par exemple H1⁰, H1a, b, c... Ces variants diffèrent peu les uns des autres, et peuvent souvent se substituer mutuellement [15]. Néanmoins l'hétérogénéité de leur distribution en fonction du type cellulaire considéré est source d'interrogations.

Il existe des variants dont les différences de séquence nucléotidiques sont plus importantes. Ces variants portent un autre sigle. Par exemple chez les volatiles comme le poulet, dont nous avons étudié la chromatine, le variant de type H5 est très présent, en quantité deux fois plus importante que l'histone H1.

Dans les œufs de *Xenopus Laevis*, batracien, la protéine B4 semble remplacer les histones de liaison. Nous avons aussi travaillé avec des fibres de chromatine.

H1 : Structure, positionnement Les histones de liaison, même si elles ont une séquence d'aa variable, ont structure commune : une partie globulaire [117] encadrée par deux queues, N- et C-terminales, riches en résidus lysine et arginine, donc chargées positivement en solution. L'extrémité C-terminale est environ trois fois plus longue que la partie N-terminale : une centaine d'aa contre une trentaine d'aa (92 contre 30, chez la truite par exemple [153]). On trouve aussi sur la queue C-terminale quelques résidus thréonine susceptibles d'être phosphorylés (Fig 1.13).

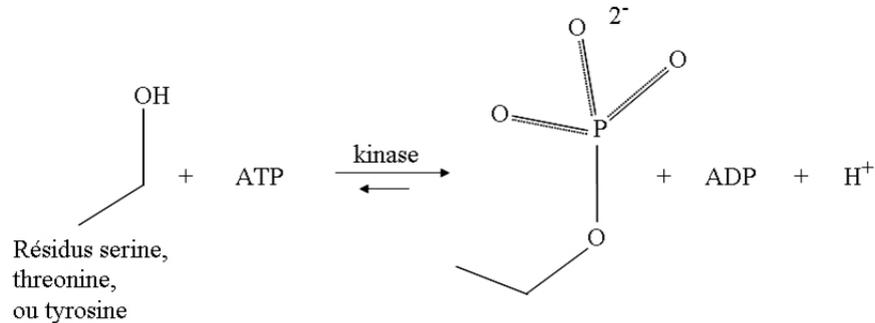


FIG. 1.13 – Schéma de la réaction de phosphorylation. Cette réaction est catalysée par une enzyme appartenant à la classe des kinases.

Il est communément admis que la partie globulaire se place au site d'entrée/sortie de l'ADN du nucléosome. En revanche, nous ne savons pas encore exactement comment se positionne cette histone vis-à-vis de la NCP [116][167][23] : son orientation exacte ainsi que ses sites de fixation ne sont pas encore bien définis. En effet, contrairement à la particule de cœur, personne n'a encore pu cristalliser un tel complexe et donc obtenir des informations structurales très précises.

La queue C-terminale riche en résidus chargés positivement semble stabiliser une structure en forme de doigt à la sortie du nucléosome [20] : elle maintient à proximité les brins

d'ADN entrant et sortant du nucléosome, (Fig 1.7) qui sans cela, auraient tendance à s'écarter l'un de l'autre par répulsion électrostatique. D'autre part, cette extrémité C-terminale de H1, en association dans un autre complexe, n'apparaît pas structurée dans les clichés de diffraction aux rayons X [117], ce n'est peut-être pas complètement le cas une fois qu'elle entre en interaction avec l'ADN à la sortie de la NCP. C'est ce que suggèrent les expériences de substitution de résidus, suivies d'une étude cinétique de l'affinité de l'histone de liaison pour la NCP : la simple substitution d'un aa en particulier (Thr 152), si elle ne modifie pas la charge globale portée par la queue C-terminale, réduit malgré tout considérablement l'affinité de l'histone H1.1 pour la NCP. Malgré une relativement grande variabilité, la séquence nucléotidique de la queue C-terminale lui permet peut-être, de s'ajuster au mieux avec l'ADN, ou ses sillons [65].

Rôle Du fait de sa grande variabilité (comparée à celle des histones de cœur [153]), l'hypothèse selon laquelle cette histone puisse ne pas être indispensable à la survie d'un organisme semblait raisonnable [14][167], et dans ce cas son rôle paraissait mineur. Pourtant, en-deçà d'un certain seuil, la faible expression des divers variants de l'histones de liaisons sont léthales ; C'est ce qu'ont montré récemment des expériences menées sur des organismes "knock-out" [53], c'est à dire des organismes dont on a retiré le(s) gène(s) codant pour la protéine qui nous intéresse.

Cette histone semble avoir un rôle dans la régulation de l'expression génétique. Une hypothèse plausible serait que H1, en se positionnant à la sortie de la NCP, fige un temps la structure du nucléosome. En stabilisant ainsi l'édifice, il contribue à diminuer considérablement le temps d'accès de l'ADN nucléosomal à la RNA polymérase par exemple. D'autre part, aucun lien entre ce rôle régulateur et les propriétés structurantes de l'histone de liaison (cf 1.2.1) n'est encore clairement établi [161].

La structure régulière en fibre de 30 nm (favorisée par la présence de l'histone de liaison, cf le prochain paragraphe) adoptée par la fibre de chromatine pourrait n'être en fait qu'un effet secondaire sans importance cruciale pour la survie de la cellule : Le rôle essentiel de l'histone de liaison étant d'inhiber ou tout du moins de réduire, la transcription. Cette idée est née de l'observation d'une corrélation entre regain d'activité de transcription et pauvreté en histone de liaison de la chromatine transcrite [168][145].

De plus, l'histone H1 est beaucoup plus mobile que les histones de cœur [105][87], constatation qui tend à confirmer l'hypothèse que H1 n'est pas une colle qui ferme le nucléosome mais plutôt un agent qui déplacerait l'équilibre entre nucléosome ouvert et nucléosome fermé, régulant l'accessibilité de l'ADN nucléosomal à la machinerie de transcription par exemple.

Fibre de 30 nm

A faible concentration saline, autour de 10 mM NaCl, et en l'absence de l'histone de liaison, la chromatine ressemble à un collier de perles. Avec l'histone de liaison, cette der-

nière adopte une structure tri-dimensionnelle en forme de zig-zag (Fig 1.14a)), [144][171][20], (cf 1.2.1).

En augmentant la concentration saline (diminution de la longueur de Debye), le collier de perles se replie sur lui-même. Autour de 80 mM NaCl, il prend l'aspect d'un cylindre, large d'environ 30 nm, constitué de nucléosomes (Fig 1.14d)). Ces fibres de 30 nm, obtenues *in vitro*, n'ont pas été clairement identifiées *in vivo*. Elles sont cependant fort semblables aux boucles de chromatine observées dans le noyau cellulaire. C'est aussi parce que la chromatine se trouve sous cette forme dans les conditions salines physiologiques *in vitro*, autour de 150 mM sels monovalents, que la compréhension de sa structure fait l'objet de nombreuses études.

Les histones, aussi bien de cœur que de liaison, jouent un rôle important dans le repliement de la fibre sur elle-même. En l'absence de l'histone de liaison, cette fibre est très peu ordonnée [153][144]. Par contre, avec l'histone de liaison, elle apparaît beaucoup plus régulière.

Pour les histones de cœur, ce sont principalement leurs queues non structurées qui semblent indispensables pour un bon repliement [99][22][48]. A faible concentration ionique (10mM NaCl), les queues sont adsorbées sur l'ADN nucléosomal mais en solution saline physiologique, la longueur de Debye est suffisamment faible (~ 1 nm) pour que les queues s'étendent dans le milieu. Elles pourraient ainsi favoriser une interaction entre nucléosomes, importante pour maintenir l'architecture de l'édifice.

Quelques modèles ont proposé un agencement des nucléosomes dans une telle fibre (Fig 1.15). La plupart des études concluent à une structure en hélice avec 6 à 8 nucléosomes par tour [56][166], mais l'arrangement final des nucléosomes est très variable selon les modèles.

Le premier modèle a été proposé en 1976 par Finch J. & coll. [56] (voir aussi [144][162]) Il s'agit du modèle solénoïdal (Fig 1.15 A) : continuant avec l'idée d'hélice, ce modèle propose un enroulement hélicoïdal des nucléosomes en une fibre de 30 nm. Chaque tour serait constitué de six nucléosomes. Dans ce modèle, les nucléosomes successifs sont voisins directs. L'ADN de liaison est donc courbé, dans la continuation du trajet imposé à l'ADN nucléosomal [56][103].

Le coût énergétique, lié à cette courbure de l'ADN de liaison, est prohibitif. Même si c'est l'histone de liaison qui est recruté pour courber l'ADN, les données portant sur l'orientation de l'ADN à la sortie du nucléosome, et sur la formation d'une structure en forme de doigt ne vont pas dans le sens de modèles solénoïdaux [20]. Suite à ces considérations énergétiques et à l'interprétation de nombreux clichés de microscopie électronique, d'autres modèles ont été proposés : modèle à deux hélices (Fig 1.15 B) [171] ou encore le modèle croisé plus connu sous son acronyme anglais de "cross linked model" (Fig 1.15 C), [166] [66] [85][20][170]. La structure 3D en zig-zag à faible concentration saline semble être précurseur de la structure de la fibre de 30 nm [19]. En augmentant la concentration saline, la structure en zig-zag se replie sur elle-même, alors que la structure en forme de

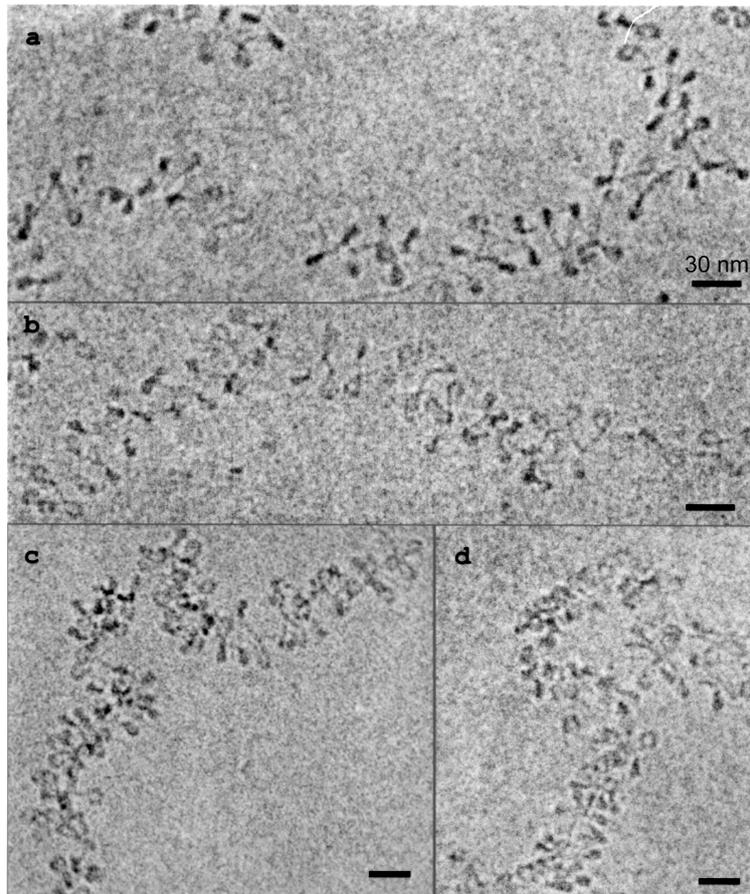


FIG. 1.14 – Repliement de la fibre de chromatine avec la concentration en sels monovalents. Clichés de cryo-microscopie électronique : pour a, b, c et d, respectivement, 5, 10, 20 et 45 mM. Adapté de [20].

doigt en sortie de nucléosome est conservée. Ainsi, deux nucléosomes successifs ne sont plus voisins directs dans la fibre de 30 nm.

Si c'est le modèle "cross linked" qui avait plus les faveurs de la littérature dernièrement, le débat a encore été relancé tout récemment. Des clichés de microscopie électronique portant sur deux types de chromatine différentes ont été interprétés en faveur soit du modèle solénoïdal [69] soit du modèle "cross linked" [49].

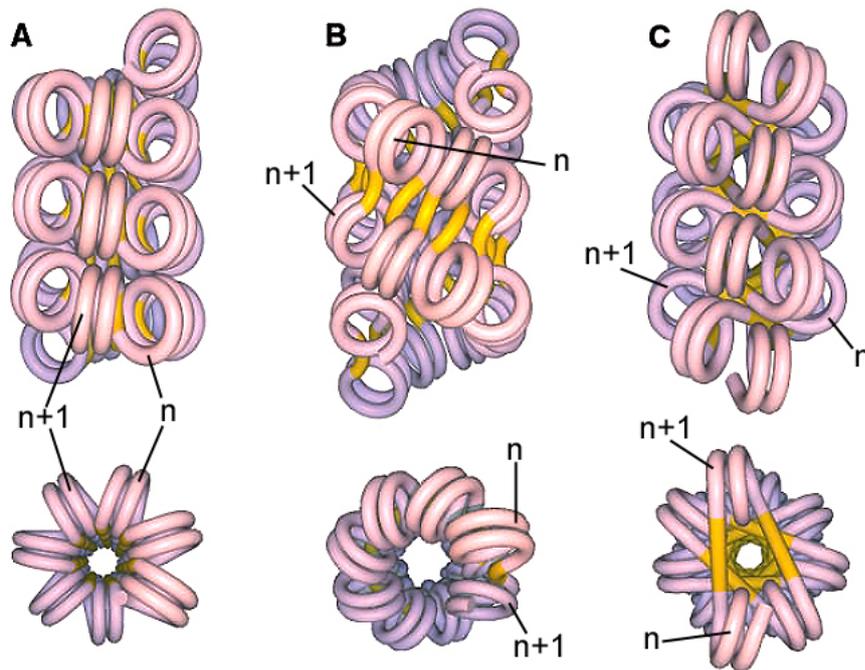


FIG. 1.15 – **Modèles de la structure de la fibre de 30 nm.** *En haut, vue de côté de la fibre, en bas, vue selon l'axe. L'ADN de liaison est en jaune et l'ADN entourant les octamères en rose. On repère par n le $n^{\text{ième}}$ nucléosome et $n+1$ le suivant (pas nécessairement voisin direct dans l'espace). **A** Modèle solénoïdal [56][162]. **B** Modèle à deux hélices enroulées [171]. **C** Modèle à hélices croisées [166]. Selon les modèles l'ADN de liaison est courbé (**A**) ou conserve sa rigidité **B** et **C**, ce qui est plus favorable énergétiquement. D'après [48].*

Au-delà du collier de perles

Les niveaux d'organisation supérieurs au-delà de la fibre de 30 nm sont encore moins connus. La densité en matériel dans le noyau est très importante, il est couramment admis que la concentration moyenne d'ADN varie entre 50 et 250 mg/ml selon l'endroit du noyau. Si les petites structures comme le nucléosome ont pu être résolues au nm avec des techniques classiques de microscopie électronique, il en va autrement pour les niveaux

d'organisation supérieurs, sensibles aux traitements infligés qui sont très corrosifs pouvant ainsi conduire à des erreurs d'interprétations.

Pour sa part, la microscopie optique ne possède pas la résolution suffisante pour résoudre ces structures, et la densité en matériel y est telle qu'il n'est possible d'en visualiser seulement l'enveloppe. Mais elle a tout de même mis en évidence que la chromatine interphasique est organisée en territoires chromosomiques [41][134], modifiables selon les besoins de la cellule : il a même été montré très récemment que deux gènes qui doivent être co-exprimés alors qu'il sont portés par deux chromosomes différents et se trouvent initialement dans deux zones différentes du noyau, peuvent être amenés au voisinage l'un de l'autre en vue de cette co-expression [135]. C'est l'une des premières preuves expérimentales d'une sorte de communication inter-chromosomal dans le cadre de la régulation de l'expression génétique.

1.2.2 Variants d'histones de cœur et modifications chimiques

Ainsi, la chromatine apparaît comme un milieu dense, où les histones auraient essentiellement un rôle de compaction de l'ADN. Pourtant, c'est dans ce milieu, à partir de la lecture de l'ADN, que sont produites toutes les protéines nécessaires à la survie de la cellule. C'est dans le noyau que se trouve l'information génétique qui, pour être utile, doit être sans cesse partiellement lue. C'est donc un milieu très actif.

On distingue essentiellement deux zones ou deux types de chromatine dans le noyau : L'hétérochromatine, dense et compactée ; et l'euchromatine moins dense. La corrélation entre la densité de la chromatine dans le noyau et l'activité de transcription a été établie et les histones n'ont plus été considérées comme de simples agents de compaction : L'idée que celles-ci pouvaient aussi participer à la régulation de l'expression des gènes émergeait.

Les gènes se situant dans les zones les plus compactes (hétérochromatine), inaccessibles à l'ARN polymérase entre autre, sont peu ou pas exprimés ; alors que les autres ont une activité de transcription plus développée. D'autres particularités soulignent l'aspect régulateur de la chromatine. C'est le cas de modifications chimiques qui affectent le plus souvent des résidus des queues N-terminale non structurées des histones ; ou encore du remplacement d'un type d'histone par l'un de ses variants. Dans la plupart de ces cas, ces changements sont corrélés avec un évènement ayant rapport avec une activation ou une répression de l'expression génétique.

Nous présentons dans la suite quelques-unes de ces modifications. Elles pourraient être impliquées dans la stabilité de la chromatine : Nous avons donc voulu le tester avec notre dispositif. En effet un des buts principaux de nos expériences est de sonder directement, mécaniquement, la stabilité d'un nucléosome : qu'il soit modifié chimiquement ou constitué avec des variants d'histones. Nous détaillerons ces différents nucléosomes et expliquerons dans quelle mesure la réponse d'un nucléosome à un stress mécanique peut varier, et quels en sont les intérêts dans le cadre de la régulation génétique.

Variants d'histones ce cœur

Comme pour l'histone de liaison, il peut coexister plusieurs variants d'une histone de cœur donnée. La plupart de ces variants ont une séquence proche de l'histone (variants dites 'homomorphes'). Même si ces petites modifications peuvent elles aussi jouer un rôle dans la régulation de l'expression génétique (cela semble être le cas pour la variante H3.3 de l'histone H3 [72], par exemple). Nous n'y porterons pas attention.

Il existe d'autres variants d'histones, (variants hétéromorphes), reconnaissables par leur différence de migration en électrophorèse sur gel de poly-acrylamide. Parce que la séquence de ces variants diffère fortement de celle de l'histone correspondant, on les soupçonne d'avoir un rôle structural et fonctionnel prononcé et spécifique. Le nombre et la nature des variants dépend de l'organisme, mais aussi du tissu et même de la zone du noyau considéré.

Une intense activité de recherche, a montré l'implication de ces variants dans divers processus cellulaire. De bonnes lectures concernant ce champ d'activité sont entre autre [153][15][72]. Nous exposons brièvement dans ce qui suit le rôle attribué aux variants H2ABbd et MacroH2A avec lesquels nous avons travaillé, dans le but de sonder les différences de propriétés élastiques des fibres reconstituées avec ces variants.

H2ABbd & MacroH2A H2ABbd est le dernier des variants identifié de l'histone H2A. "Bbd" sont les initiales du terme anglais "Barr body deficient", en référence à sa faible présence dans le chromosome X inactif des femelles de vertébrés. Des études de colocalisation par fluorescence révèlent sa présence dans des zones où l'histone H4 est acétylée [15]. Ce dernier évènement est aussi corrélé avec un regain d'activité de transcription. Le fait que les parties N- et C-terminales de H2ABbd soient tronquées tend à confirmer l'hypothèse d'une diminution de la stabilité du nucléosome, favorisant aussi le passage de l'ARN polymérase et donc la transcription. Des mesures de mobilité *in-vivo* avec des techniques de fluorescence (FRAP) confirme que le nucléosome composé avec H2ABbd est moins stable [60].

Comme son nom l'indique, MacroH2A est une variante volumineuse de l'histone H2A. Son poids moléculaire est beaucoup plus grand : 42 kD, contre 13.9 kD pour H2A. L'essentiel de ce surplus est contenu dans la partie C-terminale, la queue N-terminale étant peu modifiée. Contrairement à la variante H2ABbd, cette histone est très présente dans le chromosome X silencieux des femelles de vertébrés : on le soupçonne donc de contribuer à cette mise sous silence [40].

Modifications chimiques

Parmi les nombreuses modifications chimiques, qui affectent essentiellement les extrémités N-terminale non structurées des histones Fig 1.16, nous allons présenter plus particulièrement l'acétylation de la chromatine et ses conséquences supposées.

Avec le microscope électronique, il ne semble pas y avoir de grandes différences structurales entre la chromatine non acétylée et la chromatine hyperacétylée. Les clichés donnent une image statique des fibres de chromatine ; la différence réside très certainement dans les propriétés mécaniques de ces fibres. Cette hypothèse est une des motivations de notre étude des propriétés élastiques de la chromatine hyperacétylée. Pour des problèmes liés à la préparation de cette chromatine, nous n'avons hélas pas encore réussi à l'isoler dans notre cellule d'expérimentation.

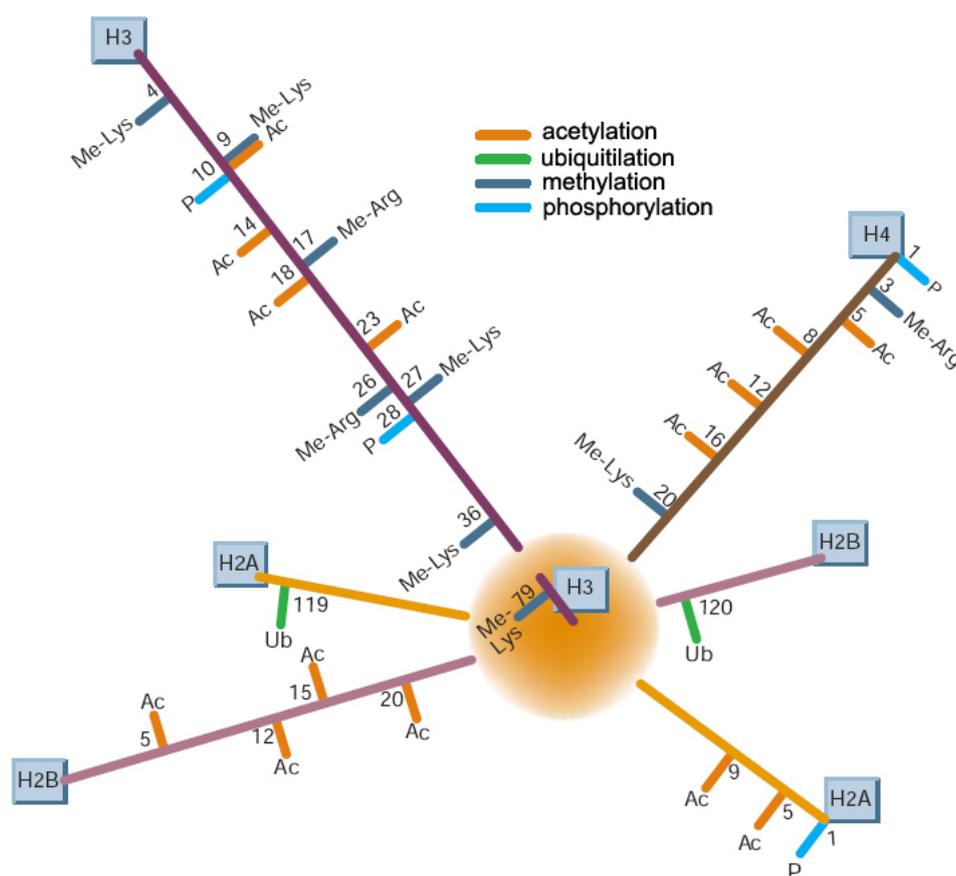


FIG. 1.16 – Principales modifications chimiques affectant les queues des histones. Il existe quatre principales modifications, acétylation (jaune), phosphorylation (bleu clair), ubiquitination (vert) et méthylation (bleu foncé). Les acides aminés affectés et connus à ce jour sont repérés par leur nom et leur position le long de la queue. Adapté de [55]

Acétylation L'acétylation consiste à substituer un groupement $-\text{NH}_3^+$ (forme acide de $-\text{NH}_2$, en solution physiologique) par un groupement neutre en solution : $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$,

(Fig 1.17). Cette transformation chimique affecte les résidus lysines des extrémités N-terminales des histones (Fig 1.16). Selon l'endroit où elle se produit, l'acétylation peut être réversible ou non. Deux grandes classes de protéines régulent cette réaction sur les résidus lysines : les "histones acétylases" et les "histones désacétylases" [34].

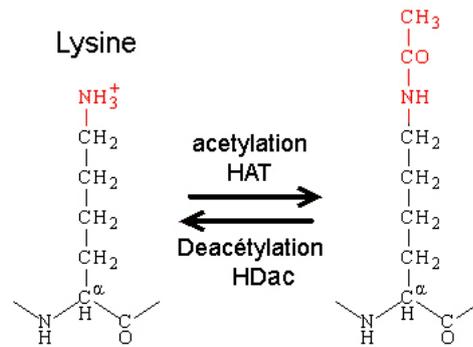


FIG. 1.17 – **Equilibre acétylation/désacétylation.** L'acétylation d'un résidu lysine est réalisée par une classe de protéines appelées "histone acétyl-transférase" (HAT). Les protéines effectuant la réaction inverse sont les "histones désacétylase" (HDac)

L'acétylation ou la désacétylation ont lieu en permanence dans le noyau des cellules en activité : même si son rôle exacte n'est pas encore bien compris, l'acétylation est impliquée dans la régulation de l'expression génétique : ainsi, elle est entre autre corrélée avec un regain de l'activité de transcription [151] [169]. Elle semblerait aussi jouer un rôle dans la spermatogénèse, lorsque les histones sont remplacées par les protamines, à la suite d'une acétylation de grande ampleur des histones (cf [153]).

Le remplacement d'un groupe chargé positivement par un autre, neutre, réduit probablement les interactions stabilisantes entre l'ADN et les histones. La configuration de la chromatine est alors plus ouverte [15], un peu plus souple [150]. Le temps d'accès à l'ADN nucléosomal pour la machinerie de transcription est accru i.e. la probabilité de reconnaissance d'un site promoteur, par exemple, est ainsi augmenté. Cette hypothèse cadre bien avec la corrélation entre acétylation et regain de l'activité de transcription mais elle est encore sujette à controverse.

Une autre hypothèse serait que ces acétylations spécifiques (ne touchant que quelques résidus précis) sont des signaux pour recruter d'autres protéines, ou complexes de protéines comme des facteurs de remodelage de la chromatine. Les modifications structurales des queues des histones (début d'hélice α), engendrées par l'acétylation, augmenteraient l'affinité entre cette partie de la queue modifiée et une autre protéine, par exemple un facteur de remodelage de la chromatine. Le temps de résidence de celui-ci près du nucléosome augmente, comme la probabilité de remodelage du nucléosome par ce complexe. Ces deux effets jouent certainement de concert *in vivo*.

Méthylation, ubiquitilation : vers un "code histone" ? La méthylation, la phosphorylation (Fig 1.13), l'ubiquitilation et l'ADP-rybosylation sont d'autres transformations chimiques portant sur les résidus des queues N-terminales des histones. A chacune de ces transformations est associé un jeu d'enzymes spécifiques qui régulent selon le contexte (type cellulaire, phase du cycle cellulaire, transcription, duplication...) l'ampleur de ces modifications. Celles-ci sont pour la plupart réversibles. Néanmoins, concernant la méthylation, des protéines "méthylases" (catalysant la méthylation) ont été identifiées, mais une seule enzyme de type "déméthylase" (spécifique à la lysine) a été rencontrée jusqu'à ce jour, et ce, très récemment [130].

Pour chacune de ces transformations, de multiples corrélations avec d'autres paramètres biologiques ont été clairement établies. Ces modifications chimiques s'affectent aussi l'une l'autre, de telle sorte que nous ne disposons pour l'instant que d'une vision très partielle de l'ensemble de la dynamique de la chromatine : Ces influences entre modifications peuvent avoir lieu dans le voisinage l'une de l'autre. (La phosphorylation d'un site peut promouvoir l'acétylation d'un site voisin [137]). Mais ces interférences peuvent aussi s'établir entre modifications portant sur des extrémités N-terminales de deux histones différentes [50].

Dès la première découverte de ces modifications chimiques des histones, au début des années soixante (voir [153]), est née l'idée d'un "code histone". Un jeu de transformations pourrait coder pour le recrutement de telle ou telle protéine, ou facteur de remodelage, enclenchant toute une cascade contrôlée d'évènements.

Néanmoins les aspects purement physiques ne sont pas à écarter. En plus du recrutement de telle ou telle protéine, une modification chimie ou une histone variant peut de façon concomittante (dé)stabiliser la structure du nucléosome, facilitant d'autant les réactions. Toute la régulation génétique semble s'établir sur ces modifications relativement simples, peu coûteuse en énergie, et capable de déplacer considérablement un équilibre chimie en conjuguant deux effets : un effet chimie (signaux de recrutement) et un effet plus mécanique jouant sur le temps d'accessibilité de l'ADN nucléosomal.

En tenant compte de l'ensemble de ces paramètres, la chromatine apparait comme une structure définie et très dynamique, dont l'évolution ne doit rien au hasard, une mécanique bien huilée par des millions d'années d'évolution. L'étude de ces modifications chimiques est d'autant plus passionnante qu'elles semblent être impliquées dans la transmission de caractères par des processus épigénétiques.

1.3 Expérience de mécanique sur molécule unique

Les expériences de type "molécule unique", courantes aujourd'hui, permettent d'aller sonder directement les propriétés d'un assemblage moléculaire individuel. Il est désormais possible d'aller mesurer les forces exercées par un moteur moléculaire (myosine, kinésine, ARN polymérase...) en déplacement sur son substrat, le frottement entre une topoiso-

mérase et l'ADN, ou même de suivre le fonctionnement du moteur pas à pas qu'est la F1-ATPase [109][121].

Ce type d'expérience apporte une information nouvelle : plutôt qu'une information d'ensemble, moyennée, nous recueillons une information sur un système individuel. Dans le contexte de la chromatine, ce type d'expérience rend envisageable de quantifier l'énergie mise en jeu pour associer ADN et octamère d'histones, ainsi que les variations de cette énergie avec les modifications rencontrées dans le noyau cellulaire. C'est aussi avec de tel outil qu'il est possible de sonder les propriétés dynamiques du nucléosome.

1.3.1 Energie, force et temps

Dans ce qui suit, il est question de donner un ordre de grandeur des forces et énergies mises en jeu à l'échelle de la molécule unique, ordre de grandeur qu'il faut avoir à l'esprit pour concevoir des expériences ayant une sensibilité suffisante. Puis nous expliquerons brièvement comment il est possible d'extraire des informations sur le paysage énergétique à l'équilibre d'une association de molécules, à partir des données issues des étirements qui, le plus généralement, poussent cette association hors de l'équilibre thermodynamique.

Energies et forces mises en jeu

Entropie En imposant la position des extrémités d'un polymère modèle, même si il est infiniment souple, il faut exercer une force pour éloigner ces extrémités, car il faut réduire l'entropie de la chaîne. C'est contre ce terme entropique dominant, qu'il faut lutter lorsque nous tirons sur une molécule d'ADN. Nous pouvons avoir un ordre de grandeur de la force en considérant un modèle très simple de la molécule d'ADN qui ne tient pas compte de sa structure atomique. La molécule est assimilée à une corde flexible de section S et de module d'Young Y . Dans ce cas le module de courbure, B , est :

$$B = YS \tag{1.3.1}$$

Sous l'effet des fluctuations thermiques, l'ADN tend à se courber, et ce, sur une longueur caractéristique L_p appelée longueur de persistance. Cette longueur met en rapport l'entropie et le module de courbure de l'ADN qui caractérise sa résistance à la courbure :

$$L_p = \frac{B}{k_B T} \tag{1.3.2}$$

Dans des conditions salines physiologiques, la longueur de persistance de l'ADN est de 50 nm. Effectivement, en tirant sur les extrémités de ce polymère nous réduisons ses degrés de liberté et donc son entropie. Cela a un coût : la force qu'il faut exercer. L'amplitude

de la force d'origine entropique contre laquelle il faut lutter pour étirer notablement la molécule est de :

$$F_{\text{entropique}} = \frac{k_b T}{L_p} \propto 0.1 \text{ pN} \quad (1.3.3)$$

Ainsi, plus un polymère est rigide (L_p grande, donc B grand) moins il faut lutter contre l'entropie pour l'étirer.

Liaisons Nous donnons ici quelques ordres de grandeurs des énergies d'interactions rencontrées en biologie et nous les recadrons avec notre centre d'intérêt : le nucléosome. Ce ne sont que des ordres de grandeur d'énergie et non d'énergie libre : ils ne tiennent pas compte des fluctuations thermiques, qui favorisent le passage des barrières de potentiel.

Ce qui marque le plus le physicien en considérant le nucléosome, c'est de constater à quel point l'ADN, enroulé autour de l'octamère d'histones, peut être courbé : l'ADN nucléosomal fait presque deux tours complet, soit 4π radians sur une longueur de 50 nm qui est sa longueur de persistance moyenne en solution physiologique. La compréhension de ces interactions ADN-histones dans le contexte de la transcription permettrait d'expliquer comment la lecture de l'ADN nucléosomal par la machinerie de transcription est possible et si efficace. Nous y reviendrons à plusieurs reprises.

Liaisons covalentes Une liaison covalente est typiquement d'une longueur de 1 Å. L'ordre de grandeur de l'énergie stockée dans une liaison de ce type est $50 k_B T \sim 200 \text{ pN nm}$ ($1 k_B T \simeq 4 \text{ pNnm}$). Ainsi, une borne supérieure de la force à fournir pour casser une liaison covalente est de 200 pN

Pour les fibres de chromatine nous ne rencontrons pas de liaisons aussi solides entre l'ADN et les histones. Une telle solidité n'est pas envisageable pour des édifices moléculaires sans cesse remodelés. A accessibilité égale de l'ADN, le coût énergétique de rupture d'une telle liaison est prohibitif. Ce sont les interactions électrostatiques et de types Van der Waals, moins fortes individuellement qu'une liaison covalente, qui contrôlent la complexation de l'ADN par les octamères d'histones.

Electrostatique Outre l'ajustement structural entre l'ADN et l'octamère d'histone (cf 1.2.1), l'électrostatique régule la plupart des interactions non spécifiques entre l'ADN et les histones, et plus généralement entre l'ADN et les protéines qui interagissent avec lui [138].

La complexation de l'ADN par des macro-ions est pilotée par un phénomène intrigant : la libération de contre-ions [102][28][129]. En solution saline, un nuage de petits contre-ions cationiques est condensé sur l'ADN chargé négativement. Lorsque la complexation avec un macro-ion intervient, l'énergie libre du système est alors essentiellement

dominée par un terme entropique croissant lié au relargage dans la solution de ces contreions. Ce phénomène peut expliquer la stabilité du nucléosome conjuguée avec l'accessibilité de l'ADN nucléosomal. Nous ferons appel à cet effet pour interpréter certaines de nos données (cf 5.3.1).

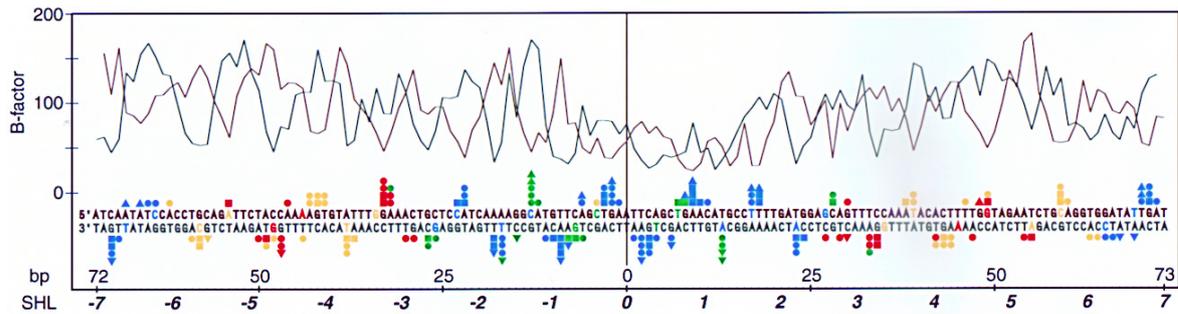


FIG. 1.18 – **Interactions ADN-histones.** Les interactions du squelette phosphaté de l'ADN avec les histones (même code de couleur que pour la figure 1.11) sont représentées selon le code suivant : les carrés et les cercles représentent les liaisons hydrogènes, les triangles figurent les liaisons de type hydrophobes. En haut, le "facteur B" des phosphates du squelette de l'ADN nucléosomal. Le facteur B décrit combien l'agitation thermique d'un groupe d'atomes perturbe le signal de diffraction. Plus ce facteur est grand moins le groupe d'atome participe au signal de diffraction. Ceci permet de discerner les zones de liaisons entre l'ADN et l'octamère : ce sont les zones où le facteur B est le plus petit. La position le long de l'ADN nucléosoma est repérée soit par le numéro de la bp soit par le SHL (Super helix location) c'est à dire la topologie de la double hélice d'ADN nucléosomal. La position zéro est prise au niveau de l'axe de la dyade. D'après [96]

Interactions type Van der Waals La résolution de la NCP aux rayons X permet d'avoir un meilleur aperçu de la nature des interactions spécifiques ADN-histones de type Van der Waals, ainsi que de leurs positions. Les résultats évoqués dans [96] sont propres à une séquence particulière d'ADN qui se prête bien aux techniques de cristallisation, mais ils se généralisent à la plupart des séquences d'ADN.

Ces interactions entre résidus (histones) et squelette de phosphodiester (ADN) s'établissent toutes les dix paires de bases environ, pour la majeure partie au niveau du petit sillon de l'ADN, lorsque le squelette de phosphodiester fait directement face aux histones. On peut dénombrer au total 14 sites d'ancrage le long du chemin décrit par l'ADN autour de l'octamère [96][44].

Pour permettre un meilleur ajustement aux sites de liaisons, le pas de la double hélice est sensiblement modifié au sein du nucléosome : Pas de 10.2 tours dans le nucléosome contre 10.5 tours en moyenne en solution. Ceci confirme les résultats de biologie moléculaire obtenu par digestion de l'ADN exposé (ADN qui n'est pas en contact direct avec les histones) avec l'enzyme DNase 1 [153].

Notion de taux de charge

Les liaisons non covalentes jouent un rôle majeur en biologie, autorisant toutes sortes de liaisons réversibles, comme celle d'une enzyme avec son ligand par exemple. La "colle moléculaire", biotine-streptavidine, que nous utilisons pour attacher les fragments d'ADN à nos billes est un exemple remarquable d'assemblage par liaisons non-covalentes multiples. Il faut exercer une force d'environ 160 pN pour pouvoir séparer les deux molécules [58]. A l'opposé, près de l'équilibre thermodynamique, il ne faudrait qu'une force d'environ 2-3 pN pour pouvoir libérer l'ADN nucléosomal de l'octamère d'histones[113]. Cependant ce ne sont que des estimations à partir de résultats d'expériences de calorimétrie, dont les limites ont été montré par la suite.

Au sein même du nucléosome, qui doit être à la fois stable mais facilement modulable, nous ne rencontrons que des liaisons non covalentes entre l'ADN et l'octamère d'histones. L'énergie d'adhésion qui est mise en jeu au niveau de chaque point d'ancrage est de quelques $k_B T$ ($\sim 2 k_B T$). Sachant que $1 k_B T \propto 4$ pN nm, la gamme d'énergie pour casser de multiples liaisons de cette nature s'étend de quelques pN à une centaine de pN. A l'équilibre thermodynamique, ces liaisons s'établissent et se cassent au gré des fluctuations thermiques. Un équilibre entre état lié et état partiellement dissocié s'établit. La compréhension de la rupture de telles liaisons lors d'expériences sur molécule unique n'est envisageable qu'en maîtrisant les relations entre force, temps de vie et chimie à l'échelle moléculaire.

Kramers a développé dans les années quarante une théorie des processus stochastiques reliant le temps de vie et la force extérieure pour décrire l'activation cinétique de réactions chimiques [76]. Pour passer d'un état lié (dans un puits de potentiel) à un état non lié, le système explore aléatoirement le paysage énergétique, préférant franchir les barrières énergétique (ou les cols, s'il y a plusieurs dimensions) les moins élevées. Le taux de passage, k , d'une barrière énergétique d'amplitude E_B séparant l'état lié de l'état dissocié est décrit par :

$$k = k_0 e^{\frac{E_b(F)}{k_B T}} = k_0 e^{\beta E_b(F)}. \quad (1.3.4)$$

Où k_0 dépend des caractéristiques du paysage énergétique, notamment les courbures au niveau des puits et des cols, et la distance entre ces derniers ; et $\beta = \frac{1}{k_B T}$. En appliquant une force externe à ce système, nous modifions le paysage énergétique initial en abaissant les barrières de potentiel à franchir (Fig 1.19). Ceci semble donc favoriser les transitions entres états. Mais ceci n'est valable qu'à l'équilibre thermodynamique, donc si le système, a le temps de percevoir ce changement dans le paysage énergétique et donc si les fluctuations ont le temps d'explorer le paysage.

Sinon il faut décrire la dynamique de l'ensemble et prendre en compte le paramètre temps. Celui-ci intervient à travers la vitesse avec laquelle la force est appliquée, dF/dt

autrement dit le taux de charge imposé au système. Si la force est appliquée trop rapidement, c'est à dire dans un temps plus court que le temps typique de relaxation de l'édifice moléculaire contraint ($\tau_0 = 1/k_0$) alors la liaison résiste. Comme $(dF/dt)^{-1}$ n'a pas la dimension d'un temps, la comparaison avec τ_0 n'est pas triviale.

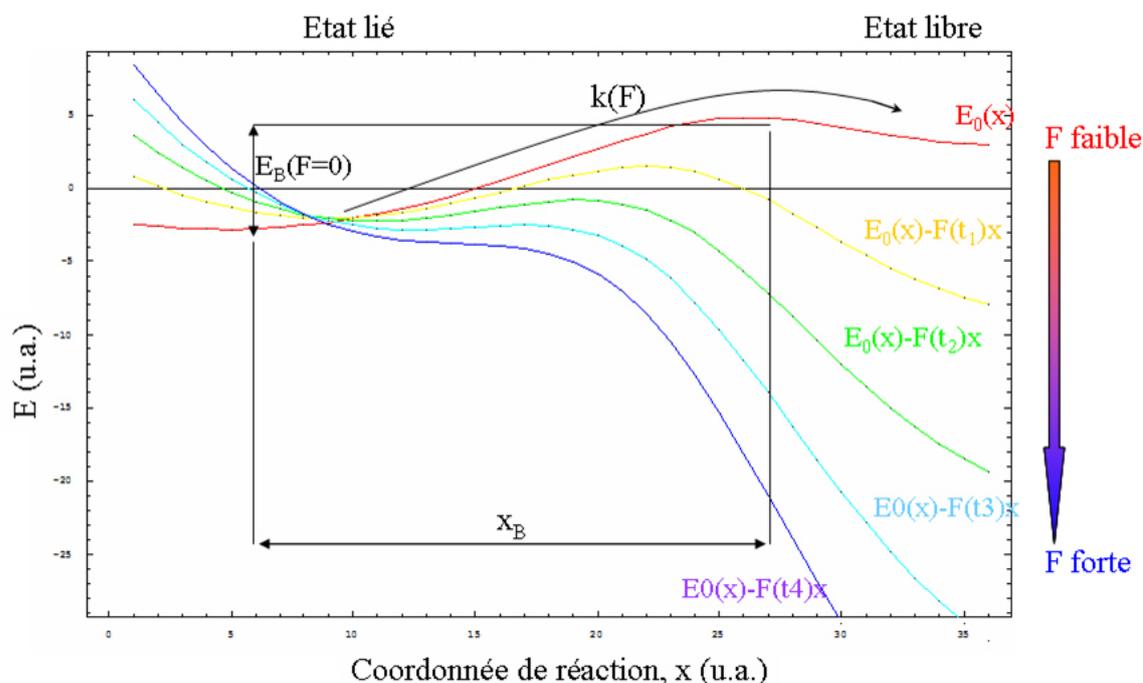


FIG. 1.19 – **Modification d'une barrière énergétique en appliquant une force $F(t)$ croissante.** Hypothèses simplificatrices, pour aboutir à l'expression de la force de rupture la plus probable F^* : (i) les positions des minima et maxima de l'énergie ne varient pas avec F ; (ii) la distance x_b reste constante ; (iii) dans le cas de minima énergétique intermédiaires, l'état fondamental est supposé infiniment plus profond.

Dans les expériences en molécule unique, la notion de force de déplieement ou de rupture ne prend ainsi de sens qu'au regard du taux de charge appliqué au système. Ce dernier peut pourtant être un atout pour étudier, justement, des barrières énergétiques, à l'équilibre, entre deux états.

En multipliant les expériences, en faisant varier le taux de charge, il est possible de reporter sur un graphique la force de rupture la plus probable F^* , en fonction du taux de charge. Une barrière énergétique E_b , distante de x_b est décalée par l'application d'une force F (Fig 1.19). Elle est franchie avec un taux $k_{rupture}$:

$$k_{rupture}(F) = k_0(F)e^{\beta(E_b - Fx_b(F))} \quad (1.3.5)$$

En supposant que ni les positions relatives des extrêmes du paysage énergétique (hypothèse de barrière abrupte), ni la courbure locale du potentiel autour de ces extrêmes, (hypothèse de puits raide) ne varient avec F , alors l'équation précédente peut se réécrire :

$$k_{rupture}(F) = k_0 e^{\beta(E_b - Fx_b)} \quad (1.3.6)$$

Dans nos expériences ou l'extension est imposée, la force varie avec le temps et la probabilité de survivre (P_{surv}) dans l'état initial est donnée par :

$$\frac{dP_{surv}}{dt} = -k_{rupture}(t)P_{surv}(t) \quad (1.3.7)$$

soit en intégrant :

$$P_{surv} = e^{\int_0^t k_{rupture}(F(u))du} \quad (1.3.8)$$

Nous pouvons alors déterminer la force de rupture la plus probable, maximum de la densité de probabilité $n(t) = d(1 - P_{surv}(t))/dt$. Cette force est différente de la force moyenne pour laquelle il faudrait connaître explicitement cette densité de probabilité.

On calcule F^* en écrivant :

$$\frac{dn(t)}{dt} = \frac{d^2(1 - P(t))}{dt^2} = 0. \quad (1.3.9)$$

soit en reprenant l'expression de $P(t)$ et en posant :

$$k_{b0} = k_0 e^{-\beta E_B}, \quad (1.3.10)$$

alors

$$\frac{d^2 e^{-k_{b0}\rho(t)}}{dt^2} = 0. \quad (1.3.11)$$

ou encore en notant :

$$\rho(t) = e^{\beta \int_0^t du F(u) x_b}, \quad (1.3.12)$$

soit :

$$\frac{\rho''(t)}{\rho'^2} = k_{b0}. \quad (1.3.13)$$

Dans les expériences, la relation entre la force appliquée et le temps est linéaire : $F = rt$ (où r est le taux de charge c'est à dire la vitesse à laquelle la force est imposée au système). En ce cas,

$$\rho = e^{\beta \int_0^t du \ u \times r \times x_b} = 1/(\beta x_b r) \times (e^{\beta x_b r t})^{-1}. \quad (1.3.14)$$

et F^* dépend de

$$F^*(r) = \frac{1}{\beta x_b} \ln \left(\frac{\beta x_b r}{k_0} \right) + \frac{E_b}{x_b}, \quad (1.3.15)$$

ou encore :

$$F^*(r) = \frac{1}{\beta x_b} \ln \left(\frac{r}{r_0} \right) + \frac{1}{\beta x_b} \ln \left(\frac{\beta x_b r_0}{k_0} \right) + \frac{E_b}{x_b}. \quad (1.3.16)$$

Le facteur d'échelle est pris en général égal à $r_0 = 1 \text{ pN s}^{-1}$. Cette relation 1.3.14 est basée sur des hypothèses simples (Fig 1.19). Elle est utile car elle relie linéairement la force la plus probable de passage d'une barrière énergétique et le logarithme du taux de charge. En estimant k_0 , il est possible de remonter à un ordre de grandeur sur la coordonnée x_b et surtout sur la hauteur de la barrière à l'équilibre thermodynamique E_b avec un simple ajustement linéaire dans le graphe expérimental de F^* en fonction de $\ln(r)$ (Fig 1.20).

Pour les cas simples avec une unique barrière énergétique à franchir, ou des barrières énergétiques bien distinctes, ce modèle est exploitable. C'est par exemple ce qu'ont proposé Evans & al. lors de leur étude des affinités entre la biotine et la streptavidine [104] (Fig 1.20). Pour les cas plus compliqués, il faut des théories plus élaborées (existence de plusieurs minimas intermédiaires, ou une topologie du paysage énergétique offrant plusieurs chemins possibles) [52][45][18][140].

Le passage d'un état libre à un état étiré ne peut pas se réduire au simple franchissement d'une unique barrière énergétique, mais cette dépendance de la force critique avec le taux de charge donne un ordre de grandeur des barrières à franchir : Cela porte le sigle de DFS ou "Dynamic Force Spectroscopy".

1.3.2 Quelques dispositifs

Nous présentons ici quelques dispositifs expérimentaux qui ont été utilisés pour sonder les propriétés mécaniques d'une molécule unique d'ADN (Fig 1.21). Nous n'entrerons

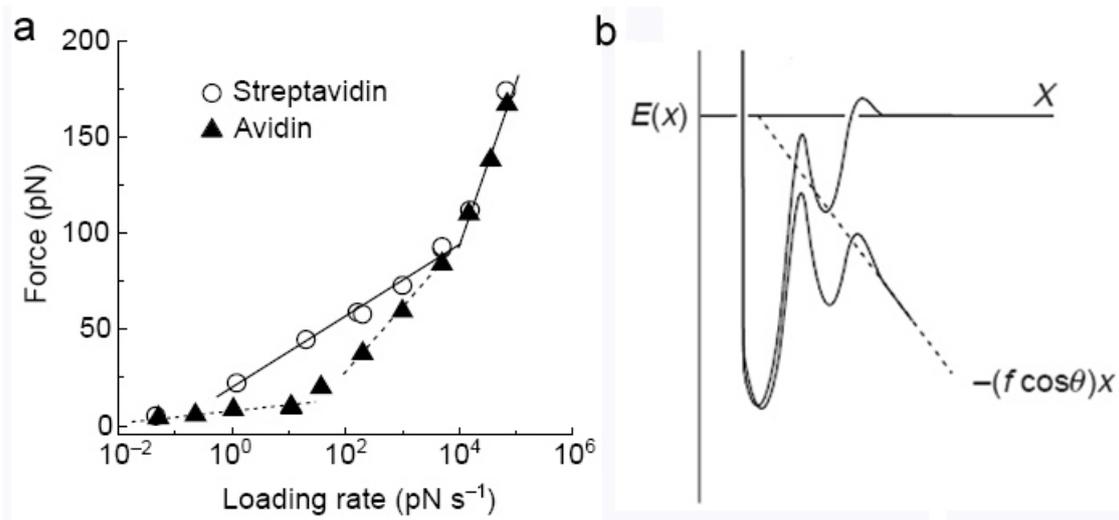


FIG. 1.20 – Mise en évidence expérimentale de plusieurs régime possible lors de l'étirement puis de la rupture des liaisons biotine-streptavidine ou biotine avidine. **a** Dans ces coordonnées, une droite est interprétée comme la présence d'une barrière énergétique séparant deux états. Les ajustements linéaires par morceaux sur les données expérimentales sont interprétés comme la signature de plusieurs barrières énergétiques : chacune de ces barrières ne se révèle pas pour le même taux de charge (**b**). Reproduit de [104]

pas dans les détails de ces expériences sauf pour les pinces optiques, que nous utilisons, indiquant simplement l'intérêt de chaque montage ainsi que quelques ordres de grandeurs des constantes de raideur ou de la gamme de forces accessibles. Nous mentionnons aussi quelques solutions permettant d'appliquer un couple à une molécule d'ADN et éventuellement une fibre de chromatine.

Principes communs

Pour les expériences sur molécule unique, que ce soit l'extension ou la force qui est imposée, le capteur de force est assimilé à un petit solide en mouvement dans un fluide, contraint par un ressort de raideur k , fixée. Dans l'approximation de ce puits de potentiel harmonique, les petits déplacements, Δx , autour de la position d'équilibre sont simplement reliés à la force subie par la relation $F = k\Delta x$. Ainsi dans ces expériences, des capteurs de positions sensibles suffisent pour mesurer la force s'exerçant sur la molécule. Cela requiert au préalable (sauf pour les pinces magnétiques) une calibration du dispositif pour connaître k (en fonction de la puissance laser utilisée, dans le cas des pinces optiques).

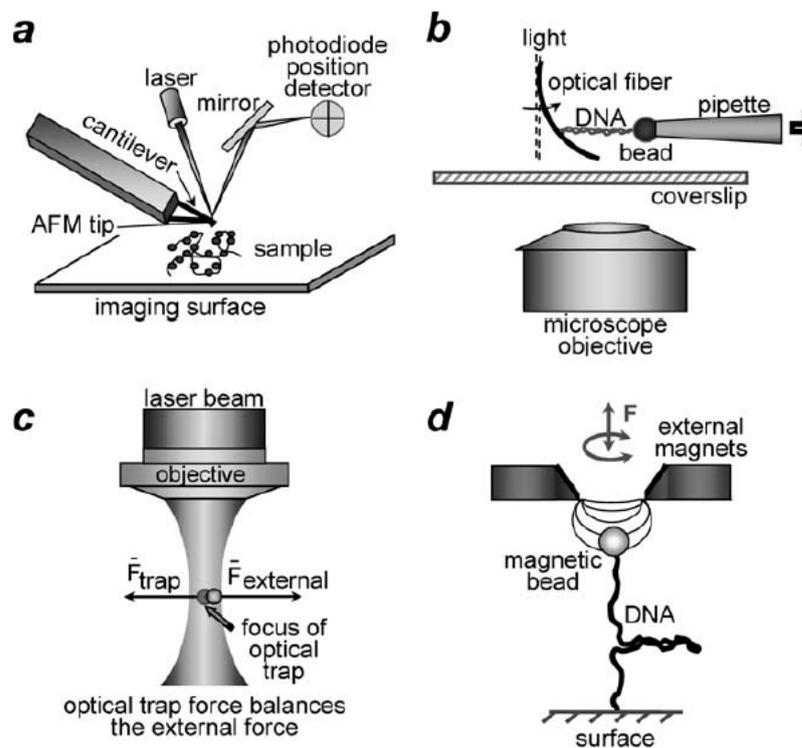


FIG. 1.21 – Quelques dispositifs utilisés en expérience de type molécule unique. Ils sont employés pour appliquer une force et/ou un couple à une seule molécule ou complexe moléculaire. *a* Microscope à force atomique *b* Dispositif à fibre, la détection est assurée par la déflexion d'une fibre optique. *c* Pince optique *d* Pince magnétique

Dispositifs d'étirement

AFM (Fig 1.21 (a)) Initialement conçu pour faire de l'imagerie de surface avec une résolution nanométrique, il s'applique aussi à la manipulation de molécule unique [120][119], grâce au développement de leviers très souples et de techniques de travail en milieu aqueux. L'ADN est attaché entre la pointe de l'AFM et la surface de verre ; on peut étirer la molécule mais pas la tourner. La force est estimée en mesurant la déflexion du levier avec un faisceau laser se réfléchissant dessus et aboutissant sur une diode photosensible. La résolution est de l'ordre du nm et les forces maximales appliquées peuvent facilement atteindre plusieurs nN. Comme pour les dispositifs à fibres, le bruit thermique important dû à la taille du levier limite la résolution en force à quelques pN.

Dispositif à fibre (Fig 1.21 (b)) L'ADN est attaché d'un côté à une fibre optique et de l'autre à une bille maintenue par une micro-pipette [38][89] qui peut être translaturée ou tournée pour appliquer un couple. La force exercée sur la molécule est mesurée en observant la déflexion de la fibre optique dont les caractéristiques mécaniques ont été préalablement établies. L'ordre de grandeur de la constante de raideur est de 10^{-5} N/m. La résolution spatiale est de 10 nm mais le bruit sur la force limite la résolution à quelques pN. Le couple n'est pas directement mesurable, sauf astuce expérimentale [29].

Dans le cas de la chromatine, l'affinité de celle-ci avec les surfaces (interactions non spécifiques) limite l'utilisation de l'AFM en tant que détecteur de force [177]. Il est essentiellement utilisé pour faire de la topographie de surface [85][179].

Pince optique

Historique (Fig 1.21 (c)) L'utilisation d'un gradient de champ électrique a permis de capturer et manipuler des atomes neutres ou des molécules dans le vide. Arthur Ashkin, aux Bell Laboratories, a étendue cette technique à la capture de particules diélectriques de taille micrométrique. Les premiers objets ainsi manipulés furent des micro-billes de plastique plongées dans l'eau [11][13]. Dans ce premier article, d'éventuelles applications en biologie, notamment la manipulation de cellule individuelle, étaient déjà envisagées. L'année suivante, A. Ashkin & A. Dziedzic réalisèrent la première expérience de manipulation d'un objet biologique : de simples bactéries dans leur tampon [12].

Les pinces optiques sont désormais devenues un instrument courant en biophysique ou matière molle : elles sont employées en tant que capteur de force, stimulateur mécanique, piège ou transporteur par exemple. Puisqu'il s'agit de notre outil de travail, nous avons un peu plus détaillé cette partie. Nous exposons ici le principe des pinces optiques. La géométrie de la configuration la plus générale des pinces optiques est décrite dans la figure 1.22

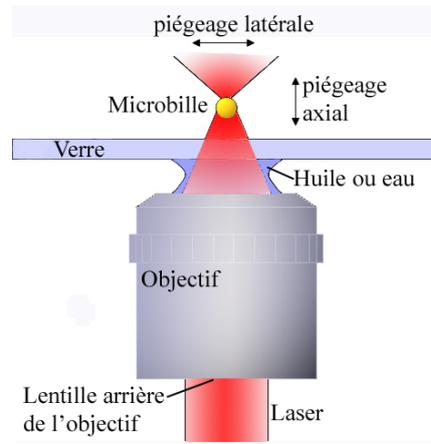


FIG. 1.22 – **Piégeage optique.** La configuration la plus fréquemment rencontrée met en œuvre un faisceau laser gaussien focalisé par un objectif à grande NA ($NA \geq 1.2$); le plus souvent un objectif à immersion huile ou eau. Au point focal, il est possible de piéger un objet diélectrique de dimension micrométrique.

Régime de Rayleigh Le régime de Rayleigh décrit le piégeage d'un objet de taille inférieure à la longueur d'onde du laser. Un objet diélectrique transparent plongée dans un champ électromagnétique se polarise et subit une force proportionnelle au gradient de E^2 ; en approximation linéaire, son dipôle électrique \vec{d} est proportionnelle au champ électrique \vec{E} : $\vec{d} = \alpha \vec{E}$; où α est la polarisabilité de l'objet. L'énergie de ce système est : $\epsilon = -\vec{d} \cdot \vec{E}$.

La force dérivée de cette énergie potentielle est :

$$\vec{F}_{gradient} = (\vec{d} \cdot \nabla) \vec{E} = \frac{\alpha}{2} \nabla(E^2). \quad (1.3.17)$$

Cette force tend à attirer l'objet vers les zones où le champ électrique est le plus grand, donc au point où est focalisé le faisceau laser.

Au contraire la force de pression de radiation pousse la micro-bille le long de l'axe optique et passer le point focal, a tendance à l'éjecter du piège. Cette force est due à la réflexion partielle du faisceau sur la bille. Elle est proportionnelle à l'intensité du faisceau laser donc à E^2 :

Ces deux forces, toutes deux quadratiques en E , sont en compétition. Pour améliorer la qualité du piège selon l'axe du faisceau, il faut accroître le gradient d'intensité donc diminuer la taille du foyer $w_0 = \frac{\lambda}{2n_0 \sin \theta}$ en augmentant l'ouverture numérique (NA) $n_0 \sin \theta$.

Régime de Mie Pour des objets de taille supérieure à la longueur d'onde λ employée, c'est la description de la lumière en terme de rayons lumineux qui est la plus

appropriée pour comprendre le piégeage. C'est dans ce régime que se déroulent nos expériences. Un transfert de quantité de mouvement entre les rayons lumineux et l'objet est à l'origine du confinement de ce dernier au niveau du point focal du faisceau laser focalisé, (Fig 1.23).

Considérons donc un rayon lumineux traversant notre objet, ici une sphère transparente. L'indice de réfraction de cette dernière étant plus grand que celui du milieu environnant (eau), le rayon est réfracté aux deux interfaces milieu-bille qu'il rencontre Fig 1.23. La quantité de mouvement de ce rayon varie donc à la traversée de la sphère :

$$\Delta\vec{p} = \hbar(\vec{k}_{avant} - \vec{k}_{après}). \quad (1.3.18)$$

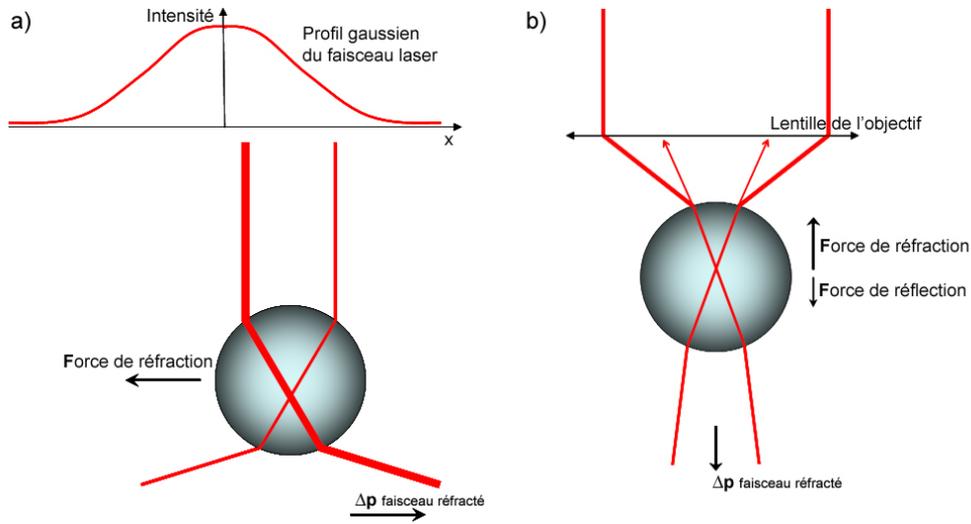


FIG. 1.23 – Régime de Mies, schéma du principe de piégeage 3D d'une bille diélectrique avec un faisceau laser focalisé. a), piégeage transversal dans le profil d'intensité gaussien du faisceau laser. b), piégeage axial, en focalisant le faisceau laser avec un objectif de grande ouverture numérique.

Par conservation de la quantité de mouvement, la différence est communiquée à la sphère (Fig 1.23). Le bilan de ces réfractions amène la bille vers le point où est focalisé le faisceau. La réflexion des rayons incidents à l'interface eau-bille, quant-à elle, est l'origine de la pression de radiation qui tend à faire avancer la bille le long de l'axe optique. Si la bille se trouve initialement en amont du foyer, alors elle finira par être piégée. En revanche si elle se trouve en aval, alors elle s'éloignera de la zone de piégeage.

À ce point, on peut intuitivement comprendre le rôle de l'ouverture numérique ; plus elle est importante, moins le transfert axial de quantité de mouvement entre lumière et bille est grand. Ce dernier est convertit en transfert latéral. Ainsi, la pression de radiation contre laquelle il faut lutter est diminuée et le piégeage devient possible.

Objectif à immersion huile Afin de créer un gradient d'intensité important selon l'axe optique, il est important d'avoir la plus grande ouverture possible. La plupart des premiers dispositifs utilisent des objectifs à immersion huile ($NA \sim 1.4$). Du fait de cette grande ouverture numérique, ces montages possèdent aussi une meilleure résolution de l'échantillon observé, $\sim 1.22 \lambda / (2 NA)$.

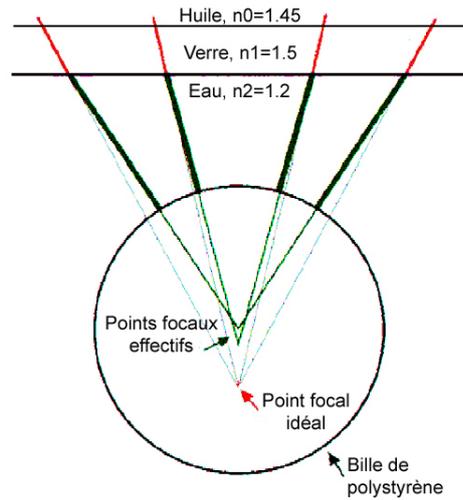


FIG. 1.24 – **Aberration du dioptre plan** Cette aberration se manifeste dans le cas d'un objectif à immersion huile utilisé pour focaliser un faisceau laser dans un milieu aqueux. La qualité de piégeage axial se dégrade avec la profondeur du piège. Ces problèmes n'apparaissent pas en utilisant un objectif à immersion eau à grande ouverture numérique ($NA \sim 1.2$).

Par contre, en raison d'une aberration du dioptre plan induite à la traversée de l'interface verre-eau, il est difficile d'employer ce type d'objectif en pince optique loin de la surface inférieure de la cellule d'expérimentation. Avec cette aberration, la qualité de piégeage selon l'axe du faisceau laser se détériore à mesure que l'on tente de piéger plus en profondeur dans la cellule (Fig 1.24) : plus on piège profond, moins le gradient du champ électrique est précis selon l'axe optique et plus le piège est faible, jusqu'à ne plus pouvoir contrer les forces de pression de radiation. Autrement dit, la constante de raideur du piège optique est fonction de hauteur de travail.

La chromatine est un polyélectrolyte très fragile. Pour éviter tous artefacts dus à l'adhésion non spécifique des fibres aux parois de verre de la chambre, nous avons décidé de travailler loin de celles-ci. Pour cela il faut être capable de générer un piège efficace dans la profondeur de la cellule expérimentale i.e. selon l'axe optique.

Contournements En fixant l'une des extrémité de la molécule sur le support de verre et l'autre sur la bille piégée à proximité de la surface, puis en translatant la surface disposée sur une platine piézo-électrique, nous pouvons déterminer les propriétés élastiques

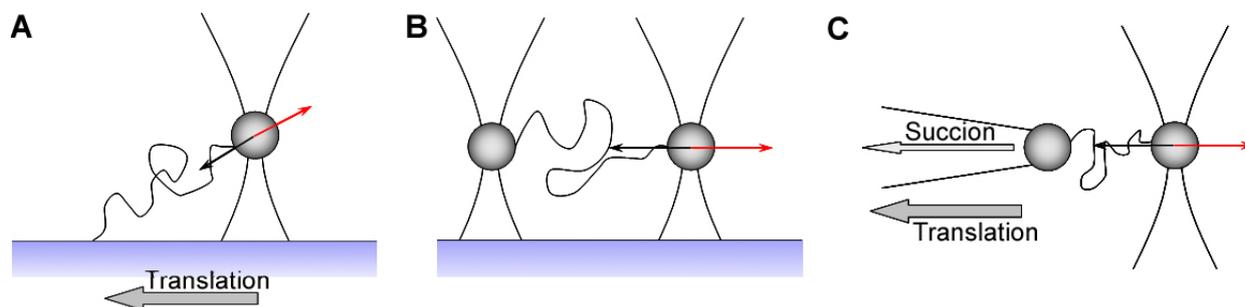


FIG. 1.25 – **Schémas de configurations expérimentales pour tirer sur des molécules filamenteuses** : ADN, complexe moléculaire, polymère du cytosquelette (actine [149], microtubule [143][32]). Flèches noires : force exercée par la molécule étirée sur la bille. Flèches rouges : force de rappel exercée par la pince optique sur la bille. **A** Configuration d'étirement près des surfaces avec un objectif à immersion huile : la molécule est accrochée d'une part sur la surface de verre et sur la bille à son autre extrémité. De multiples problèmes d'adhésion non spécifiques peuvent se poser entre la bille et la surface, ou entre la molécule et la surface. Inconvénient, cf texte 1.3.2 **B** Utilisation de deux pièges optiques. Ce dispositif contourne les problèmes d'adhésion aux parois, mais est plus coûteux (achat de deux sources laser) ou plus complexe (utilisation d'un modulateur acousto-optique et nécessité de calibrer les deux pièges). **C** Configuration que nous avons choisie, entre pince et micro-pipette.

d'une molécule comme l'ADN (Fig 1.25 **A**). Dans une telle configuration, la difficulté principale est de bien mesurer et bien corriger la force exercée sur la molécule, car elle n'est pas contenue dans un plan orthogonal à l'axe optique. Hors c'est dans un de ces plan que sont détectés les déplacements de la bille et non pas dans la troisième dimension, [157]. En outre l'adhésion non spécifique de la bille ou de la molécule sur les parois de la chambre peut empêcher de travailler sur des molécules trop courtes.

Pour contourner ces inconvénients de mesure et d'adhésion, il faut s'éloigner des parois de la cellule d'expérimentation. Comme nous l'avons mentionné, ceci n'est pas évident en utilisant un objectif à immersion huile (aberration du dioptré). La distance de travail entre le piège et la surface inférieure de la cellule d'expérimentation n'excède pas $10\ \mu\text{m}$. Mais il existe une alternative, sans avoir à trop s'éloigner des parois, tout en s'affranchissant des problèmes de projections de forces :

Deux pièges optiques sont créés à partir de deux faisceaux lasers différents ou à partir du même faisceau laser traversant un modulateur acousto-optique (Fig 1.25 **B**). L'un des deux pièges doit être beaucoup plus souple que l'autre, c'est celui là qui joue alors le rôle de sonde de position et donc de sonde de force, à condition que sa raideur soit comparable à celle de l'objet étudié.

Avec un seul objectif sans immersion d'ouverture numérique classique ($NA \sim 0.7$), il n'est pas possible de créer un piège optique, les forces de pression de radiation sont plus

importantes que les forces de gradient de champ électrique. Mais là encore il existe une alternative :

On utilise deux faisceaux laser contre-propagatifs de même puissance, afin que les forces de pression de radiation se compensent. Ainsi, même avec des objectifs sans immersion, de faible NA, le piégeage optique dans les trois dimensions est envisageable (Fig 1.26).

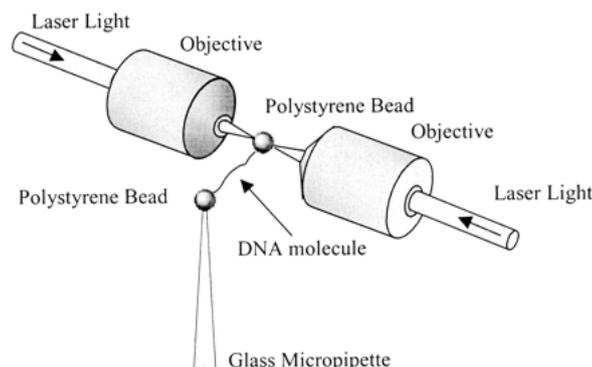


FIG. 1.26 – **Autre schéma de dispositif de pinces optiques.** *Il permet de contourner les problèmes dus à la pression de radiation et aux aberrations des objectifs à immersion huile. Ainsi, il est possible de travailler loin des parois de la chambre même avec des objectifs sans immersion d'ouverture numérique classique ($NA \sim 0.85$).* (Adapté de [42])

Nous avons choisis d'utiliser un objectif de grande NA à immersion eau ($NA = 1.2$) qui permet le piégeage tout comme avec les objectifs à immersion huile mais sans induire de problèmes avec la distance entre le piège et la surface de verre : nous pouvons piéger dans toute la profondeur de la cellule ($200\mu\text{m}$) sans altération des qualités du piège. Nous pouvons alors utiliser une micro-pipette asujettie à une platine piézo-électrique pour tirer sur les fibres de chromatine par exemple, le dispositif dans son ensemble restant relativement simple à mettre en œuvre (Fig 1.25 C).

Dispositifs pour la torsion

Un autre degré de liberté de ces molécules (ADN en particulier) est souvent invoqué dans les transformations qui les affectent : La rotation de la molécule filamenteuse autour de son axe. Avec le contrôle simultané de la torsion et de la tension, il est aussi possible de comprendre par exemple comment travaille une enzyme appartenant à la famille des topoisomérases sur son substrat qu'est l'ADN [33][75], comment cette enzyme dénoue les nœuds de l'ADN. Dans le contexte de la chromatine, nous pouvons envisager une étude en torsion sur les fibres de chromatine. En effet, nous pouvons imaginer que selon le sens dans lequel un couple est appliqué à la fibre, le nucléosome est stabilisé ou non. Dans ce but nous avons recensé les dispositifs existants permettant ce type d'expérience en

molécule unique et que nous désirions adapter à notre dispositif. C'est le principe de fonctionnement de quelques-uns de ces dispositifs que je décris dans ce qui suit.

Pince magnétique (Fig 1.21 (d)) En attachant une molécule d'ADN par une de ses extrémités à une surface de verre et l'autre extrémité à une bille magnétique, il est possible de tendre ou de tordre cette molécule avec un champ magnétique. Le plus souvent les billes utilisées dans ces expériences sont constituées d'un noyau super-paramagnétique (grains de ferrite orientés en tous sens), solubilisé en les enveloppant dans une coque en polymère qui permet aussi de greffer un ligand (anti-gène, digoxigénine, biotine) en vue de manipulations ultérieures.

Le champ est le plus souvent engendré par une paire d'aimants permanents avec une forte aimantation (alliage de type NeFeB) [139] ou par de petits électroaimants [62]. La force de tension est causée par le gradient de champ magnétique. Le contrôle de la torsion est assuré par la rotation du champ, sur lequel s'aligne le dipôle magnétique contenu dans la bille.

Dans ces expériences, ce n'est pas l'extension qui est imposée au système, mais la force. Du fait de la taille réduite de la zone de travail (quelques μm^3), le gradient de champ magnétique est considéré comme constant; la force exercée est donc elle aussi constante au cours d'une expérience. Il est néanmoins possible de faire varier la force appliquée entre deux expériences, en modifiant l'un des paramètres suivants :

- distance entre les aimants et l'échantillon ;
- courant traversant les électroaimants ;
- taille de la bille.

La résolution spatiale est de quelques nm et la gamme de force potentiellement mesurable s'échelonne de la dizaine de femtonewtons (10^{-14}N) à la centaine de piconewtons (10^{-10}N), [133][175]. La résolution temporelle est limitée à la vitesse d'acquisition de la caméra, soit ~ 50 Hz.

Autres solutions pour appliquer un couple Ces pinces magnétiques nécessitent de travailler près des surfaces (quelques μm) : une des extrémités de la molécule étant attachée à cette surface. Autre inconvénient, la fréquence de détection est limitée par la vitesse d'acquisition de la caméra qui enregistre les mouvements de la bille magnétique alors qu'avec une PSD comme détecteur de position, la fréquence d'acquisition atteint plusieurs kHz. Ceci nous permet de résoudre confortablement des processus individuels de rupture de nucléosomes.

D'autres méthodes ont été développées pour faire tourner des particules micrométriques de façon contrôlée. Le dispositif à fibre décrit auparavant (Fig 1.21 (b)), permet la rotation de la micro-pipette autour de son axe. Cette dernière, doit être la plus droite possible afin de minimiser la précession de l'extrémité [89]. C'est avec ce type de montage

que la transition B-S de l'ADN a été étudiée en détail, à la fois en fonction de la force de traction mais aussi du couple [90] [29], (cf 3.1.2).

Même avec des pièges optiques il est envisageable d'appliquer un couple en jouant sur les propriétés du faisceau laser ou sur la géométrie et la composition des particules piégées. Ainsi Paterson & al. créent avec un faisceau de type Laguerre-Gaussien (LG), un front de phase hélicoïdal [112] : le front de phase hélicoïdal du faisceau LG est converti en variation d'intensité dans l'espace par interférence avec une onde plane. Il est alors possible de faire tourner des objets asymétriques piégés par un tel faisceau. La vitesse de rotation est contrôlée en changeant le mode du faisceau Laguerre-Gaussien. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle ne permet pas d'appliquer un couple constant dans une position arrêtée.

Une autre solution optique pour appliquer un couple consiste à utiliser des cristaux biréfringents dont la susceptibilité électrique n'est pas isotrope (Fig 1.27) [59][79]. C'est le pendant électrique de la technique des pinces magnétiques, (Fig 1.27) : le cristal s'aligne sur le champ électrique \mathbf{E} du faisceau laser qu'on fait tourner avec un polariseur. Avec cette technique il est aussi envisageable de mesurer directement le couple appliqué à une molécule attachée entre le support et le cristal. Pour cela il suffit d'utiliser un cristal de forme non sphérique ou un cristal présentant une impuretés repérable.

Cette configuration ne convient pas si nous désirons l'adapter à notre dispositif pour l'étude de la stabilité du nucléosome en fonction de la torsion. En effet, le plan de rotation est perpendiculaire à l'axe de propagation du faisceau (Fig 1.27 B). Or nous avons besoin d'un plan de rotation contenant l'axe optique.

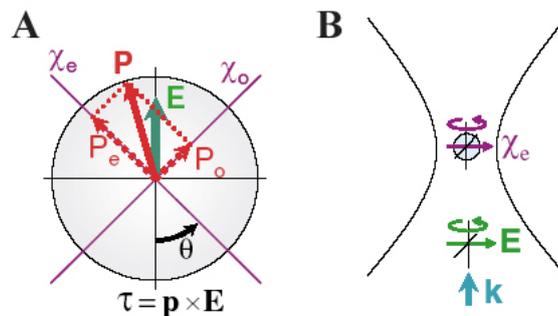


FIG. 1.27 – Schéma du principe de rotation d'une particule de calcite avec un faisceau laser polarisé. **A**, un couple τ est engendré lorsque le vecteur polarisation \mathbf{P} résultant et le champ électrique \mathbf{E} ne sont pas alignés. **B**, alignement de la particule piégée avec le champ électrique \mathbf{E} et rotation de cette dernière avec \mathbf{E} tournant avec un polariseur. Adapté de [79]

1.3.3 Comportement élastique de l'ADN : modèles

Sous la forme B et en solution physiologique, l'ADN est un polymère semi-flexible. Sa longueur de persistance L_p est de 50 nm, à comparer au 0.34 nm occupé par un monomère (paire de base). Du fait de cette rigidité, les modèles qui le décrivent en solution (modèle WLC ou FJC, voir ci-dessous) n'ont pas besoin d'incorporer de terme de volume exclus, tant que sa longueur est $\leq 10 \times L_p$.

A contrario, l'ADN simple brin, même si il est ponctuellement structuré, est beaucoup plus flexible : $L_p \sim 0.7$ nm, est de l'ordre de la taille d'un monomère. Comme il est aussi chargé, l'ADN simple brin se comporte en solution comme un polyélectrolyte qui se voit lui même [46] (quand $L_D \leq L_p$).

Aspects théoriques

Rôle de l'entropie : le modèle de la "chaîne librement jointe" Le modèle de la chaîne librement jointe, ou encore Freely Jointed Chain model. Ce modèle est le plus simple pour décrire le comportement d'un polymère idéal en solution. Sans énergie interne, donc dominé par l'entropie, il décrit bien à faible force et sous certaines conditions le comportement sous tension de l'ADN simple brin [132]. C'est l'analogue de la description du paramagnétisme dans le cadre du modèle de Langevin.

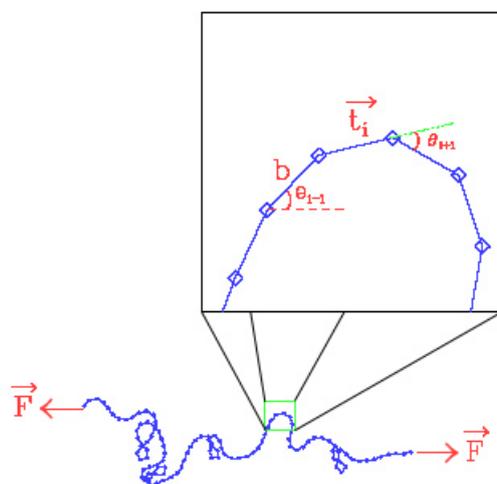


FIG. 1.28 – **Modèle de polymère sous tension.** En l'absence de tension, on peut supposer des corrélations d'orientation entre deux segments consécutifs \vec{t}_i et \vec{t}_{i+1} (modèle de Kratky-Porod), ou non (modèle FJC) $\langle \theta_i \theta_{i+1} \rangle = 0$.

Le polymère est modélisé par un enchaînement de segments rigides de longueur identique b . L'orientation du $i^{\text{ème}}$ segment est repérée par le vecteur unitaire \vec{t}_i . En l'absence

de tension appliquée, on suppose qu'il n'y a aucune corrélation d'orientation entre deux segments consécutifs (Fig 1.28).

Considérons une chaîne composée de N segments, de longueur $L = Nb$ et notons \mathbf{R} le vecteur entre les deux extrémités de la chaîne; l'extension moyenne de la chaîne correspond au chemin moyen parcouru au cours d'une marche aléatoire :

$$\langle \mathbf{R}^2 \rangle = Nb^2. \quad (1.3.19)$$

La rigidité d'un polymère peut être décrite par la longueur de Kuhn L_k qui vaut ici :

$$L_k = \frac{\langle \mathbf{R}^2 \rangle}{L} \stackrel{\text{modèle FJC}}{=} b \quad (1.3.20)$$

L'application d'une force aux extrémités de cette chaîne tend à aligner les \mathbf{t}_i . C'est l'analogie à l'application d'un champ magnétique qui tend à aligner des moments magnétiques. Ainsi, la relation force-extension est déductible immédiatement de la relation champ magnétique-moments magnétiques déjà établie par Langevin dans un système paramagnétique modèle :

$$\varsigma = \frac{\langle l \rangle}{L} = \coth\left(\frac{Fb}{k_B T}\right) - \frac{Fb}{k_B T}, \quad (1.3.21)$$

Où $\langle l \rangle$ est l'extension moyenne calculée avec la fonction de partition et ς est l'extension relative.

Pour de faibles forces, $\varsigma \simeq Fb/3k_B T$; pour de grandes forces, $\varsigma \simeq 1 - k_B T/Fb$. Ce modèle souligne le rôle de l'entropie. Il est cependant trop simple pour décrire le comportement de l'ADN sous tension : notamment, la divergence en $1/F$ à haute force n'est pas observée expérimentalement.

Le modèle qui décrit ainsi la molécule d'ADN n'est pas le modèle FJC mais le modèle du ver (ou selon l'acronyme anglais : Worm Like Chain model) que nous explicitons ci-après.

Modèle de Kratky-Porod La molécule d'ADN n'est pas le polymère totalement flexible décrit dans le modèle FJC. Comme d'autres polymères d'origine biologique : actine, microtubule, c'est un polymère semi-flexible. La rigidité de ces polymères puise son origine dans leur structure interne : il faut tenir compte de l'énergie d'empilement entre les bases successives ainsi que celle d'appariement entre bases appariées. Cette énergie d'empilement réduit la flexibilité de la molécule d'ADN. Il existe des corrélations d'orientation entre les paires de base successives et il faut alors prendre $L_p > b$ (3.4 Å). La description magnétique analogue est celle d'une chaîne à une dimension de spins couplés entre eux.

L'énergie de la chaîne libre est la somme des énergies de couplages entre chaque paire de segments consécutifs, dans la configuration adoptée :

$$E_{KP} = -\frac{B}{b} \sum_{i=1}^{N-1} \mathbf{t}_i \mathbf{t}_{i+1} = -\frac{B}{b} \sum_{i=1}^{N-1} \cos(\theta_i), \quad (1.3.22)$$

où B est la constante de couplage imposant la rigidité de la molécule, ou module de courbure, et θ_i l'angle entre le segment i et le segment $i+1$ (Fig 1.28). Les corrélations d'orientation décroissent exponentiellement :

$$\langle \mathbf{t}_i \mathbf{t}_j \rangle \propto e^{-b \frac{|i-j|}{L_p}}, \quad (1.3.23)$$

et on en tire :

$$\langle \mathbf{R}^2 \rangle = b \left(\sum_i \mathbf{t}_i \right)^2. \quad (1.3.24)$$

Si $L \gg L_p$

$$\langle \mathbf{R}^2 \rangle \simeq 2L_p L. \quad (1.3.25)$$

Dans ce modèle, on a $L_k = 2L_p$.

Une force appliquée aux extrémités de cette chaîne tend à aligner chaque segment. L'énergie de cette chaîne inclut alors une contribution, $b \sum_i \mathbf{F} \mathbf{t}_i$, due au travail de cette force :

$$E_{KP_{tension}} = -\frac{B}{b} \sum_{i=1}^{N-1} \cos(\theta_i) - Fb \sum_{i=1}^N \cos(\varphi_i); \quad (1.3.26)$$

où φ_i est l'angle entre la force et \mathbf{t}_i . A partir de cet hamiltonien, il n'est malheureusement possible de dériver une expression analytique entre la force et l'extension de la molécule que dans un régime de faibles forces.

Modèle du ver Le modèle du ver (Worm Like Chain model) est la limite continue du modèle de Kratky-Porod, obtenu en faisant tendre b vers zéro. Ce modèle est bien adapté au cas de polymère peu flexible. Un analogue magnétique à ce modèle est moins simple que pour les deux précédents modèles : c'est la phase géométrique d'un système de spins

1/2 [125]. Notons s l'abscisse curviligne et $\mathbf{t}(s)$ le vecteur tangent. L'énergie de la chaîne soumise à une force s'écrit alors :

$$E_{WLC} = \underbrace{\frac{B}{2} \int_0^L ds \left| \frac{d\mathbf{t}(s)}{ds} \right|^2}_{\text{énergie élastique}} - \underbrace{F \int_0^L ds \cos(\theta(s))}_{\text{énergie d'étirement}}; \quad (1.3.27)$$

où $\cos(\theta(s))$ est l'angle entre \mathbf{F} et $\mathbf{t}(s)$. Comme pour le modèle de Kratky-Porod dont il est issu, il n'existe aucune relation analytique entre force, F et extension x . En interpolant les comportements asymptotiques à basse et haute force, Marko et Siggia ont proposé une formule analytique approchée pour décrire la courbe force-extension du modèle WLC :

$$F \simeq \frac{k_B T}{L_p} \left\{ \frac{1}{4(1-x/L)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L} \right\} \quad (1.3.28)$$

Par construction, l'ajustement de 1.3.28 avec les données expérimentales est bon aux basses forces ($F \leq 1\text{pN}$) et aux forces les plus importantes $F \geq 15\text{pN}$, lorsque soit l'entropie, soit l'enthalpie dominant. Dans le régime intermédiaire, $x/L \sim 0.5$, les ajustements ne sont plus si bons, l'erreur par rapport aux expériences est de 10%. Cela reste tout de même meilleur que les précédents modèles.

Plusieurs corrections ont été suggérées. Wang & al. (inspiré par un modèle plus ancien de Odjik [110]) ont incorporé un terme tenant compte de l'énergie d'étirement :

$$F = \frac{k_B T}{L_p} \left\{ \frac{1}{4(1-l)^2} - \frac{1}{4} + l \right\}; \quad (1.3.29)$$

où $l = \frac{x}{L} - \frac{F}{S}$ avec S , le module d'étirement.

Le modèle à une solution numérique exacte. Bouchiat & al. ont proposé de l'ajuster par un développement polynômial jusqu'à l'ordre 7 [25] :

$$F = \frac{k_B T}{L_p} \left\{ \frac{1}{4(1-l)^2} - \frac{1}{4} + l + \sum_{i=2}^{i \leq 7} a_i l^i \right\}; \quad (1.3.30)$$

avec les valeurs suivantes pour les a_i : $a_2 = -0.5164228$, $a_3 = -2.737418$, $a_4 = 16.7497$, $a_5 = -38.87607$, $a_6 = 39.49944$, $a_7 = -14.17718$. Cette solution (1.3.30) est plus proche que (1.3.29) de la solution numérique et de l'expérience.

Cette relation force-extension dérivée du modèle WLC nous est utile pour juger, sur nos courbes expérimentales, si nous avons bien une seule molécule d'ADN accrochée entre nos deux billes.

Au delà de 60 pN, la transition B-S

Il n'est naturellement pas possible d'augmenter indéfiniment la force sans que la molécule ne se casse. Toutefois avant cette triste fin, la molécule double brin d'ADN affiche un comportement singulier. Allonger la molécule d'ADN requiert d'autant plus d'énergie que l'extension est proche de la longueur curvilinéaire. En 1996, deux équipes Cluzel & al. [38] et Bustamante & al. [132] ont mentionné un comportement étonnant : lorsque l'extension dépasse cette longueur curvilinéaire, brusquement, pour une force d'environ 60 pN, la molécule s'étire de 70% par rapport à sa forme classique ADN-B. Cela ressemble à une transition entre une forme B classique et une forme étirée S (Stretched DNA) de l'ADN.

1.3.4 Comportement en torsion

Une molécule d'ADN développe aussi des comportements inattendus lorsqu'elle est contrainte en torsion. Cette torsion peut se révéler fondamentale pour la chromatine sur laquelle plusieurs protéines (comme l'ARN polymérase) sont capables d'appliquer un couple. En s'insérant entre les deux brins d'ADN et en progressant le long de la molécule d'ADN, l'ARN polymérase produit un sur-enroulement en amont du site de réplication ; C'est un autre type de protéine, une topoisomérase, qui est chargée de relaxer cette contrainte. Ce simple phénomène pourrait déstabiliser le nucléosome en s'ajoutant à l'intervention d'autres facteurs de remodelage, et faciliterait la transcription de l'ADN nucléosomal. Récemment l'importance des propriétés mécaniques de l'ADN lors de son interaction avec des protéines a encore été soulignée dans [75] et [17].

1.4 Etirement d'une fibre de chromatine

Avant de présenter brièvement l'état de l'art des expériences d'étirement sur la chromatine, nous rappellerons les quelques techniques de reconstitution de la chromatine. Le terme "chromatine" désigne un complexe presque propre à chaque expérience, selon la manière adoptée pour la reconstituer ou la configuration expérimentale. Néanmoins des caractères communs dans la réponse élastique se dégagent nettement (chapitre 5). Dans ce type d'expérience, le terme de chromatine désigne en réalité un large panel de substrats, d'associations plus ou moins artificielles entre l'ADN et les histones. L'originalité de nos expériences réside d'ailleurs en partie dans le fait que nous avons travaillé avec la plupart de ces chromatines, acquérant ainsi une bonne connaissance des propriétés de chacune et des écueils à éviter lors de l'interprétation.

1.4.1 Divers types de chromatine étudiés

Chromatine native *A priori* les expériences d'élasticité les plus complètes sont celles effectuées sur la chromatine native, chromatine assemblée *in-vivo*, par la cellule. Il existe des protocoles pour l'isoler et ce pour bon nombre de types cellulaires différents. Cependant ces derniers sont adaptés à des expériences de nature purement biologiques, ou à la visualisation avec des outils comme le microscope électronique ou l'AFM.

Pour des expériences de biophysique, et qui plus est pour arriver enfin à étirer une seule, véritable, fibre de chromatine, les obstacles à franchir sont encore nombreux. D'abord, la longueur des fragments doit être contrôlée, ceux-ci sont bien plus longs que ceux consacrés aux expériences de biologie plus classiques. Ensuite, l'étape de marquage des extrémités de ces fragments par des anti-corps est une difficulté supplémentaire. Enfin, l'arrimage sur des billes pose encore parfois problème. En effet, la chromatine est un objet très "collant" qui doit être manipulé dans des conditions précises de salinité et de pH. C'est pour ces raisons que bon nombre d'expériences de biophysique se sont tournés vers des échantillons de chromatine reconstituée mieux définie et donc, dont l'information est plus facile à extraire.

Chromatine reconstituée Il existe trois grandes catégories de chromatine reconstituée : la chromatine reconstituée à partir d'extraits d'œufs d'amphibien ou d'embryon de drosophile, la chromatine reconstituée sur une séquence répétée positionnant les nucléosomes par dialyse, ou la chromatine reconstituée à l'aide de protéines chaperons des histones de cœur. Pour chaque type, les protocoles de reconstitution peuvent différer ; un bon résumé des méthodes existantes est fait dans [152] et [98].

Avec extrait d'œufs de *Xenopus Laevis* Pour constituer des fibres de chromatine, il suffit de mélanger l'ADN et l'extrait. *Xenopus Laevis* est un amphibien originaire d'Afrique du sud. Ses œufs, relativement gros (1.2 mm de diamètre en moyenne), possèdent la particularité de pouvoir donner naissance à plus de quatre mille cellules filles sans apport extérieur. Cela signifie qu'ils sont très riches en protéines, nucléotides, et autres facteurs de transcription en tout genre. C'est un matériel très recherché par les biologistes : les grenouilles sont alors élevées en captivité et il est possible de provoquer la ponte de ces œufs pour en disposer toute l'année.

L'extrait ne contient pas d'ADN, mais toute la machinerie utile pour constituer de la chromatine à partir d'un substrat d'ADN. Ainsi, l'extrait est aussi employé entre autre pour constituer des chromosomes métaphasiques à partir de noyaux de sperme de *Xenopus Laevis*.

D'autre part, cette technique de reconstitution d'une fibre de chromatine a déjà été employée pour étudier la cinétique de formation de la chromatine par fluorescence et avec flux hydrodynamique [155][80]. Le nombre de nucléosomes formés ne peut être qu'estimé

à partir de la longueur de l'ADN fixée et de la longueur moyenne d'ADN contenue dans la structure du nucléosome.

Ces fibres de chromatine ne contiennent pas de véritable histone de liaison (absentes de l'extrait) ; Mais elles sont formées avec une protéine B4 supposée jouer un rôle similaire à l'histone de liaison. On pense aussi que des protéines comme les HMG protéines peuvent venir se fixer entre les deux brins d'ADN à la sortie de la NCP, comme l'histone de liaison.

Avec des protéines chaperons d'histones de cœur Pour travailler sur un système mieux défini, on peut limiter le nombre d'intervenants dans la phase de reconstitution. Une possibilité serait de n'utiliser que l'ADN et les histones, mais comme nous le verrons par la suite, il ne suffit naturellement pas de mélanger ceux-ci dans les conditions physiologiques pour qu'apparaissent immédiatement une structure ordonnée en "collier de perles". Créer une structure si définie nécessite une dépense d'énergie : Les chaperons d'histones comme Nap-1, N1+nucléoplasmine, permettent de former une fibre de 10 nm dans laquelle les nucléosomes sont disposés aléatoirement, de façon désordonnée. Il est possible d'espacer régulièrement les nucléosomes en ajoutant des facteurs de remodelage de la chromatine (ACF) qui, eux, sont ATP-dépendants.

Sur une séquence répétée d'ADN positionnant le nucléosome Enfin, il est aussi envisageable de reconstituer une fibre de chromatine régulière sans avoir recours aux chaperons d'histones. Il suffit d'utiliser des séquences d'ADN pour lesquelles l'octamère d'histones a une grande affinité.

Des séquences d'ADN possèdent une courbure spontanée (énergie d'interaction entre paire de bases successives), qui diminue l'énergie de courbure contre laquelle il faut lutter pour pouvoir enrouler l'ADN autour de l'octamère d'histones. Le nucléosome se constitue préférentiellement sur ce type de séquence. Il faudrait ensuite prendre aussi en compte le pas de l'hélice un peu distordu pour que l'ADN s'ajuste le mieux possible avec les sites de liaisons de l'octamère [96][118].

Une séquence répétée de 5S ADN-r ("r" pour ribosomal) issue d'oursins [131] permet ainsi de constituer par dialyse des fibres ordonnées [35][26][27]. Une autre séquence, la séquence 601, plus récemment isolée [160], possède une plus grande affinité encore vis à vis de l'octamère d'histones.

Que ce soit à l'aide de chaperons d'histones de cœur ou à l'aide d'une séquence particulière d'ADN, les fibres de chromatine ainsi reconstituées n'ont pas d'histone de liaison. Il est très difficile de reconstituer une fibre avec cette histone car c'est un macro-cation, donc il s'associe avec l'ADN de manière non spécifique. Mais une récente étude de microscopie électronique a relevé le challenge en utilisant l'histone de liaison H5 qui a une plus grande affinité pour la NCP [69].

1.4.2 Etirements sur les substrats chromatinien

La rigidité des fibres de chromatine, l'énergie avec laquelle l'ADN est enroulé autour des nucléosomes, les variations de cette énergie avec les modifications chimiques des histones, sont des quantités physiques mesurables. Elles nous renseignent sur la structure à grande échelle du chromosome, sur sa dynamique ou sa régulation à une échelle plus petite. Les expériences d'étirements de la chromatine sont de bons outils pour explorer ces paramètres et nous rapportons succinctement dans ce qui suit la majeure partie des études d'extension de la chromatine menées jusqu'alors. Il s'agit juste de donner au lecteur une idée des performances de ces techniques et des connaissances acquises grâce à celles-ci ces dernières années.

Le chromosome mitotique

Les premières expériences d'étirement de la chromatine ont été réalisées sur des chromosomes entiers de Salamandre ou de *Xenopus Laevis* [68]. Ces études réalisées sur une chromatine fortement condensée, impliquant d'autres protéines que les histones, ont sondé l'organisation du chromosome métaphasique, (Fig 1.29).

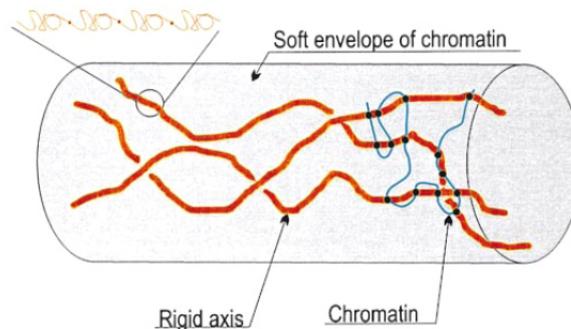


FIG. 1.29 – **Schéma d'un chromosome mitotique.** Le chromosome est constitué par quelques axes semi-rigides enveloppés dans une gangue de chromatine. La chromatine est attachée à ces axes. Ce modèle a été proposé par Houchmandzadeh et Dimitrov [67] pour expliquer leurs résultats de mesures de module d'Young et de module de flexion sur des chromosomes mitotiques de *Xenopus Laevis*. S. Almagro a étudié les composants de ce squelette semi-rigide, composé d'ADN et de protéines structurantes SMC (Structurale Maintenance of the Chromosome) [5]. Adapté de [67]

A une échelle inférieure, il est envisageable d'utiliser des techniques similaires. Cependant, la chromatine reste complexe et délicate à manipuler. Ainsi les fibres se collent de façon non spécifiques aux parois de verre [177], en particulier dans les expériences avec AFM [86][179].

Les pinces optiques permettent de s'éloigner des parois. Elles ont permis des expériences sur trois types de chromatine différentes : native [173], reconstituée avec un extrait

d'œufs de *Xenopus Laevis* [21] [115], et reconstituée sur une séquence particulière, répétée, d'ADN [27] [26].

Sur des fibres de 10 et 30 nm.

Sur la fibre de chromatine de 10 ou 30 nm, deux grandes classes d'expériences de type molécule unique ont jusqu'alors été réalisées : expériences avec une des extrémités de la fibre libre et expériences d'étirements, d'élasticité. Dans ce premier type d'expérience, la fibre a été reconstituée à partir d'extraits [80] ou avec seulement les histones et un de leurs chaperons, NAP-1 [84][155]. Ces études montrent entre autre que la vitesse de reconstitution dépend de la force exercée (respectivement par flux hydrodynamique et traction magnétique) sur la fibre en formation : cela renseigne sur la dynamique d'assemblage du nucléosome [80][155]. Au-delà d'une tension de 10 pN, la chromatine ne s'assemble plus. Les temps caractéristique d'assemblage de la fibre de chromatine [80], quelques dizaines de secondes, est beaucoup plus court que celui déjà trouvé dans des expériences en volume de biologie moléculaire [136][43], de l'ordre de l'heure. Nous discuterons de cette différence à la section 5.1.1.

Des expériences plus directes d'étirement de la fibre déjà (re)constituée ont aussi été élaborées : Sur la fibre de chromatine native tout d'abord [42], sur la fibre reconstituée à partir d'œufs de *Xenopus Laevis* [21][115] et sur la fibre reconstituée sur une séquence répétée de 5S ADN-r [27][26]. D'autres expériences d'étirements et d'imagerie sur les fibres de chromatine ont été élaborées [86] mais des artefacts dus à l'adhésion des fibres sur la surface furent rencontrés [178].

Tout d'abord, les premières courbes force-extension ont été réalisées sur des fibres de chromatine native (issues de noyaux d'érythrocytes de poulet). Elles présentent un plateau autour de 5 pN, pour des concentrations saline comprises entre 40 et 150 mM [42]. Ce plateau a été interprété comme la signature d'une interaction entre nucléosomes. De plus, le caractère irréversible des étirements au-delà de 20 pN est une signature (indirecte) de la rupture individuelle de nucléosomes.

Ensuite, sur la chromatine reconstituée à partir d'extraits d'œufs de *Xenopus Laevis*, Bennink & al. ont obtenus des courbes force-extension en dents de scie (Fig 1.30). Chaque dent est interprétée comme la signature de la rupture individuelle d'un nucléosomes ou plusieurs. Lorsqu'un nucléosome est se dissocie, l'ADN correspondant se libère. La Fig (1.30) détermine une longueur Δx dominante de 65 nm, longueur difficile à concilier avec les connaissances de la structure du nucléosome. Sur ce même type de chromatine, les auteurs ont récemment mis en évidence deux populations d'ADN libéré : Autour de 30 et de 59 nm [115]. Ces longueurs sont interprétées comme la libération d'ADN associé à des nucléosomes plus ou moins complets. La force correspondante qui dépend de la vitesse de l'étirement, se situe entre 20 et 40 pN environ.

Enfin, des fibres de chromatine reconstituées sur une séquence répétées (17 \times) de 5S ADN-r présentent aussi ce profil en dents de scie [27]. La gammes de forces est comparable

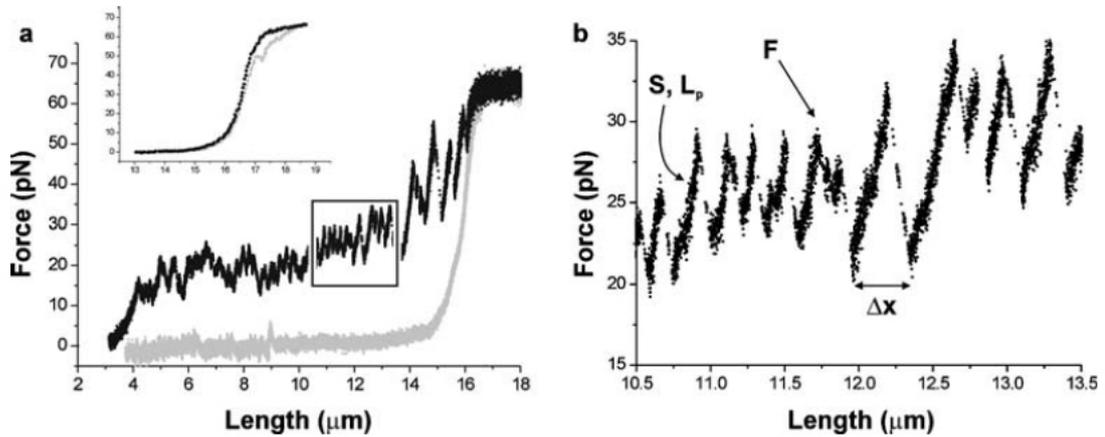


FIG. 1.30 – Courbe d'étirement, force-extension d'une fibre de chromatine. *la fibre a été reconstituée à partir d'extrait d'œufs de Xenopus Laevis. a Profil complet (noir extension, gris relaxation) et comparaison avec celui d'une molécule d'ADN de même longueur (insert). b Détail montrant la possibilité de mesurer la longueur libérée Δx , lors de la rupture d'un ou plusieurs nucléosomes. Image tirée de [21].*

à celle obtenue par Bennink & al., même si ces chromatines sont très différentes. Les longueurs d'ADN relâchées, plus courtes, ont une distribution centrée autour de 25 nm. Plus récemment [26], cette équipe semble avoir réussi à dégager une influence de l'acétylation des histones et de leur extrémités N-terminale dans la stabilisation de la NCP.

Très récemment [61], l'étirement de fibres de chromatine reconstituées sur un ADN de séquence aléatoire avec NAP-1 et ACF (facteur de remodelage) trouve une distribution en force plus étalée et un Δx aussi de 25 nm.

Chapitre 2

Matériels et méthodes

Nous allons ici décrire notre dispositif expérimental et expliquer nos choix concernant la partie optique et la réalisation de la chambre d'expérience, schéma Fig. 2.1 . Puis nous indiquerons les méthodes de calibrations que nous avons utilisées. Nous détaillerons ensuite la modification que nous avons apportée à la configuration de base, afin de pouvoir appliquer un couple aux molécules d'ADN, et à plus long terme, aux fibres de chromatine. Enfin nous présenterons les préparations biochimiques des billes, de l'ADN et des différentes fibres de chromatine, réalisées en majeure partie au laboratoire.

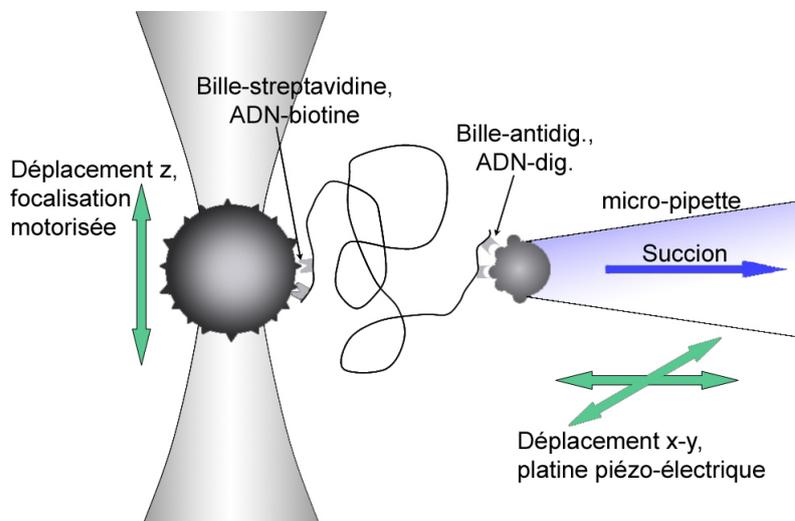


FIG. 2.1 – Schéma d'une expérience : l'ADN, marqué à ses extrémités par biotine et digoxigénine, est accroché entre deux billes. La première est maintenue par succion à l'embouchure de la micro-pipette, l'autre se trouve dans le piège optique. Celui-ci est fixe, et c'est la micro-pipette solidaire du support qui est translatée de façon contrôlée en utilisant une platine piézo-électrique XY.

2.1 Dispositif expérimental

Dans cette partie nous nous attachons à décrire la pince optique en détail et nous expliquerons nos choix sur l'objectif employé ou les billes utilisées.

2.1.1 Piège optique

Le laser que nous utilisons pour réaliser le piège optique (Fig 2.2) est de type Nd :YAG (Spectra-Physics), de longueur d'onde 1064 nm et 2.5 W de puissance continue en sortie. Nous utilisons un laser infra-rouge parce que le matériel biologique absorbe peu dans cette longueur d'onde. Nous limitons ainsi l'échauffement de l'échantillon et nous ne le détériorons pas.

Le laser Nd :YAG étant invisible à l'oeil nu, il est nécessaire d'utiliser un autre laser, dans le visible cette fois, pour l'aligner jusqu'à l'objectif. Par l'intermédiaire d'un miroir dichroïque et à l'aide d'une carte recouverte de cristaux photosensibles (ré-émettant dans le rouge lorsqu'ils sont éclairés par l'infra-rouge), nous alignons les deux lasers (YAG et He-Ne) sur une cible, située à environ 4 m de la sortie du laser YAG. Nous intercalons un miroir à 45 ° pour le diriger vers un télescope constitué de deux lentilles de focales 5 et 25 cm. En sortie de télescope, le faisceau est étendu à un diamètre d'environ 8 mm pour couvrir l'ouverture arrière de l'objectif (Fig 2.3) : cela permet d'avoir une NA maximum, et donc un piège optique d'autant plus rigide à puissance donnée (Fig (2.3), cf 1.3.2).

A la sortie de ce télescope, le faisceau est dirigé jusqu'à l'ouverture arrière de l'objectif avec un jeu de deux miroirs et un miroir dichroïque. La plupart des réglages fins concernant la position du piège optique dans la cellule d'expérimentation se font en jouant sur l'inclinaison de l'un de ces miroirs avec des vis micrométriques.

Le même miroir dichroïque sert, selon l'incidence contraire, à laisser passer la lumière visible de la lampe du microscope qui illumine notre cellule d'expérimentation, (Fig 2.2). Pour introduire ce miroir dichroïque sous le carrousel des objectifs, nous avons enlevé l'option DIC du microscope. Par contre nous conservons toujours libre l'ouverture arrière pour illuminer l'échantillon avec une lampe à arc pour l'utilisation de la fluorescence.

L'alignement parfait du faisceau avec l'axe optique est important. En effet si le piège n'est pas complètement symétrique, suite à un mauvais alignement du faisceau, cela conduit à sur- ou sous-évaluer la constante de raideur du piège, et donc à sur- ou sous-évaluer les force (Fig 2.4). Le faisceau élargi est focalisé grâce à l'objectif, dans la cellule expérimentale.

Nous enregistrons des pertes d'intensité le long du trajet optique (Fig 2.5). Ces pertes sont essentiellement des pertes par réflexion, et elles sont encore accrues à la traversée de l'objectif dont la transmission n'est pas optimale pour cette gamme de longueur d'onde. Elles sont proportionnelles à la puissance en sortie de laser, donc nous n'avons pas de corrections supplémentaires à faire lorsque nous établissons la relation entre constante de raideur du piège et puissance affichée du laser lors de la phase de calibration.

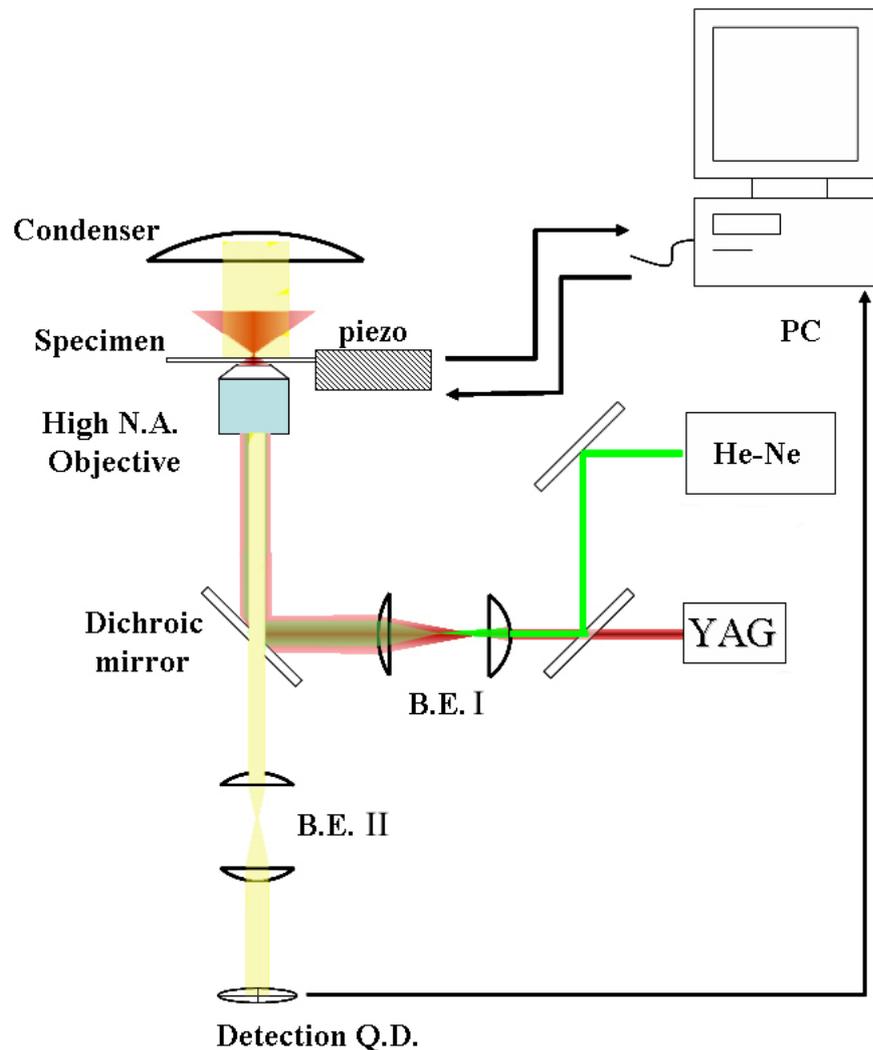


FIG. 2.2 – Configuration de base de notre dispositif expérimental. Le piège optique est obtenu en focalisant un faisceau laser de type Nd :YAG, $\lambda = 1064 \text{ nm}$ (Spectra Physics) avec un objectif à immersion eau de grande ouverture numérique ($N.A. = 1.2$) dans une cellule d'expérimentation profonde de $200 \mu\text{m}$ environ. Le faisceau est préalablement élargi avec un télescope (BE I, "beam expander") pour couvrir la lentille arrière de l'objectif. La détection de position est réalisée en projetant l'image de la microbille piégée sur une diode photo-sensible quatre-quadrants Hamamatsu S4349 (QD, "quadrant diode"). Nous utilisons un télescope (B.E. II) pour adapter la taille de l'image de la bille par rapport à la surface de la QD, adaptant ainsi la sensibilité. Le piège peut être translaté par pas de 250 nm selon l'axe de propagation du faisceau laser (OZ) par l'intermédiaire d'un moteur pas à pas, piloté depuis l'ordinateur. Dans le plan (OXY), le piège est fixe et c'est l'échantillon qui est mobile. Nous mesurons les déplacements de la bille piégée dans le plan perpendiculaire à l'axe optique (OXY). Une platine motorisée pour les déplacements grossiers supporte une platine piézoélectrique/porte-échantillon pour les déplacements plus fins (résolution au nm avec un bruit d'amplitude 5 nm .)

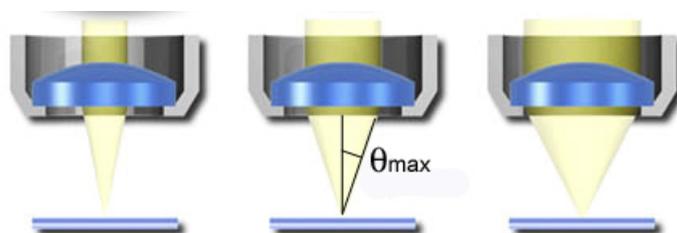


FIG. 2.3 – **Ouverture numérique.** En couvrant la lentille arrière de l'objectif, on accroît l'ouverture numérique; $NA = n \sin(\theta_{max})$ où n est l'indice du milieu à la sortie de l'objectif; et donc la raideur du piège optique. D'après <http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/numaperture.html>

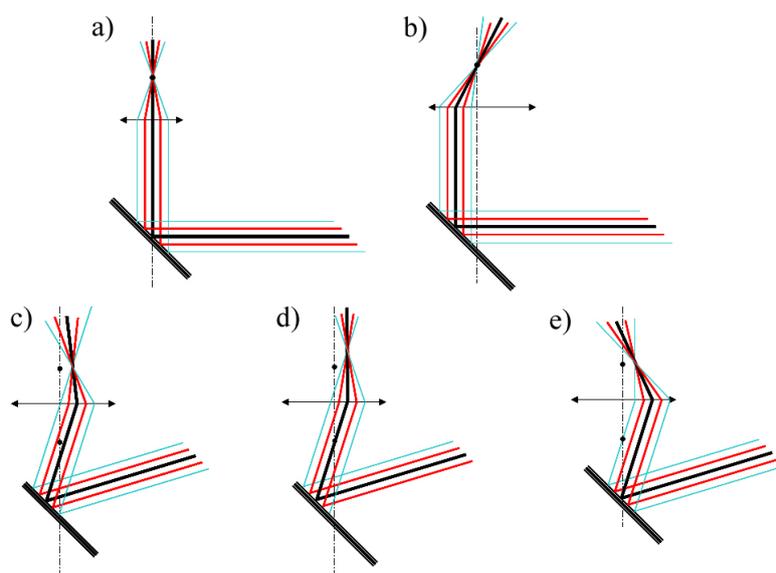


FIG. 2.4 – **Alignement du faisceau laser** L'alignement correct du faisceau laser est crucial pour avoir un piège optique symétrique; Quelques cas de figures : **a)** Cas idéal, le laser est centré sur le miroir dichroïque et arrive perpendiculaire à la lentille arrière de l'objectif; Le piège est centré et symétrique. **b)** Faisceau perpendiculaire mais hors de l'axe; Le piège est asymétrique. **c)** Faisceau ni perpendiculaire ni dans l'axe; Le piège est asymétrique et désaxé. **d)** Cas particulier ou le piège peut malgré tout être symétrique mais hors de l'axe, avec un faisceau ni perpendiculaire ni dans l'axe **e)** Faisceau centré sur le miroir dichroïque mais pas perpendiculaire; le piège est asymétrique et hors de l'axe.

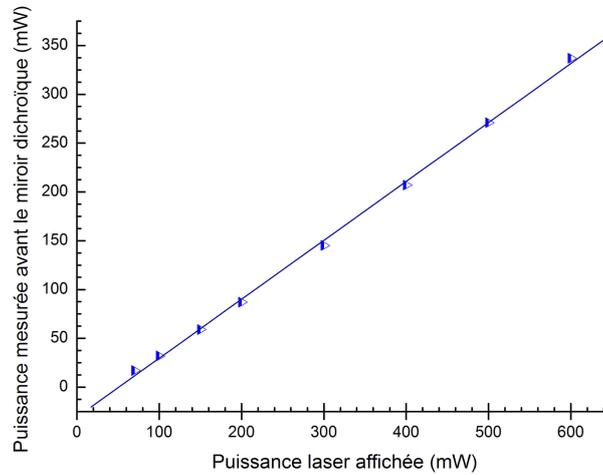


FIG. 2.5 – **Puissance utilisable du laser.** *Mesures de puissance du faisceau laser entre sa sortie de la fibre et lorsqu'il arrive à la lentille arrière de l'objectif.*

Nous disposons pour commencer d'un objectif à immersion huile à grande ouverture numérique (Olympus $\times 100$, AN=1.45). Nous l'avons vite abandonné pour les raisons énoncées en 1.3.2 pour un nouvel objectif à immersion eau, lui aussi à grande ouverture numérique, Zeiss planapoC 63 \times , A.N. $_{max} \approx 1.2$).

Avec cet objectif, les propriétés du piège sont indépendantes de la profondeur à laquelle nous travaillons, Fig 2.6. Cette indépendance est fort utile pour nos expériences : nous n'avons alors pas à nous soucier de la profondeur à laquelle nous nous trouvons dans la cellule, étant sûrs de pouvoir capturer une bille sans avoir à répéter la phase de calibration pour chaque profondeur. Ainsi nous pouvons envisager d'éloigner la zone de travail des parois de la chambre, travailler avec une micro-pipette et éviter les multiples problèmes inhérents d'adhésion non spécifique, surtout avec la chromatine.

Le piège ainsi généré (cf 1.3.2) se trouve un peu au-dessus du plan focal. En effet, l'image de la bille sur notre caméra n'est pas nette, et ce pour deux raisons. La pression de radiation sur la bille, en compétition avec la force de gradient de champ électrique contribue au rehaussement de la position d'équilibre. D'autre part, même si l'objectif est corrigé pour cet effet dans le visible, la position du plan focal est généralement dépendante de la longueur d'onde : Ce dernier ne se trouve pas à la même distance de l'objectif selon que l'on piège avec une longueur d'onde dans l'infra-rouge ou que l'on observe avec une caméra CCD, dans le visible.

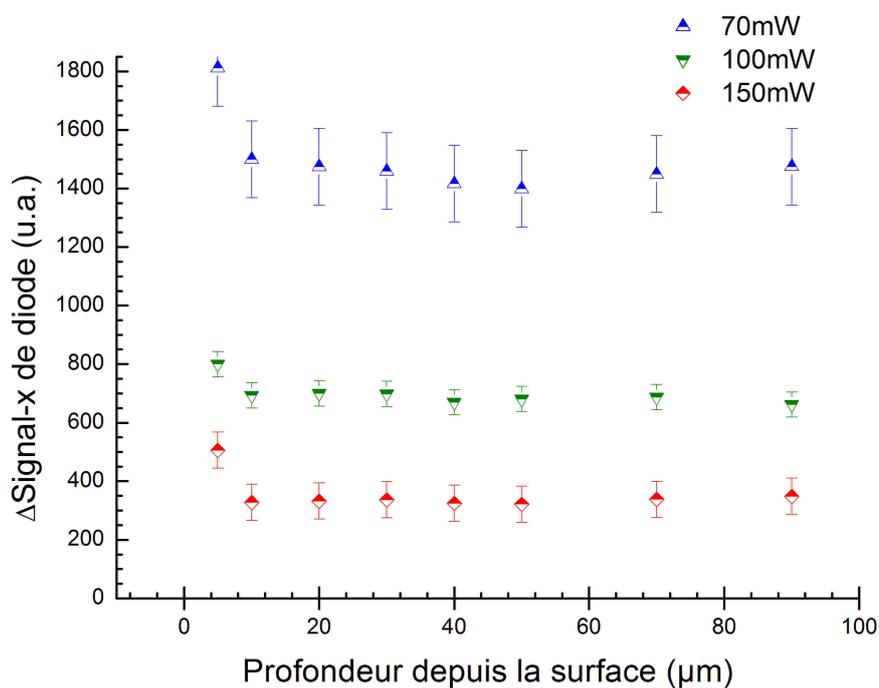


FIG. 2.6 – **Qualité de piégeage à différentes profondeurs** Déviation d'une bille ($\phi = 2.7 \mu\text{m}$, Estapor) par rapport au centre du piège en appliquant un flux hydrodynamique, en fonction de la profondeur de piégeage dans la cellule d'expérience, et pour différentes puissance du laser. Les propriétés du piège sont invariantes avec la profondeur, sauf près des parois semble-t-il. Plutôt qu'à un changement de la qualité de piégeage, cette déviation est certainement due à des effets d'écoulement hydrodynamique confiné entre la bille et la paroi.

2.1.2 Cellule d'expérimentation

La cellule dans laquelle se déroulent nos expériences possède de nombreux intérêts pour les études sur molécule unique (Fig 2.7). Elle est fermée de façon étanche, évitant ainsi toute évaporation du matériel biologique précieux. Le volume est très faible, de l'ordre de $3 \mu\text{l}$ (toutes les cellules n'étant pas identiques). Ce qui permet encore d'économiser les solutions biologiques précieuses en temps de travail.

Un autre intérêt est la possibilité de changer les solutions simplement et de façon contrôlée en pleine expérience. Pour cela nous utilisons un pousse-seringue maison commandé par un moteur à courant continu. Enfin, relativement facile à réaliser, cette cellule d'expérimentation est réutilisable à souhait.

Micro-pipette

Ce sont les micro-pipettes qui sont les plus délicates à fabriquer. Elles doivent avoir un diamètre d'ouverture inférieur au micron pour assurer une bonne étanchéité lors de l'aspiration d'une microbille, et ainsi éviter que d'autres billes parasites ne viennent se fixer près de l'embouchure. L'épaisseur de l'espaceur employé ($200 \mu\text{m}$) lors de la fabrication de la cellule impose aussi une limite haute au diamètre de la micropipette, qui ne doit pas excéder de beaucoup $140 \mu\text{m}$.

Nous réalisons nos micropipettes en deux étapes. Un premier fil capillaire est obtenu à partir de capillaires commerciaux. Le capillaire, suspendu verticalement avec un poids (45 g), est chauffé avec un chalumeau. La température de fusion du verre atteinte, le capillaire s'étire sous son poids, et la première ébauche d'un tube de verre fin est réalisée. Son diamètre n'excède pas 100 à $200 \mu\text{m}$. Ce tube capillaire est ensuite étiré et cassé localement à l'aide d'une étireuse à laser CO_2 , pour pipette biologique (Sutter Instrument, P-2000). La cassure est propre et nette. C'est indispensable pour une bonne étanchéité.

Cellule d'expérimentation proprement dite

Nous disposons ensuite de plaques de verre d'épaisseur 4 mm , percées de deux trous de 1 mm que nous avons réalisé en utilisant la perceuse à ultra-sons de l'atelier. En forçant un peu, nous faisons déboucher dans ces trous, des tubes de téflons de diamètre un peu plus grands (1.2 mm). Ainsi nous nous assurons une bonne étanchéité autour de ces tubes qui sont destinés à permettre le changement des solutions dans la cellule expérimentale.

Du côté de la surface de verre sans tube nous collons un espaceur de $200 \mu\text{m}$ (Sigma Aldrich) ; il est découpée pour créer une cavité dans laquelle débouchent les deux trous (Fig 2.7). Cette cavité n'est pas complètement fermée ; elle autorise le positionnement de la micro-pipette qui doit pointer à peu près au milieu de la cavité.

Nous déposons sur le verre de la colle araldite, tout autour de l'espaceur et puis sur l'ensemble une lame couvre-objet de microscope. En se solidifiant, l'araldite assure l'étanchéité de notre cellule (Fig 2.7 **b** et **c**). Il ne reste plus qu'à raccorder l'autre extrémité

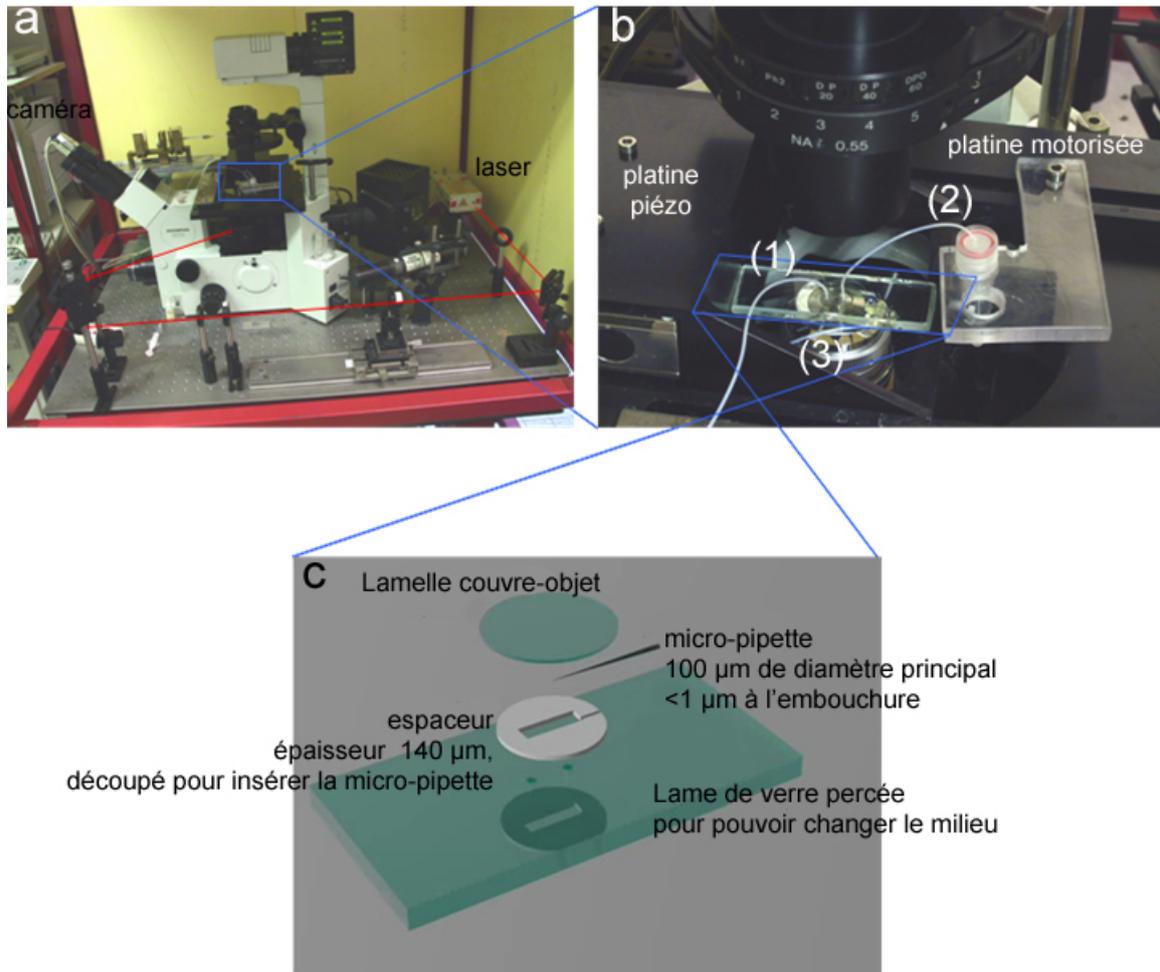


FIG. 2.7 – Notre dispositif expérimental **a**, vue d'ensemble de notre pince optique. En rouge le trajet du faisceau laser. **b**, agrandissement de notre chambre d'expérimentation. (1) tube de sortie lié au pousse-seringue. (2) tube court d'injection des milieux, connecté avec un réservoir. (3), tube connectant la micro-pipette à une seringue pour contrôler la fixation d'une bille à l'extrémité de la micropipette. **c**, schéma de principe de la chambre d'expérimentation.

de notre micro-pipette à une seringue pour régler la pression : aspirer ou souffler une bille à l'extrémité fine. Pour cela nous emmanchons la micro-pipette avec une aiguille de seringue, elle même reliée à la seringue par un autre tube de téflon. L'arrimage de la seringue sur la plaque de verre et l'étanchéité de l'ensemble est à nouveau assuré avec de l'araldite.

2.1.3 Détection et sensibilité

Même si un microscope n'est pas indispensable pour construire une pince optique, c'est un outil fort appréciable pour visualiser l'expérience, mais aussi pour monter facilement notre dispositif de détection de position de la bille piégée. Nous utilisons pour cela un microscope inversé de type IX70 Olympus.

Pour les expériences de type molécule unique, la position de la sonde, ici de la bille micro-métrique, doit être mesurée avec une précision nanométrique. Même en utilisant la lumière visible, il est possible d'avoir cette précision avec un objectif de microscope classique, une simple caméra ou une PSD. Afin de visualiser l'expérience, nous utilisons l'illumination du condenseur qui éclaire notre chambre à flux. Le flux lumineux est recueilli par l'objectif que nous utilisons d'autre part pour focaliser le faisceau laser. La lumière recueillie traverse le miroir dichroïque (Fig 2.2), 20 % sont dirigés vers une caméra CCD type Basler A113P. Les 80 % restant sont orientés vers une diode quatre-quadrants photo-sensible avec laquelle nous effectuons la détection en position proprement dite. La caméra ne nous sert ici qu'à visualiser nos manipulations dans la cellule d'expérimentation.

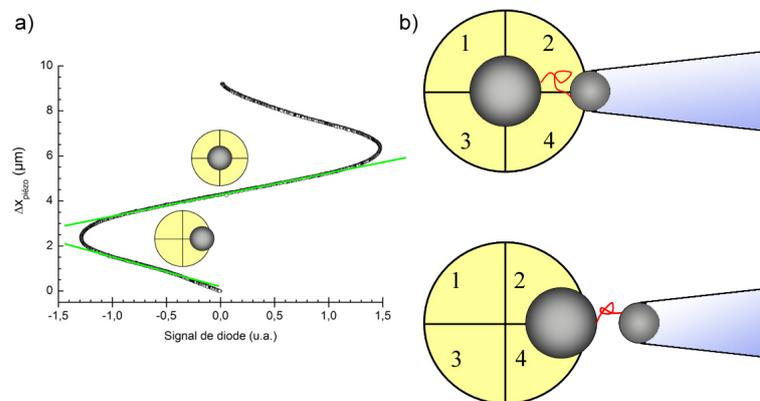


FIG. 2.8 – **Signal recueilli après la PSD.** a), il existe deux configurations ombre de la bille/PSD où la conversion signal de diode-déplacement est linéaire. Dans l'une, l'ombre de la bille est centrée avec la PSD ; dans ce cas nous sommes sensibles aux mouvements dans tout le plan perpendiculaire au faisceau laser. Dans l'autre, seulement une moitié de la PSD est ombragée. Nous ne sommes alors sensibles aux déplacements que selon une seule direction, en général la direction d'étirement. b), cette dernière configuration est utilisée lorsque nous travaillons avec des fibres courtes ($\leq 5 \mu\text{m}$). Nous évitons ainsi d'introduire l'ombre parasite de la bille maintenue par la micro-pipette dans le champ de la PSD.

Comme décrit par la figure (2.8), nous projetons l'ombre de la bille piégée sur la surface de la PSD. Les courants en sortie des quadrants sont convertis en tension et amplifiés directement après la photo-diode pour réduire le plus possible les bruits électroniques. Le traitement du signal est réalisé directement avec l'ordinateur sur les tensions amplifiées. Ce sont ces tensions, déjà traitées, que nous reportons sur un des axes de divers graphiques suivants, en unité arbitraire (u.a.). Pour la détection de position dans le plan focal, les quadrants photo-sensibles sont couplés deux par deux.

Si les centres de l'ombre de la bille et de la diode sont alignés, les quadrants sont tous éclairés de la même manière. Les courants en sortie des quadrants sont égaux. Après traitement, nous avons ici la position zéro du dispositif. En cas d'écart à cette position, les surfaces couvertes par l'ombre de la bille sur les différents quadrants ne sont plus égales. A partir des différences de tension ainsi générées, il est alors possible de remonter au déplacement de la bille.

$$\Delta x = a_x \frac{(V_1 + V_3) - (V_2 + V_4)}{\sum_{i=1}^4 V_i} \quad \Delta y = a_y \frac{(V_1 + V_2) - (V_3 + V_4)}{\sum_{i=1}^4 V_i} \quad (2.1.1)$$

a_x et a_y sont des constantes que nous déterminons lors de la phase de calibration de la façon suivante. Nous utilisons une bille fixée sur la surface de notre chambre. En faisant défiler la bille devant la diode tout en enregistrant la position de la platine piézo-électrique, nous traçons un graphe du signal de diode en fonction du déplacement.

Nous distinguons deux types de zones où la relation entre signal et déplacement est linéaire. Ces zones correspondent aux positionnement relatifs bille/photodiode décrits dans la Fig (2.8). C'est dans ces zones que nous alignons la diode avec le centre du piège en translatant la diode photo-sensible montée sur un support de translation XY muni de vis micrométriques.

Nous devons ensuite utiliser des billes qui, une fois piégées, offrent le meilleur rapport signal/bruit à la détection. Pour pouvoir distinguer nos trois régimes linéaires signal/déplacement et pour avoir la plus grande sensibilité (liée à la pente dans le graphe signal-déplacement, proportionnelle au rayon de la bille), le diamètre de l'ombre projetée de la bille doit être au plus égal au demi côté de la photodiode (la photodiode est constituée de quatre quadrants carrés).

En outre, il faut aussi prendre en compte les limites de détection optique, qui nous interdisent de prendre des billes de tailles inférieure au micron, le rapport signal/bruit serait trop faible. L'utilisation de billes de diamètre autour de $10 \mu\text{m}$ et plus est elle aussi à proscrire : la taille de la sonde est trop importante, et là encore le rapport signal/bruit trop faible. Lors de nos expériences nous avons utilisé des billes de diamètre compris entre 2 et $4 \mu\text{m}$.

2.1.4 Calibration

Autour de la position d'équilibre, le piège optique se comporte comme un potentiel harmonique. Pour tout déplacement autour de la position d'équilibre, la force de rappel est proportionnelle au déplacement. Les diverses méthodes de calibration, effectuées dans le cadre de cette hypothèse, cherchent à mesurer une constante de raideur équivalente du piège. Celle-ci varie avec la taille et la composition de la particule piégée [54][172] mais aussi avec la puissance du laser, sa longueur d'onde ou encore l'indice du milieu [10] [142]. Il n'est donc pas envisageable prédire analytiquement la constante de raideur.

Nous présentons ici trois procédures pour caractériser la raideur d'une pince optique : par flux hydrodynamique, par analyse des fluctuations dans le temps (théorème d'équipartition) ou dans l'espace des fréquences. Il en existe d'autres (voir [154]), par exemple : en enregistrant la réponse de la bille à un déplacement quasi-instantané du piège ; ou en mesurant directement, quand c'est possible, le transfert de quantité de mouvement entre la lumière et la bille [132]. Notons que les fluctuations de la bille selon l'axe de propagation du faisceau ne sont pas détectables avec la caméra et ont une amplitude inférieure à 100 nm dans les conditions standard d'utilisation. Elles n'influencent donc pas notre calibration (Fig 2.9).

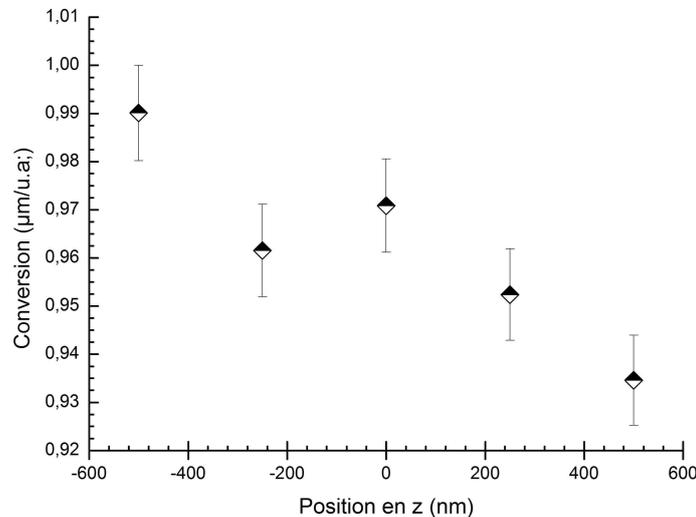


FIG. 2.9 – Variation de notre facteur de conversion déplacement (nm)/signal de diode (u.a.) avec la hauteur. Ce facteur de conversion a été mesuré sur une bille fixe, à différentes hauteurs de focalisation. La position 0 indique une focalisation identique à celle du piège. Les barres d'erreurs à 1 % sont reportées à titre indicatif.

2.1.5 Force de Stokes

Une première solution pour connaître la constante de raideur de notre piège optique est d'appliquer une force connue sur la bille et de mesurer l'écart entre les positions d'équilibre avec et sans force extérieure appliquée.

La force la plus simple à générer expérimentalement est celle d'un flux hydrodynamique laminaire sur la bille : la force de Stokes, $F_{Stokes} = 6\pi\eta rv$, où r , est le rayon de la bille, η la viscosité dynamique du milieu et v la vitesse de l'écoulement. La bille est de dimension micrométrique, la vitesse de l'écoulement généré de l'ordre de $100 \mu\text{m s}^{-1}$, le tout dans un milieu aqueux. Nous pouvons donc déterminer un ordre de grandeur du nombre de Reynolds afin de vérifier que notre hypothèse d'écoulement laminaire et donc notre calibration est bien valide.

$$Re = \frac{\rho dv}{\eta} \propto 10^{-4} \ll 1 \quad (2.1.2)$$

Nous appliquons donc un flux hydrodynamique contrôlé à la vitesse v , autour de la bille piégée, de diamètre d , à l'aide de la platine motorisée et commandée via un générateur de fonctions. Pour notre calibration nous utilisons des fonctions créneaux. La bille est alors déviée de sa position d'équilibre sans flux (Fig 2.10).

La vitesse de l'écoulement est déterminée en faisant défiler une bille fixée sur le support de verre devant la diode. Nous pouvons alors déterminer la constante de raideur du piège selon la direction du flux appliqué, pour différentes puissances du laser. Par exemple pour la Fig 2.10, la relation entre la raideur du piège $k_{piège}$ et la puissance laser affichée P_{laser} est :

$$k_{piège} = -2.3 + 0.067P_{laser} \quad (2.1.3)$$

2.1.6 Analyse des fluctuations

Une autre possibilité pour caractériser le piège optique est d'analyser les fluctuations de la bille dans le piège. En effet, la bille piégée décrit encore un mouvement brownien, mais restreint. L'amplitude des fluctuations de la bille est d'autant moins importante, que la constante de raideur associée au piège est grande. En analysant ces fluctuations, en temps (équipartition de l'énergie) ou en fréquence, il est possible de remonter à une constante de raideur du piège $k_{piège}$, toujours dans l'hypothèse harmonique.

Analyse de Fourier

Le spectre de puissance de la bille, $|\Delta x(f)|^2$ suit une Lorentzienne (Fig 2.11) ; Il est identique à celui d'un oscillateur amorti pour lequel on a négligé le terme inertiel :

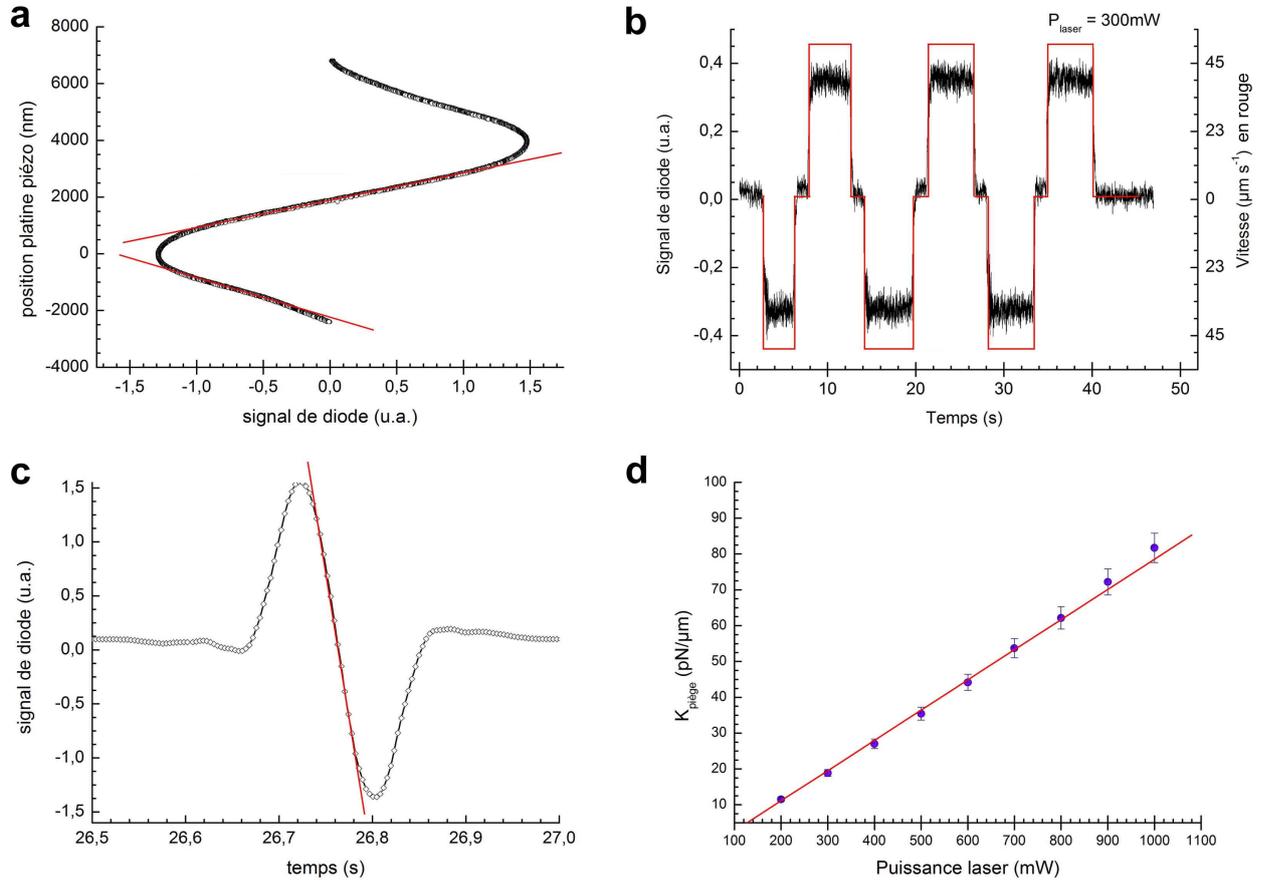


FIG. 2.10 – Calibration par flux hydrodynamique. **a**, conversion signal de diode-déplacement, obtenue en faisant défiler une micro-bille ($\phi=3.36 \mu\text{m}$) devant la PSD. Nous enregistrons en parallèle le signal de la PSD et le déplacement réel de la bille, qui correspond au déplacement de la platine piézo-électrique. Deux zones où la relation signal de diode-déplacement de la bille est linéaire sont exploitables (en rouge). **b**, signal (en noir) recueilli lors du déplacement d'une bille piégée soumise à un flux hydrodynamique alternatif. Ce flux est généré par déplacement de la platine motorisée (en rouge) dont les mouvements sont contrôlés par un générateur de fonction. **c**, mesure de la vitesse du flux appliqué en faisant défiler, à cette même vitesse, une bille fixée sur le support devant la PSD. Après conversion signal de diode-déplacement (cf **a**), la pente nous renseigne sur la vitesse de la platine motorisée et donc sur la vitesse du flux hydrodynamique rencontré lors de **b**. **d**, connaissant v et Δx nous pouvons en déduire la constante de raideur du piège (dans l'hypothèse harmonique). La relation P_{laser} -constante de raideur du piège est linéaire.

$$|\Delta x(f)^2| = \frac{4\gamma k_B T}{k_{\text{piège}}^2} \frac{f_c^2}{f_c^2 + f^2}. \quad (2.1.4)$$

la fréquence de coupure, f_c , nous renseigne sur la constante de raideur du piège, en effet :

$$f_c^2 = \frac{k_{\text{piège}}}{\gamma}. \quad (2.1.5)$$

avec $\gamma = 6\pi\eta r v$ pour une sphère dans un fluide.

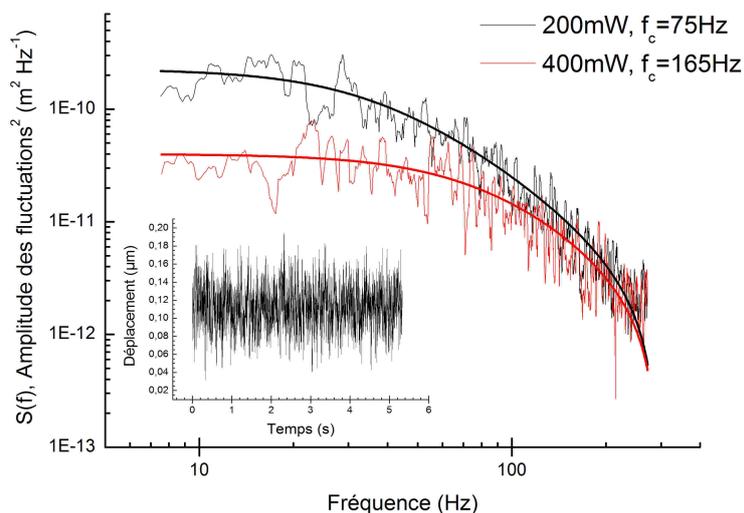


FIG. 2.11 – **Calibration par analyse spectrale.** Analyse spectrale du signal recueilli enregistré avec la diode quatre quadrants. (insert : fluctuations selon une direction du plan XY d'une bille piégée, $3.36\mu\text{m}$, Spherotech, en fonction du temps). Les courbes $S(f)$ sont ajustées par des lorentziennes (deux paramètres ajustables). Nous pouvons alors déterminer la raideur de notre piège à partir de la fréquence de coupure de cette lorentzienne, pour une puissance laser donnée.

Théorème d'équipartition

En intégrant le résultat précédent sur l'ensemble des fréquence (théorème de Parseval), on retrouve le théorème d'équipartition de l'énergie, qui permet lui aussi de connaître la constante de raideur du piège optique :

$$\int_0^\infty |\Delta x(f)|^2 df = \frac{k_B T}{k_{\text{piège}}}. \quad (2.1.6)$$

En enregistrant le mouvement brownien restreint puis en projetant ces positions obtenues sur l'axe selon lequel on désire connaître la constante de raideur du piège, nous obtenons un histogramme avec une enveloppe gaussienne (dans la limite où N est grand, théorème central limite) (Fig 2.12). La largeur à mi-hauteur de cette gaussienne nous permet de remonter à $k_{\text{piège}}$ selon l'axe de projection.

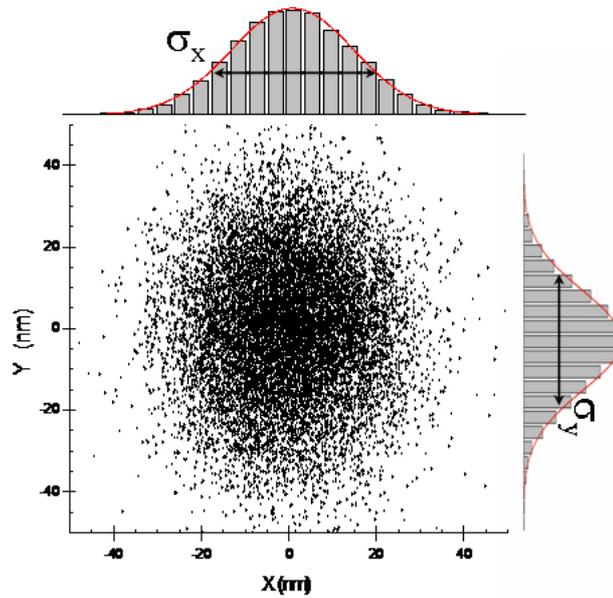


FIG. 2.12 – **Calibration par équipartition.** *Echantillonnage des positions occupées successivement par la bille dans le plan XY , perpendiculaire à l'axe optique. Acquisition à 10 kHz pendant 4.6 s pour une puissance en sortie de fibre du laser de 400 mW. En haut et à droite, histogrammes de la distribution de ces positions projetées respectivement selon les axes X et Y , et ajustement avec une gaussienne dont la largeur à mi-hauteur nous renseigne sur l'amplitude des fluctuations et, en utilisant le théorème d'équipartition, sur la raideur du piège : $1/2k_{\text{piège}} \langle \Delta x^2 \rangle = 1/2k_B T$. Le piège n'est pas isotrope, nous n'avons pas $\sigma_x = \sigma_y$*

Cependant, il est plus difficile de s'affranchir des problèmes de dérives mécaniques lors de l'acquisition des données en travaillant dans l'espace temporel. Ces dérives lentes (de l'ordre de 100 nm/mn) ont tendance à élargir les distributions et conduisent à une sous estimation de la constante de raideur. Dans l'espace des fréquences, on s'affranchit de ces effets en imposant un filtre passe-haut avec une fréquence de coupure autour de 5 - 10 Hz.

De ces techniques de calibration, c'est celle par flux hydrodynamique que nous avons le plus utilisée. Nous obtenons une relation linéaire entre la constante de raideur du piège et la puissance laser. Par analyse de Fourier, nous rencontrons des problèmes d'échantillonnage et de bruit électronique pour les puissances du laser au-dessus de 700 mW.

2.1.7 Vers la pince magnéto-optique

Motivation, concept et difficultés expérimentales

Si les moteurs moléculaires comme l'ARN-polymérase sont capables d'exercer une force importante (15-30 pN) lors de leurs déplacements sur la molécule d'ADN [176][156], elles exercent aussi un couple en amont du site de réplication. Cette contrainte, même si elle relâchée par des protéines appartenant à la classe des topoisomérases [75], pourraient tout de même avoir un rôle dans la déstabilisation du nucléosome. Dans le but d'étudier entre autre, la stabilité du nucléosome en fonction de la torsion de la molécule d'ADN, nous avons mis au point une pince magnéto-optique nous permettant d'exercer à la fois un couple et une tension sur l'ADN [36]. C'est ce dispositif que nous allons décrire ; il pourra aussi s'appliquer à une la fibre de chromatine.

Réalisation

Nous avons repris l'idée de pinces magnétiques et l'avons adaptée à notre pince optique. La solution proposée par Sacconi & al. [124] est élégante et permet une rotation de la bille selon quasiment n'importe quel axe, moyennant un pilotage du courant traversant les électro-aimants.

Mais les contraintes d'espace sont restrictives : encombrement de l'objectif, relativement large ($\phi=3.6$ cm), de la cellule d'expérimentation et de la platine piézo. En conséquence, notre dispositif devait être de conception simple, facile et rapide à mettre en place à partir de la configuration initiale, ne pas trop interférer avec l'éclairage du microscope, et s'adapter au mieux avec notre système de chambre à flux. Dans notre cas, seule la rotation dans l'axe de la molécule (axe X) nous préoccupe. Notre dispositif final de pince magnéto-optique se présente comme suit :

Un support en plastique, fabriqué par nos soins, entoure l'objectif. On trouve sur ce support une bobine créant un champ vertical (V1) et deux bobines horizontales (H1, H2). L'autre bobine verticale est maintenue par un autre support en plastique autour du tube du condenseur du microscope (V2) (Fig 2.13). Les bobines horizontales sont fixées au support avec des vis en acier qui jouent en même temps le rôle de noyau magnétique, permettant d'atteindre, dans cette direction, des valeurs de champs plus élevées au niveau de l'échantillon : autour de 40 G (4mT). Pour réduire les effets de gradient de champ nous avons arrondi l'extrémité de ces vis. L'objectif du microscope est composé de matériaux

sans propriétés magnétiques, tout comme le tube du condenseur, donc le jeu de bobines verticales ne contient pas de noyau magnétique.

Les contraintes d'espace nous ont imposé la taille des bobines. Nous les avons conçues en utilisant du fil de cuivre de 0.4 mm de diamètre pour supporter des intensités autour de 1 A. Les bobines horizontales sont longues de 1 cm, ont un diamètre de 1.8 cm et contiennent 90 tours. Les bobines verticales contiennent environ 130 tours, sont longues de 1.55 cm, et ont un diamètre de 4.5 cm et 3.9 cm respectivement pour la bobine de l'objectif et celle du tube de condenseur. Les résistances de ces bobines sont de 1.1 Ω et 3.7 Ω (respectivement bobines horizontales et verticales). L'intérêt de ce dispositif est qu'il assure un alignement optimal du champ magnétique avec la zone de piégeage.

Ensuite un champ tournant est appliqué en contrôlant le courant traversant le jeu de bobine. A cette fin nous utilisons la carte de contrôle (Visual kit Comstep+) du moteur pas à pas pilotant en parallèle la focalisation de notre objectif. Cette solution simple et peu honéreuse limite à huit le nombre de positions discrètes que le champ magnétique adopte pour effectuer un tour complet, ce que nous estimons être largement suffisant pour appliquer un couple à une molécule d'ADN ou une fibre de chromatine. La vitesse maximale de rotation, les aspects d'écoulement et de frottements mis à part, est limitée par la vitesse de la carte de pilotage, soit 30 Hz.

Nous faisons varier l'intensité du champ magnétique en jouant sur le courant traversant les bobines. Ce contrôle est assuré en utilisant une alimentation en tension continue (Selectronics) et un rhéostat circulaire (Radiospares) branché juste avant les bobines.

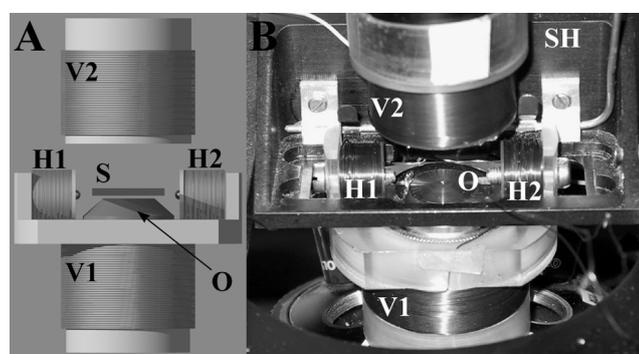


FIG. 2.13 – dispositif magnétique **A**, schéma et **B** photo de notre dispositif magnéto-optique. Bobines *H1/H2* horizontales et *V1/V2* verticales. *S*, chambre à flux. *O*, objectif, *SH*, support monté sur la platine piézo-électrique.

Divers tests

Billes employées Les billes magnétiques sont le plus souvent constituées d'un cœur paramagnétique et d'une coque en polymère qui les rend solubles. Ce cœur paramagnétique n'est pas transparent au faisceau laser et la plupart des micro-billes magnétiques ne

conviennent pas à ce genre d'expérience : lorsqu'on tente d'attraper une telle bille, elle est dégradée par un échauffement important dû à l'absorption par sa partie magnétique. Ou alors, c'est la pression de radiation qui l'emporte et qui éjecte la bille du piège optique.

Nous avons testé plusieurs fournisseurs de billes magnétiques avant de nous fournir chez Micromod : billes 3 et 4 μm micromer $\text{\textcircled{R}}$ -M. La plupart des billes ont un rapport entre la taille du cœur magnétique et la taille de la coque en polymère suffisamment petit pour autoriser la capture avec les pinces optiques, sans pour autant compromettre la possibilité d'orientation sous champ magnétique.

Champ magnétique généré Nous avons mesuré l'amplitude du champ magnétique créé par les bobines au niveau de l'échantillon avec une sonde de Hall. Pour un courant traversant les bobines de 1.5 A, le champ est de l'ordre de 4 mT. Nous avons obtenu un résultat semblable par simulation par éléments finis. Les gradients des champs magnétiques générés par les paires de bobines sont faibles : de l'ordre de 10 G/m dans un rayon de 1 mm autour du centre de l'échantillon. Ces valeurs sont des ordres de grandeur, obtenus avec un maillage très fin dans la zone de piégeage. D'autre part nos expériences se déroulent sur une petite zone (une centaine de μm^2) et le champ peut alors être considéré comme homogène à cette échelle.

Une première étape fut de contrôler si notre dispositif générait des champs suffisamment intenses dans toutes les orientations du plan défini par les bobines pour faire tourner des micro-billes magnétiques en solution.

Les billes super-paramagnétiques conservent, du fait de leur hystérésis, une aimantation rémanente en champ extérieur nul. En suspension, ces billes tendent à s'agglomérer. En appliquant un champ magnétique, ces agrégats s'ordonnent selon la direction définie par ce champ, et on obtient ainsi des alignements de billes. Maintenant, si on fait tourner le champ magnétique dans un plan perpendiculaire à la surface de verre, alors ces rangées de billes suivent le champ et tournent avec lui (Fig 2.14).

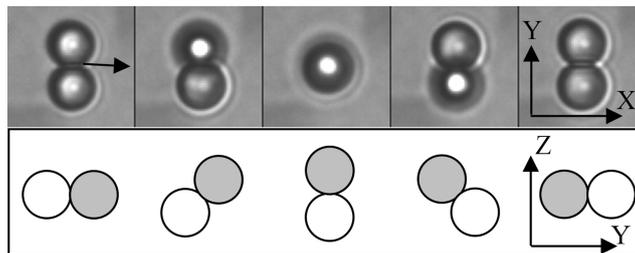


FIG. 2.14 – Visualisation de la rotation d'une association de deux billes super-paramagnétiques avec le champ magnétique. Les billes sont libres dans la solution, visualisées dans le plan OXY (séquence du dessus) et tournent en suivant le champ magnétique tournant dans un plan vertical OYZ (séquence du dessous).

Enroulement de deux molécules d'ADN Pour tester notre montage, nous devons appliquer un couple à une molécule simple comme l'ADN et en mesurer les effets désormais connus [139] [4] : réduction de longueur apparente de la molécule, due à la création d'une forme plectonémique dans le cas d'une faible force de tension. Néanmoins, pour appliquer un couple à un ADN, il faut que celui-ci soit attaché par ses deux extrémités et sur les deux brins à la fois. Si un seul des brins est attaché, ou s'il existe une cassure dans le squelette de la molécule, alors la molécule est libre de tourner sur elle-même, et il est impossible de lui appliquer un quelconque couple.

Nous avons donc accroché deux molécules d'ADN entre les billes, puis imposé une rotation à la bille piégée. La position du piège est restée fixe tout le long de l'expérience. L'entrelacement des deux molécules est accompagné d'une diminution de la distance entre les deux billes (Fig 2.15). Notre dispositif est opérationnel.

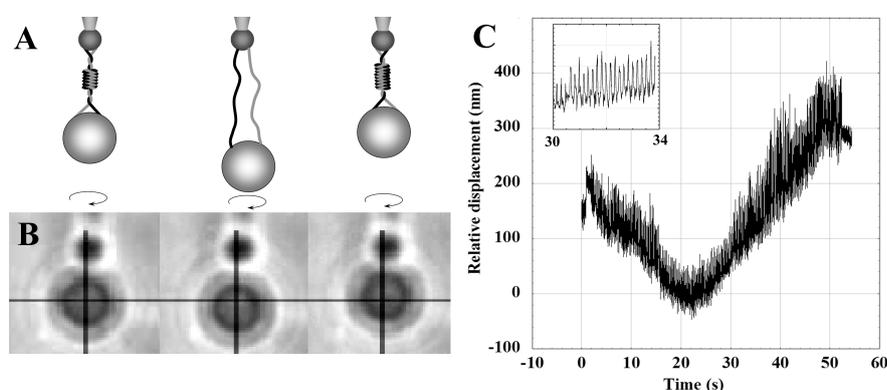


FIG. 2.15 – **Expérience test d'enroulement de deux molécules d'ADN** **A** Schéma de l'expérience : les deux molécules d'ADN ont été préalablement enroulées de 50 tours. Nous déroulons ces 50 tours en faisant tourner la bille dans le sens contraire et en poursuivant la rotation de la bille, nous enroulons les deux molécules de 100 tours. Le piège est fixe au cours de l'expérience et nous pouvons donc suivre l'évolution de la longueur apparente des molécules d'ADN en fonction de leur enlacement. **B** Visualisation avec la caméra CCD. **C** : Signal recueilli. Du fait de la présence d'une impureté sur la bille chaque tour peut être identifié : on compte deux pics par tour.

2.1.8 Choix et préparation des billes

Dans ces expériences de traction de molécules d'ADN, l'accrochage efficace (solide, rapide et unique) et la détection précise (quelques nm) sont deux exigences qui passent par le contrôle de la qualité des billes que nous utilisons. Nous exposons dans ce qui suit les contraintes et les problèmes que nous avons rencontrés dans la préparation des billes, ainsi que les choix que nous avons faits pour les résoudre.

Taille et composition

Pour des raisons liées à la détection (cf 2.1.3), nous utilisons des billes différentes selon qu'elles sont dans la pince optique ou maintenues par la pipette.

Ensuite il faut tenir compte de la composition de la surface des billes et du tampon utilisé. Effectivement, certains couples billes du piège/bille de la pipette ont tendance à se coller littéralement l'une à l'autre, alors que d'autres peuvent être maintenues en contact indéfiniment sans pour autant se coller.

Il est aussi parfois impossible de greffer des molécules d'ADN à la surface de certaines billes, même si elles ont été marquées efficacement avec le bon anti-corps. Cet effet est très certainement dû à la présence de charges négatives résiduelles à la surface des billes dans les conditions physiologiques (coque en polymère contenant des résidus chargés), interdisant à l'ADN de s'approcher suffisamment pour pouvoir se lier par ses extrémités.

La monodispersité des échantillons achetés est aussi un critère important. Puisque la constante de raideur du piège est fonction du rayon de la bille capturée, dans le cas d'une suspension de billes monodisperse nous n'avons qu'à calibrer le piège une seule fois, et non pas à répéter cette opération pour chaque bille comme ce serait le cas avec une suspension de billes trop polydisperse.

Ainsi, après une longue période de test croisés (composition, taille, marquage), les billes que nous utilisons le plus couramment sont les suivantes : 3.36 μm Spherotec initialement acide carboxylique (-COOH), en surface, et modifiées avec streptavidine selon le protocole ci-après. Et 1.5 μm Sicastar [®]Micromod, initialement amine (-NH₂), en surface, et modifiées avec anti-digoxigénine ou streptavidine.

Marquage des billes

Pour éviter l'accrochage des deux extrémités de l'ADN sur une même bille, nous avons modifié les deux bouts de la molécule avec deux anti-gènes différents. De ce fait, nous utilisons des billes marquées différemment en surface selon qu'elles sont destinées à la pince optique ou à la micro-pipette.

Afin de contrôler le plus possible la qualité de marquage des billes, nous avons décidé de les marquer nous-même avec l'anti-corps adapté. Les protocoles pour lier de façon covalente des protéines à la surface de ces billes sont bien établis. Pour notre part nous nous inspirons de celui mentionné dans [173] pour les surfaces -COOH, et celui proposé par Polysciences pour les surfaces -NH₂ ([http://www.polysciences.com/shop/datasheet.asp#Microspheres % 20 & % 20Particles](http://www.polysciences.com/shop/datasheet.asp#Microspheres%20&%20Particles)).

Tout le long des préparations et lors de la conservation, nous utilisons des tubes de verre pour minimiser les pertes de billes par adhésion aux parois. Effectivement, lors des centrifugations, nous avons constaté une agrégation d'une grande partie des billes sur les parois des tubes en plastique. Lorsque nous retirons ensuite le surnageant par aspiration, même douce, les billes se décollent de la surface du tube au passage du ménisque et sont

aspirées involontairement. Avec les tubes de verre, le culot est bien défini et l'adhésion de billes aux parois est nettement réduite.

Ces tubes sont réalisés à partir de pipettes Pasteur préalablement découpées avec un stylo à diamant. Ces tubes de verres aux extrémités ouvertes sont ensuite partiellement fondus à l'un de leurs bouts avec un chalumeau, pour aboutir à un tube de verre au volume avoisinant 700 μl .

Surface -COOH Nous utilisons des billes en polystyrène de 3.36 μm , marquées à leur surface par des groupements acide carboxylique (Spherotech, 3.36 μm carboxyl-polystyrene particles, 5% w/v).

- 25 μl de billes à 5% w/v dans un tube en verre, trois lavages successifs ; ajouter 500 μl d'eau microfiltrée, centrifugation à 4000 g pendant 5 mn. Le surnageant est jeté et le culot est resuspendu.
- Après la dernière centrifugation, le culot est resuspendu dans une solution préalablement préparée de 50 μl , 5 mM acétate de sodium, 3 $\mu\text{g/ml}$ streptavidine (Sigma), 5 mg/ml EDAC (Sigma). Incubation pendant 1/2 journée à température ambiante sous agitation douce et rotative pour éviter toute sédimentation.
- Trois lavages successifs des billes avec une solution de PBS 1 \times . Le culot final est repris dans 50 μl PBS 1 \times (concentration finale 5% w/v), 0.1 mM azid (pour éviter toute prolifération bactérienne).
- Conservation à 4°C

Surface -NH₂ Nous disposons initialement de billes 1.5 μm à 5% w/v (Micromod, Sicastar ®(NH₂), 1.5 μm), d'anti-digoxigénine (Roche), d'une solution aqueuse de glutaraldéhyde à 8% (Sigma), d'une solution pure d'éthanolamine (Sigma, 98%) et de tampon PBS1 \times (solution diluée de PBS 10 \times , Gibco)

- 50 μl de billes dans un tube en verre, trois lavages successifs : ajouter 500 μl de PBS 1 \times , centrifugation à 4000 g pendant 5 mn. Le surnageant est jeté et le culot est resuspendu.
- Après le troisième lavage, reprendre le culot dans 50 μl glutaraldéhyde 8% (Sigma). Incubation 5 h à température ambiante avec agitation ou sur banc tournant pour éviter toute sédimentation.
- A nouveau trois lavages au PBS 1 \times
- le culot est repris dans 100 μl anti-digoxigénine (Roche), concentration finale \sim 200 $\mu\text{g/ml}$, dans PBS 1 \times ; incubation pendant la nuit toujours sous agitation douce et rotative.
- Centrifugation 5 mn à 5000 g. Récupération du surnageant qui peut-être récupéré et conservé à -20°C : il contient encore une grande quantité d'anti-digoxigénine, très précieuse.

- Le culot est repris dans 100 μl éthanolamine 0.2 M, incubation 1 h sous agitation douce et rotative à température ambiante.
- Deux lavages avec PBS 1 \times
- Le culot est repris dans 50 μl PBS 1 \times , 0.1 mM azid. Conservation du tube à 4°C

2.2 Préparations biochimiques

2.2.1 Préparation de l'ADN

Le principe pour accrocher une fibre de chromatine ou une molécule d'ADN entre les deux billes est identique. Pour cela il est nécessaire de modifier les extrémités de la molécule d'ADN, de façon à ce que celles-ci présentent des nucléotides marqués par des anti-gènes comme la digoxigénine, ou par de la biotine. Les techniques requises sont bien établies et nous allons les détailler en partie.

Le plus souvent nous disposons initialement de plasmide, c'est à dire d'une molécule d'ADN circulaire. Dans ce cas, la première étape consiste à couper ce plasmide en un seul endroit avec une enzyme de restriction adaptée pour aboutir à une molécule d'ADN linéaire dont les deux extrémités sont simples brins. Il est préférable pour l'utilisation de l'ADN polymérase par la suite, d'avoir des extrémités simples brins de type 5'—3' (Fig 2.16).

L'étape suivante consiste à compléter les extrémités simples brins avec des nucléotides marqués par un anti-gène. L'enzyme qui produit ce travail est l'ADN polymérase, ou juste une de ces sous unités qu'il est possible d'isoler : Klenow exo^- . Les deux extrémités de la molécule d'ADN sont désormais marquées avec le même antigène. Pour éviter tout problème de bouclage de l'ADN sur la même bille il est préférable de marquer avec deux antigènes différents les extrémités de l'ADN. Pour cela nous répétons le processus découpage (avec un autre enzyme de restriction)-marquage une seconde fois. Cependant pour le second marquage nous introduisons des nucléotides marqués avec un autre anti-gène. Partant d'un plasmide d'ADN, nous aboutissons ainsi à deux molécules d'ADN de longueurs connues et dont les extrémités sont marquées différemment.

Nous avons procédé de manière sensiblement différente quand nous avons utilisé l'ADN de phage λ (Takara), cette molécule de 48 kbp ayant des extrémités simples brins initialement. Pour marquer la chromatine native issue d'érythrocyte de poulet, la méthode employée est elle aussi un peu différente et détaillée dans 2.2.3.

Le choix des enzymes de restrictions à utiliser est propre à chaque expérience. Voici un exemple typique de préparation d'une molécule d'ADN, ici de type M13mp18 :

Découpage de l'ADN avec une enzyme de restriction Nous avons choisi pour le plasmide M13mp18 (Fermentas puis New England Biolabs) les enzymes Bamh1 (Fermentas) et EcoR1 (Fermentas) qui coupent chacun la molécule d'ADN en un seul site. Nous

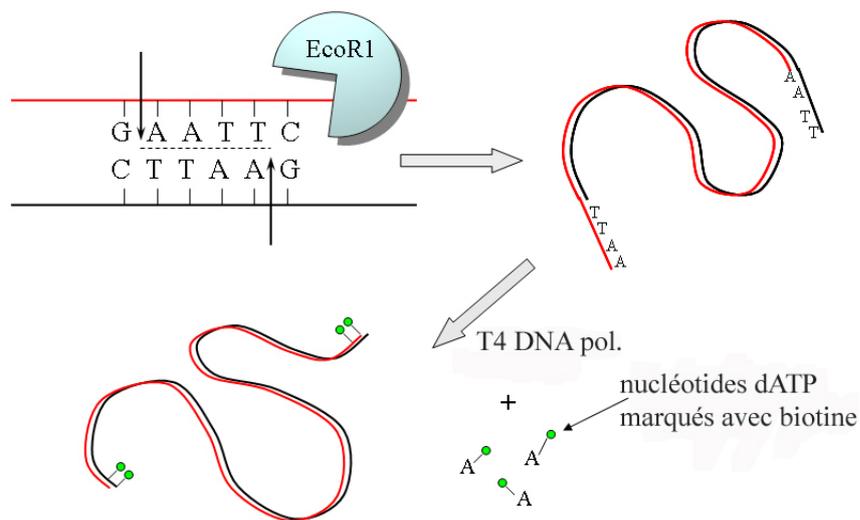


FIG. 2.16 – Schéma de la procédure de découpage et marquage d'une molécule d'ADN. Le choix de l'enzyme de restriction (ici *EcoRI*) dépend de la séquence d'ADN ainsi que de l'endroit choisi pour couper et marquer une molécule d'ADN, ici supposée circulaire au départ (plasmide). Nous complétons ensuite les extrémités simple brins en utilisant l'ADN polymérase II (*Fermentas*) ($5' \rightarrow 3'$) avec des nucléotides marqués par des anti-gènes correspondant aux anti-corps de la surface des billes, typiquement dATP-biotine (*Gibco*) ou dUTP-digoxygénine (*Roche*). En répétant ces étapes par deux fois, il est possible de marquer avec deux anti-gènes différents les extrémités des fragments issus du plasmide initial.

décrivons la première étape du marquage (ici avec biotine), la procédure pour le marquage avec la digoxigénine étant similaire.

- 5 μg d'ADN dans 50 μl de tampon pour Bamh1 1 \times + 25 u. de l'enzyme Bamh1. Incubation 1 h à 35°C
- Arrêt de la réaction par précipitation de l'ADN avec 25 μl acétate de sodium (3M) et 150 μl éthanol 95%.
- Centrifugation 17000 g, 10 mn
- Enlever le surnageant et rincer l'ADN précipité (en blanc au fond du tube) avec 100 μl éthanol 95%.
- Nouvelle centrifugation.
- Enlever le surnageant et laisser sécher
- Resuspendre dans 50 μl du tampon de la DNA polymérase (NaP 25 mM, MgCl₂ 0.5 mM, pH = 7.7)

Marquage

- Ajouter les dNTP pour atteindre une concentration finale de ~ 0.1 mM pour chacun. Utiliser des dATP-biotine et dCTP-biotine (Fermentas)
- Ajouter 25 u. d'ADN polymérase T4, incubation 30 mn à 37°C
- Arrêter la réaction avec ajout d'EDTA, concentration finale : 10 mM
- Reprendre le cycle précipitation-centrifugation.
- Resuspendre dans le tampon de l'enzyme EcoR1.

Répétition Recommencer le protocole précédent en changeant les dNTP marqués ; utiliser des dUTP digoxigenin (Roche).

Resuspendre à la fin dans un tampon physiologique comme PBS 1 \times , et 0.1 mM azid pour éviter tout développement de colonies bactériennes.

2.2.2 Chromatine reconstituée

Nous allons maintenant expliquer comment nous avons préparé les diverses chromatines reconstituées. Nous poursuivrons dans la partie qui suit avec la chomatine native puis avec nos protocoles permettant de fixer les fibres à la surface des billes pour finalement tirer dessus.

A partir d'extrait d'œufs de *Xenopus Laevis*

Au cours de cette thèse nous avons utilisé, entre autre, pour reconstituer la chromatine, des extraits d'œufs de *Xenopus Laevis* et dans une moindre mesure, de drosophile. La procédure la plus courante que nous avons utilisée est la suivante ;

Nous utilisons pour ce type de reconstitution les fragments des molécules d'ADN issue de phage λ , qui ont été préalablement coupés par l'enzyme de restriction EcoR1 puis

marqués. Ces fragments sont longs de 10 et 38 kbp. Nous avons choisi de tels fragments essentiellement pour leur longueur car ils nous permettent de ne pas avoir à trop approcher les deux billes : en effet, lorsqu'elles entrent en contact alors qu'elles baignent dans un extrait d'œufs de *Xenopus Laevis*, elles ont tendance à se coller définitivement.

La première étape consiste donc à suspendre une unique molécule d'ADN entre les deux billes. Cette opération est effectuée dans un tampon physiologique type PBS 1 ×. En étirant cette molécule isolée une première fois, nous enregistrons son profil d'étirement ; en le comparant à celui prédit par le modèle WLC, nous nous assurons que nous avons bien une unique molécule d'ADN suspendue. Avant d'introduire l'extrait, nous éloignons les deux billes pour éviter qu'une autre molécule d'ADN ne viennent ponter les billes. La distance minimale entre nos billes est de l'ordre de 2 μm . Nous remplaçons délicatement le tampon (PBS 1 ×) par l'extrait. Le débit ne dépasse pas quelques $\mu\text{l}/\text{mn}$ et la cellule d'expérimentation a été conçue de telle façon que le flux hydrodynamique étire les molécules d'ADN greffées sur la bille, dans le sens opposé à la micropipette ; encore pour éviter le plus possible tout pontage multiple.

Hormis l'obtention d'extrait de bonne qualité, cette méthode de reconstitution est simple. L'arrivée de l'extrait dans la cellule est visible, car même bien purifié, ce dernier contient encore de nombreuses impuretés. Afin de s'assurer que l'extrait remplit bien tout le volume de la chambre, nous continuons pendant encore 3 mn environ à appliquer un flux, avec un débit deux à trois fois moins important toutefois, ceci pour éviter de contraindre la fibre de chromatine déjà en formation. Nous assistons alors en direct à la formation d'une fibre de chromatine.

Ensuite, la procédure est spécifique à l'expérience. Le temps d'incubation, après arrêt du flux, est le plus souvent de 5 mn minimum, même si avant la fibre de chromatine semble déjà bien constituée comme nous le verrons par la suite (cf section 5.1.1). Mais cette technique présente un inconvénient majeur : le contenu de l'extrait n'est pas parfaitement contrôlé ; nous y reviendrons par la suite.

Sur une séquence positionnante de la NCP

L'ADN Comme nous l'avons mentionner dans le premier chapitre, quelques séquences d'ADN sont réputées pour leur grande affinité vis à vis de l'octamère d'histones. Nous utilisons la séquence 5S ADN-r d'oursin répétée [47] pour la reconstitution de collier de perles artificiel, et la séquence 601 [160] pour la reconstitution de NCP individuelles destinée à nos études de dilutions.

Le plasmid p2085S-G5E4 est découpé avec l'enzyme de restriction *Acc65I* (*Asp718*), *CaiI* (*AlwNI*), *SspI*, *ClaI* (Fermentas). Les fragments ainsi obtenus sont séparés sur 4% PAGE native et électrodilution. Les concentrations sont mesurées au spectro-photomètre à la longueur d'onde de 260 nm. Les fragments longs de 2539 bp sont ainsi composés : une séquence longue d'environ 400 bp, correspondant au promoteur E4, est encadrée par deux séquences d'ADN contenant chacune une succession de cinq séquences de 5S DNA-

r de l'oursin, longues de 208 bp [107]. Ces fragments sont marqués avec des nucléotides dCTP-biotine au niveau du site libéré par *ClaI*, en présence de 100 μM dGTP, en utilisant l'enzyme Klenow exo^- . Une fraction de ces fragments marqués avec dCTP-biotine sont aussi marqués à leur autre extrémité par dUTP-digoxigénine (Roche), au niveau du site libéré par l'enzyme de restriction *Acc651*.

Reconstitution Des histones recombinantes issues de *Xenopus Laevis* sont exprimées et amplifiées à l'aide des bactéries, et sont purifiées selon le protocole décrit dans [97].

Disposant de l'ADN et des histones séparément, nous pouvons alors reconstituer les NCP. Nous utilisons une technique de dialyse pour mener à bien cette opération. Les fragments d'ADN sont mélangés dans une solution à 2 M NaCl avec les histones recombinantes, dans un rapport de concentration de 1/0.8 [8], afin d'éviter toute agrégation par la suite. Pour ces reconstitutions, nous utilisons environ 1 μg d'ADN marqué par la biotine, et parmi ces fragments, 10-16% sont doublement marqués avec biotine et digoxigénine. La concentration saline est ensuite diminuée pas à pas.

Nous vérifions ensuite que nos NCP ont été correctement reconstituées en utilisant la Mnase et des reconstitutions où l'ADN a été marqué par des nucléotides radioactifs ^{32}P . 100 ng d'ADN libre marqué radioactivement et autant d'ADN impliqué dans une fibre de chromatine reconstituée sont digérés pendant 2 mn dans une solution à 1 mM Ca^{2+} et respectivement 0.03 et 0.1 unité de Mnase.

La digestion est arrêtée par l'addition de 100 μl de solution à 0.2% SDS et 1 μg de protéinase K.

L'ADN est extrait en utilisant la séparation de phase par phénol-chloroforme suivi d'une précipitation avec de l'éthanol. Les fragments résultants sont analysés sur gel d'agarose à 1.5%.

L'échelle type EcoR1 est obtenue en digérant partiellement l'ADN avec 2 U de EcoR1 pendant 1 mn (ligne 1, Fig 2.17).

Avec la nucléoplasmine

S'il est impossible de reconstituer un fibre de chromatine en mélangeant l'ADN et les histones directement dans un tampon physiologique, une telle reconstitution est par contre envisageable en utilisant des protéines chaperons des histones comme NAP1 ou nucléoplasmine et N1 [98][152][70].

Les histones recombinantes sont conservées dans une solution à 1.8 M NaCl, 15% glycerol à une concentration de 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Nous disposons aussi de variants d'histones H2A : H2A Bbd et H2AZ. La nucléoplasmine est conservé dans un tampon de TE 1 \times , 20% glycerol, 150 mM NaCl.

La nucléoplasmine est une protéine connue pour chaperonner un dimère H2A-H2B. Nous avons tenté de reconstituer une fibre de chromatine sur un fragment d'ADN préa-

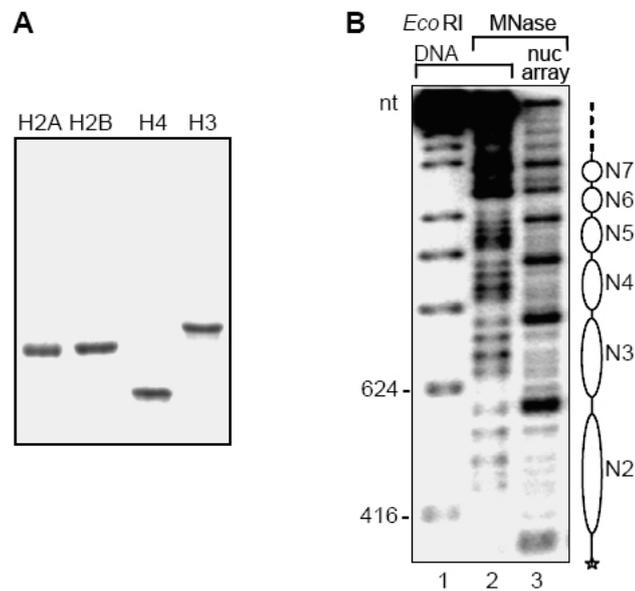


FIG. 2.17 – Analyse de la chromatine reconstituée à partir d’une séquence répétée 5S d’ADN-r. **A** Analyse sur gel SDS-PAGE des histones recombinantes utilisées pour nos reconstitution. **B** Gel d’analyse des fragments d’ADN obtenus après digestion par la Mnase de l’ADN nu utilisé pour la reconstitution (ligne 2) et de l’ADN faisant déjà partie de la fibre de chromatine reconstituée (ligne 3). La position des nucléosomes est indiquée sur la partie droite de la figure. Ligne 1 : Echelle de longueur en bp

lablement introduit dans notre dispositif expérimental, en suivant un protocole similaire à celui employé pour la reconstitution avec l'extrait de *Xenopus Laevis* (cf 2.2.2).

Avant de mélanger les histones et l'ADN pour former une hypothétique fibre de chromatine, nous incubons les histones seules avec la nucléoplasmine pendant 30 mn dans un tampon final de TE 1×, 150 mM NaCl. La concentration finale de l'ensemble des histones varie autour de 30 ng/ μ l et celle de nucléoplasmine autour de 60 ng/ μ l. C'est ce mélange que nous introduisons dans notre cellule d'expérimentation qui contient déjà une molécule d'ADN entre les deux micro-billes.

2.2.3 Chromatine native

Pour obtenir une chromatine fonctionnelle à partir de noyaux d'érythrocytes de poulet, nous procédons en quatre étapes :

- Extraction des noyaux des érythrocytes.
- Découpage en fragment de plusieurs kbp.
- Extraction de la chromatine des noyaux.
- Marquage avec biotine et antidigoxigénine.

Extraction des noyaux d'érythrocytes de poulet

Nous disposons initialement du sang de poulet complet (Charles River Laboratories). La composition du tampon de rinçage est : 5mM PIPES, 150 mMNaCl, 0.5mM AEBSF.

- la première étape consiste en une centrifugation (dilution 1/1 v/v avec le tampon de rinçage, 800 g, 10 mn) visant à laver le sang et à ne récupérer que les globules rouges. Le surnageant est jeté et on ne récupère que le culot. Les globules déjà coagulés apparaissent en noir au fond du culot. Ce phénomène doit être limité et nous devons avoir un maximum de globules bien rouges pour pouvoir poursuivre.
- Deuxième (voire troisième) cycle centrifugation-resuspension dans le tampon de lavage.
- Verser dans un bécher, avec agitateur magnétique.
- ajouter au goutte à goutte du NP40 10× pour faire éclater les cellules. Arrêter dès que la couleur de la solution change du rouge au violet, signe que l'hémoglobine est libérée dans la solution et est oxydée.
- Nouvelle centrifugation (800 g, 10 mn). Les noyaux apparaissent en blanc au fond du culot.
- Enlever le surnageant de couleur rouge et recommencer le cycle centrifugation-rinçage avec le tampon de lavage jusqu'à ce que le surnageant soit complètement incolore.

Découpage

Cette étape est délicate lorsqu'il faut changer de tampon pour celui de la Mnase. Les noyaux risquent à tout moment de s'agréger et de ne plus être fonctionnels pour la suite de l'extraction. Il est possible de détruire les plus petits agrégats en s'aidant d'une pipette.

- Après la dernière centrifugation de rinçage, les noyaux sont resuspendus délicatement dans le tampon de digestion de la Mnase (60 mM KCl, 15 mM NaCl, 15 mM PIPES à pH 7.5, 0.5 mM CaCl₂, 0.25 mM MgCl₂, 0.1 mM AEBSF).
- Un rinçage avec le tampon de Mnase si possible.
- Pré-incuber les noyaux pendant trois minutes à 37°C.
- Ajout de la Mnase à la solution de noyaux, ajustée à une concentration finale de 1U/1 OD₂₆₀. Selon la longueur moyenne voulue des fragments de chromatine, on arrête la réaction de digestion à des temps plus ou moins long (Fig 2.18). Ayant besoin de fragments long de quelques kbp, nous arrêtons la digestion après une minute d'incubation en ajoutant de l'EDTA à une concentration finale de 5 mM.

Extraction de la chromatine

- Les noyaux sont ensuite centrifugés à 400 g, à 4°C, pendant 10 mn.
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot avec précaution, en évitant le plus possible toute agrégation, dans une solution de 1 mM EDTA. Cette solution est laissée 45 mn dans la glace pour laisser les noyaux libérer la chromatine : les membranes nucléaires éclatent par pression osmotique, et la chromatine digérée est libérée.
- Pour se débarrasser des fragments de membranes nucléaires, l'ensemble est centrifugé à 10000 g, à 4°C pendant 5 mn.
- Récupérer le surnageant et le placer dans de nouveaux tubes.

Cette procédure nous permet d'obtenir des fragments de chromatine de grande taille i.e. compris entre 2 kb et 15 kb, avec une majorité de fragments autour de 7 kbp, Fig 2.18.

Marquage

Reste alors encore à marquer ces fragments de chromatine avec de la biotine à leurs extrémités.

- La chromatine est lavé deux fois dans le tampon minimum pour le fonctionnement de la DNA polymérase : 25 mM phosphate de sodium, 0.5 Mm MgCl₂, pH 7.5, en utilisant des micro-filtres : Microcon YM100. Après une douce centrifugation à 400 g, à 4°C et durant environ 25 minutes, l'opération est reprise avec ce qui reste dans le réservoir des microfiltres (contenant la chromatine qui n'est pas passée).
- Pour récupérer la chromatine, les microfiltres sont retournés sur de nouveaux tubes, vides, puis centrifugés à 18000 g, à 4°C pendant 10 mn. Environ 200 µl doivent être

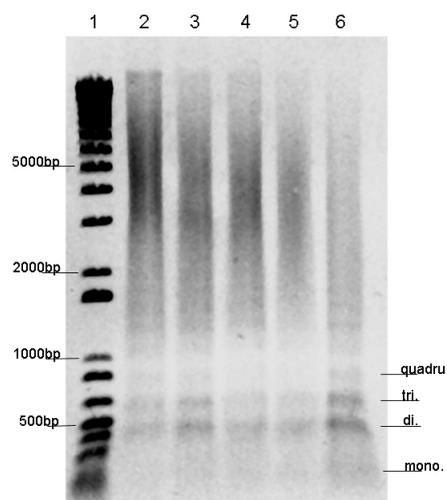


FIG. 2.18 – Gel par électrophorèse de l'ADN recueilli après digestion de la chromatine de noyaux d'érythrocytes de poulet par Mnase. 1, Echelle d'ADN. 2,3,4,5,6, fragments d'ADN après des temps de digestion par la Mnase de la chromatine, respectivement de 30 s, 1, 2, 4 et 10 mn. On distingue un accroissement du nombre de fragments courts (mono et di-nucléosomes) avec le temps de digestion.

récupéré pour espérer ne pas avoir perdu trop de chromatine par adsorption sur le filtre.

Une autre solution pour changer de tampon, est la dialyse des solutions de chromatine. Le principe est le suivant : la solution à 1 mM EDTA contenant la chromatine est placée dans un réservoir fermé par une membrane de dialyse (Spectro/Por®). Aucune bulle d'air importante ne doit se trouver dans ce réservoir. Celui-ci est placé dans un bœcher contenant une grande quantité de solution tampon pour l'ADN polymérase. La membrane sépare donc la solution initiale et le tampon de l'ADN polymérase. Par simple diffusion à travers celle-ci et par dilution, le tampon est remplacé. Le rapport entre les deux volumes est d'au moins mille, et nous attendons au moins deux heures sous agitation douce avant de récupérer la chromatine en suspension dans son nouveau tampon. Cette méthode limite les pertes par rapport à l'utilisation des micro-filtres.

- La concentration en chromatine est mesurée, plus exactement la concentration en ADN, et nous procédons alors à l'étape de marquage proprement dite.
- Les extrémités de l'ADN sont rognées avec la T4-ADN polymérase (Fermentas) puis complétées avec des nucléotides marqués, toujours grâce à la même enzyme : une unité de T4-ADN polymérase par μg de DNA est ajoutée à la solution et incubée 10 minutes à 37°C pour former des extrémités 3' de type simple brin.

- Ensuite, nous ajoutons en excès, à une concentration finale de 100 μM chacun, les nucléotides suivants : biotine 14-dATP, biotine 14-dCTP, dGTP et dTTP (Fermentas). La réaction se poursuit durant 15 mn à température ambiante et elle est arrêtée par l'ajout d'EDTA (5 mM concentration finale).
- Le tampon est à nouveau remplacé par une solution de TE 1 \times (10 mM Tris, 1 mM EDTA), par dialyse ou utilisation des microfiltres.

2.3 Déroulement d'une expérience type

Je ne rapporte dans ce paragraphe que les grandes lignes de notre protocole d'accrochage et d'étirement. Les expériences plus particulières seront décrites au cas par cas le moment venu, dans la partie suivante. L'esprit commun à ces manips est de soumettre une molécule (ADN) ou un complexe moléculaire (chromatine) à une force d'étirement afin d'en tirer une information sur la stabilité des nucléosomes, par exemple, et sur les conséquences mécaniques des modifications diverses qui peuvent l'affecter.

2.3.1 Incubation

Conditions concernant l'ADN et en partie la chromatine

Une fois les préparations biochimiques achevées, pour tester les propriétés élastique de ces molécules il faut les accrocher entre deux billes. Pour cela nous incubons les billes avec l'ADN ou la chromatine à 4°C sous agitation rotative douce, afin que les billes ne sédimentent pas. La durée minimale d'incubation est de l'ordre de l'heure, avec les concentrations que nous utilisons : 0.005% w/v de microbilles et 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ADN environ. Cependant nous prolongeons ce temps d'incubation pendant une nuit lorsque nous travaillons avec des fibres de chromatine (sauf avec la chromatine reconstituée avec l'extrait d'œufs de *Xenopus Laevis*).

Dans la majorité des expériences nous choisissons de fixer l'ADN sur les billes destinées à être maintenues dans le piège, marquées avec streptavidine ($\phi=3.36 \mu\text{m}$, Spherotech). Lors de cette étape il est important de mélanger dans un bon rapport la quantité de fragments d'ADN et la quantité de billes. Si ce rapport est trop grand, on risque de fixer systématiquement plusieurs molécules entre nos deux billes, si il est trop petit, le temps d'attente avant d'avoir une molécule d'ADN à étirer risque d'être très (trop!) long : plusieurs minutes et au-delà. Bien entendu le nombre de molécules qui se fixent sur les billes est une fonction croissante avec le temps, et cet effet se manifeste très clairement expérimentalement : quelques difficultés à accrocher les billes après 1 h d'incubation, mais en revanche une grande facilité d'accrochage après quelques jours, voire même un multi-pontage trop fréquent.

Procédure particulière d'augmentation de la concentration en chromatine exogène.

Afin d'étudier l'effet que peut avoir la forte dilution des fibres de chromatine dans les expériences de type molécule unique, nous avons augmenté la concentration en chromatine exogène (qui n'est pas susceptible d'être étirée, car non marquée), en suivant deux protocoles détaillés ci-après. L'idée étant que les fibres de chromatine destinées à être étirées soient diluées le moins de temps possible avant leur étirement.

Les solutions stock de chromatine sont concentrées avec une $OD_{260} \geq 2$. Le problème de la dilution se pose donc dans les phases de préparation suivantes : l'accrochage de ces fibres aux billes, et l'injection dans la cellule d'expérimentation.

Augmentation globale de la concentration en chromatine Ce qui peut sembler le plus simple pour augmenter la concentration en chromatine exogène est d'ajouter celle-ci au mélange de billes et de chromatine marquée. C'est ainsi que nous avons procédé dans le cas de la chromatine native issue d'érythrocyte de poulet : nous réalisons une solution billes + chromatine marquée dans les conditions classiques (cf 2.3.1) tout en ayant augmenté auparavant la concentration en chromatine exogène à l' OD_{260} voulue. Cependant il est difficile d'aller au-delà d'une OD_{260} égale à 2 à cause des problèmes d'adhésion non spécifique de ces fibres de chromatine exogène sur les billes : nous rencontrons alors des difficultés pour l'accrochage des fibres marquées.

Pour la chromatine reconstituée sur une séquence répétée 5S d'ADN-r d'oursin, nous avons procédé un peu différemment. Ne disposant pas toujours de fibres reconstituées non marquées, nous mélangeons les billes (marquées avec streptavidine) à une concentration finale de 0.05%w/v (soit 100 fois plus élevée que de coutume) dans la solution stock, concentrée en fibres de chromatine. Avec une solution à 1 M NaCl nous ajustons la concentration saline de cette solution à 100 mM NaCl. Ceci favorise l'accrochage streptavidine (bille)- biotine (chromatine) et réduit la dilution de la solution, nécessaire pour ajuster la concentration saline. Le rapport concentration de billes/concentration de chromatine est donc conservé, et la concentration en chromatine reste autour d'une $OD_{260}=2$ pendant la durée d'incubation (\sim une nuit).

Ce n'est qu'une fois prêts à injecter ces fibres pour les étirer que nous diluons une partie de ce mélange et que nous l'introduisons immédiatement dans notre cellule d'expérimentation.

Augmentation locale de la concentration en chromatine Augmenter la concentration en chromatine exogène pose des problèmes d'adhésion non spécifique de ces fibres sur les billes. D'autre part, lorsque nous étudions la chromatine reconstituée sur une séquence répétée 5S, nous ne disposons pas dans un premier temps de fibres non marquées. Ceci était un problème si nous voulions accroître la concentration en chromatine dans le

milieu selon une procédure analogue à celle suivie pour les fibres issues de noyaux d'érythrocytes de poulet : nous nous retrouvons avec des billes saturées en fibre de chromatine, et il est alors quasi-impossible d'éviter les pontages multiples lors de la phase d'étirement.

Nous avons alors utilisé des solutions composées de $1/20^{\text{ième}}$ de fibres reconstituées doublement marquées, les autres $19/20^{\text{ième}}$ étant des fibres reconstituées marquées seulement à l'une de leur extrémité par de la biotine. En utilisant ce mélange avec nos billes, nous réduisons les chances de pontages multiples, mais nous accroissons aussi la concentration locale en chromatine près de la bille.

2.3.2 Accrochage proprement dit

La première étape consiste à amener une bille sans ADN et marquée avec anti-digoxigénine à l'embouchure de la micropipette. Nous utilisons pour cela la pince optique comme simple convoyeur de bille. La bille est ensuite maintenue fixe par succion avec une seringue reliée à la micropipette. Nous changeons alors de réservoir de billes et nous injectons les microbilles sur lesquelles l'ADN ou la chromatine a été préalablement fixée. Nous piégeons l'une de ces billes et l'aménonas quasiment au contact de la bille tenue par la micropipette. Si les concentrations et les temps d'incubations ont été bien ajustés, en attendant quelques secondes avec les deux billes à quelques centaines de nm l'une de l'autre, puis en les éloignant, il est possible de vérifier qu'une seule molécule a été suspendue entre elles.

Lorsque nous travaillons avec l'ADN, la solution réservoir peut contenir une grande concentration de billes sans que cela ne soit gênant pour nos expériences. Une fois que nous avons piégée une de ces billes, les autres (qui pourraient être elles aussi capturées et parasiter notre expérience), sont emportées en appliquant un flux hydrodynamique d'une solution ne contenant qu'un simple tampon.

Avec la chromatine par contre, nous essayons d'appliquer le moins de contraintes possible. Nous travaillons avec des solutions de billes très diluées : ainsi, nous n'avons pas à appliquer de flux hydrodynamique une fois que nous avons piégé une bille couverte de chromatine. La contre-partie est parfois une recherche plus longue (\sim mn) de cette bille à piéger.

2.3.3 Etirement

Lorsque nous tirons sur la chromatine, nous tirons par pas discrets. Ceci nous permet de réaliser des acquisitions à plus haute fréquence, autour de 1 kHz en moyenne. En effet, pour opérer des étirements en continu, nous utilisons une technique de type PI (proportionnelle-intégrale). Néanmoins cela suppose une discussion en continu entre l'ordinateur qui fixe les consignes et la carte de pilotage de la platine piézo-électrique qui doit donner en continu la position de la platine (en fait la tension appliquée à la platine).

Cette communication est faite par le port série donc avec un faible débit : La fréquence d'acquisition tombe à quelques Hz.

Nous avons vérifié que les profils d'étirements de l'ADN ou de la chromatine ne différaient pas selon le mode d'étirement. Si la réponse à la consigne de la platine piézo est rapide ; de l'ordre de la ms, les contraintes subies par la molécule étirée avec un tel taux de charge sont négligeables tant que l'amplitude du pas n'excède pas l'amplitude des oscillations browniennes de la bille. La plupart du temps nous avons travaillé avec des pas d'amplitude 5 nm, allant parfois jusqu'à 10 nm, ou dans l'autre sens 1 nm. Mais l'amplitude des pas doit rester nettement inférieure à une longueur de l'ADN nucléosomal pour pouvoir détecter le signal qui nous intéresse : celui de la rupture de nucléosomes individuels.

Chapitre 3

Étirements d'ADN : Résultats et discussion

Dans cette section, nous exposons nos résultats obtenus en étirant diverses molécules d'ADN. Ce furent les premières molécules dont nous avons sondé les propriétés élastiques, d'une part parce que c'était un moyen de tester notre montage, leur réponse à une contrainte mécanique étant bien établie. D'autre part, car c'est finalement sur ce substrat, en association avec des histones, que nous allons être amenés à tirer : la bonne connaissance de la réponse du substrat seul est donc aussi primordiale et permet d'éviter de confondre des signaux propres à la molécule d'ADN (Typiquement l'hystérésis sur plateau B-S) avec d'autres propres à l'association ADN-histones.

Les résultats que nous mentionnons à propos de la transition B-S de l'ADN ont été établis en tirant les molécules par les extrémités 3' dans des tampons physiologiques : PBS 1× ou TE 1×, 100 mM NaCl.

3.1 Résultats

3.1.1 $F \leq 60$ pN

Pour une gamme de force inférieure à 60 pN, le comportement sous étirement de la molécule double brin d'ADN est bien décrite par le modèle dit "du ver" (cf 1.3.3). Pour vérifier la validité de notre montage expérimental, puis pour vérifier qu'une unique molécule d'ADN est bien attachée entre nos billes, nous avons comparé les courbes expérimentales force-extension au modèle théorique WLC approché [100], et extrait les paramètres : longueur de persistance, L_p et module de courbure B (Fig 3.1). Mais la procédure d'ajustement est très sensible, et pour une partie de nos étirements c'est plutôt le décrochage en un seul coup de la molécule qui nous assurait que nous avions bel et bien une seule molécule.

Avec de l'entraînement, nous pouvons aussi discerner les cas où une seule et plusieurs molécules d'ADN pontent les billes : l'allure du profil d'extension est très différent, et la longueur curvilinéaire apparente de la molécule peut différer (voir aussi [38]). Nous pouvons estimer cette longueur curvilinéaire en mesurant la distance séparant les centres des deux billes et en retranchant la somme des rayons des billes.

3.1.2 Plateau B-S

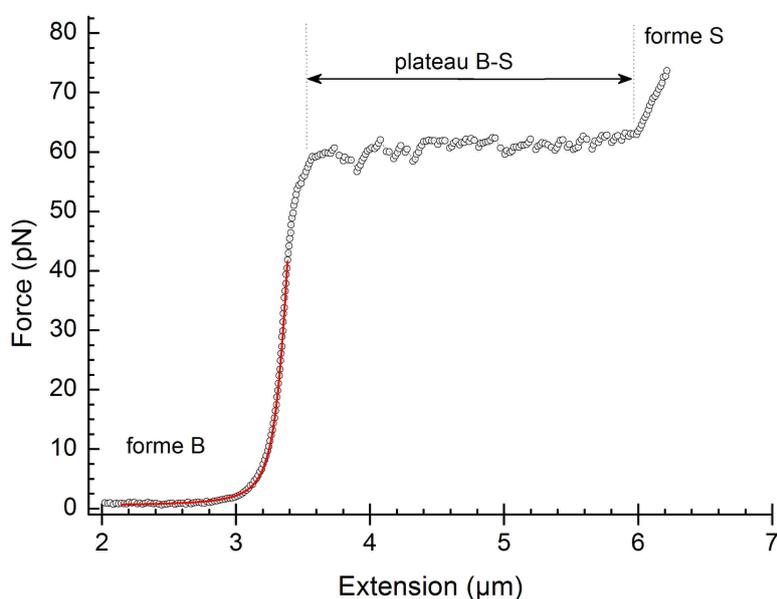


FIG. 3.1 – Profil d'étirement d'une molécule d'ADN fragment de phage λ de ~ 10 **kbp**. Courbe rouge, ajustement du modèle WLC modifié proposé dans [157] à nos données (cf eq. 1.3.29). $L_p = 45nm, S = 2050pN$. A partir de 60 pN, un faible accroissement de la force engendre une extension importante de la molécule : Jusqu'à 70% de sa longueur curvilinéaire de sa forme B. L'état qui suit ce plateau est communément appelé forme S de l'ADN

Le plateau de transition B-S de l'ADN apparaît bien dans la gamme de force attendue (Fig 3.1), entre 60 et 70 pN [132][38], ce qui confirme notre procédure de mesure de force. Nous ne pouvons pas étirer toutes les molécules d'ADN jusqu'à cette gamme de force, une partie d'entre elles se détachant avant. Cette fragilité peut avoir de multiples origines : marquage non spécifique de la streptavidine ou de l'antidigoxigénine sur la surface des billes (liaison non covalente), mauvaise qualité des extrémités marquées de l'ADN, présence de cassures plus ou moins nombreuses le long du squelette phosphaté

de l'ADN, ou faible nombre de liens entre l'ADN et les billes. Nous pouvons atteindre ce plateau B-S pour 1 molécule sur 10 environ, selon les multiples paramètres expérimentaux, ce qui est suffisant.

Si la molécule est correctement arrimée, nous pouvons exercer des forces supérieures à 100 pN, avec 1.4 W en sortie de laser mais 300 mW au maximum au niveau de la bille, compte tenu des pertes sur le chemin optique (Fig 2.5) et aussi à la traversée de l'objectif. Nous pouvons donc dépasser le plateau de transition B-S complètement et comparer son amplitude avec la longueur curvilinéaire de l'ADN sous sa forme B, classique. Nous retrouvons un allongement compris entre 60 et 70% entre la forme B et la forme étirée, S, en fin de plateau (Fig3.1).

3.1.3 Profils particuliers des plateaux de transitions

La première molécule d'ADN que nous avons étirée est de type M13mp18, constituée de 7252 bp, de longueur curvilinéaire 2465 nm, dans sa forme B. Le plateau B-S de cette molécule est très irrégulier, en dents de scie. Ces variations de force sur le plateau se détachent nettement du bruit, et leur amplitude peut dépasser 5 pN dans le cas de la molécule M13mp18. Ce signal particulier, peu mentionné jusqu'alors [119][122][163], nous a intrigué et nous avons continué à l'étudier en parallèle avec nos expériences portant sur la chromatine. Nous avons enregistré ces profils d'étirements sur des molécules d'ADN très diverses (Tab 3.1) :

Désignation	bp	longueur (μm)
M13mp18	7252	2.466
Phage λ tronqué	10086	3.424
pBR322	4361	1.483
pcDNA3.1/HisA,B,C	5515	1.875
Plasmid p2085S-G5E4	2539	0.863

TAB. 3.1 – Noms et tailles des molécules d'ADN étudiées.

Profil des plateaux

Sur l'ensemble de ces molécules d'ADN, l'extension des plateaux de transitions est comprises entre 60% et 70% de la longueur curvilinéaire de la même molécule sous sa forme ADN-B. Dans nos conditions (cf p.87), ces profils ont un autre caractère commun : ils présentent tous un net hystérésis entre l'étirement et la relaxation. Dans le diagramme force-extension, le plateau de relaxation est toujours sous le plateau d'étirement.

En revanche l'allure du plateau varie d'un type de molécule à l'autre (Fig 3.2).

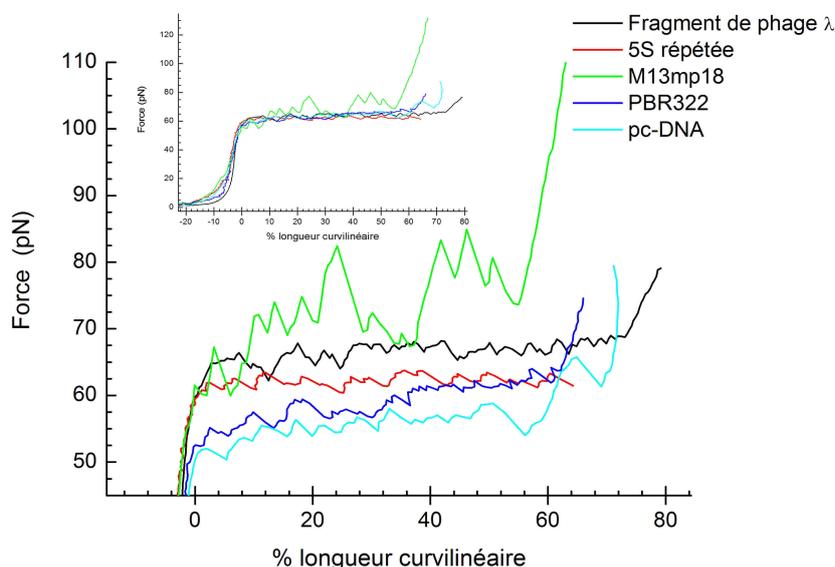


FIG. 3.2 – Plateaux B-S des profils d'étirements de molécules d'ADN de différentes origines. En insert, les profils complets.

Influence du taux de charge

Nous avons étudié l'influence du taux de charge sur la position de ce plateau, en le faisant varier entre 5 et 40 pN s^{-1} . Conformément à [37], sur cette gamme, certes un peu restreinte, le taux de charge ne modifie pas la force critique à laquelle commence le plateau, soit ~ 65 pN. Seuls les détails du plateau deviennent nettement moins visibles quand on tire rapidement sur la molécule.

De la même façon, selon que l'étirement est fait pas à pas ou en continu, le plateau apparaît toujours pour la même force (Fig 3.3).

Reproductibilité des profils et séquence d'ADN

En tirant successivement sur une même molécule d'ADN, le profil du plateau est reproductible. Cette reproductibilité est illustrée avec la figure (3.4), et concerne tant l'étirement que la relaxation.

Devant une telle reproductibilité nous avons commencé à nous intéresser à l'effet de la séquence de l'ADN sur ces profils [119]. En effet, nous avons aussi remarqué par la suite que, si un profil d'étirement était propre à une molécule, une autre molécule du même type (i.e. avec la même séquence) possédait un profil d'étirement très similaire (si ce n'est identique (Fig 3.5)).

Pour mettre clairement en évidence le lien entre profil et séquence, l'idée était la suivante : synthétiser des multimères des molécules pBR322 ou M13mp18 (ce que nous

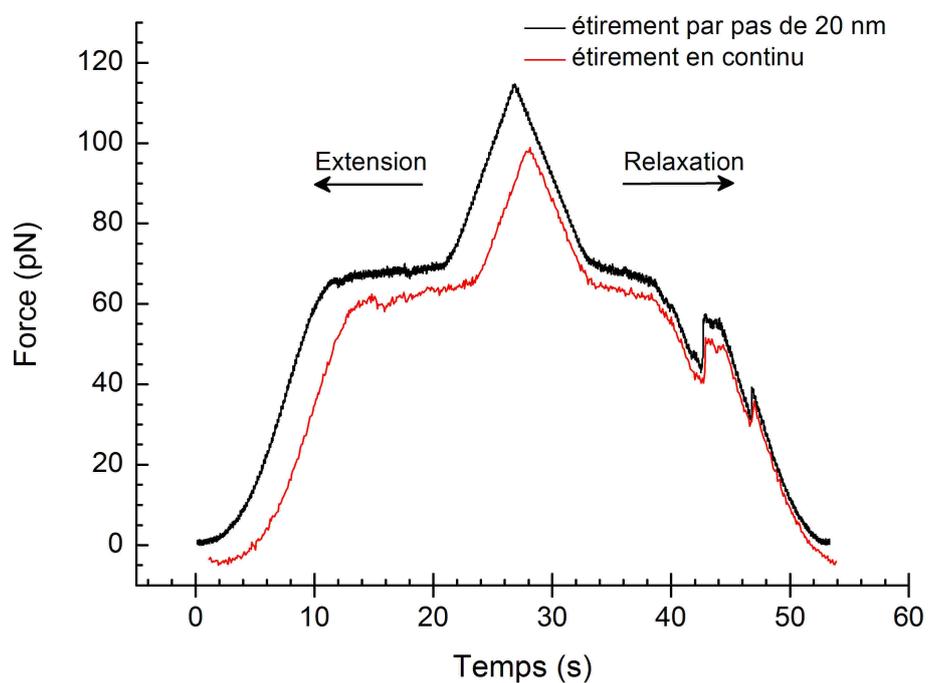


FIG. 3.3 – **Étirement par pas discret et en continu, comparaison.** *En noir, étirement par pas de 20 nm. Vitesse d'étirement moyenne : 120 nm s^{-1} . Nous pouvons distinguer quasiment chaque pas lorsque les pentes Force/temps sont importantes. En rouge, étirement sur la même molécule, mais de façon continue cette fois et avec la même vitesse d'étirement : 120 nm s^{-1} . Les détails essentiels apparaissant sur le plateau de transition B-S sont conservés entre les deux modes d'étirements. Cette dernière courbe à été décalée pour une meilleure lisibilité.*

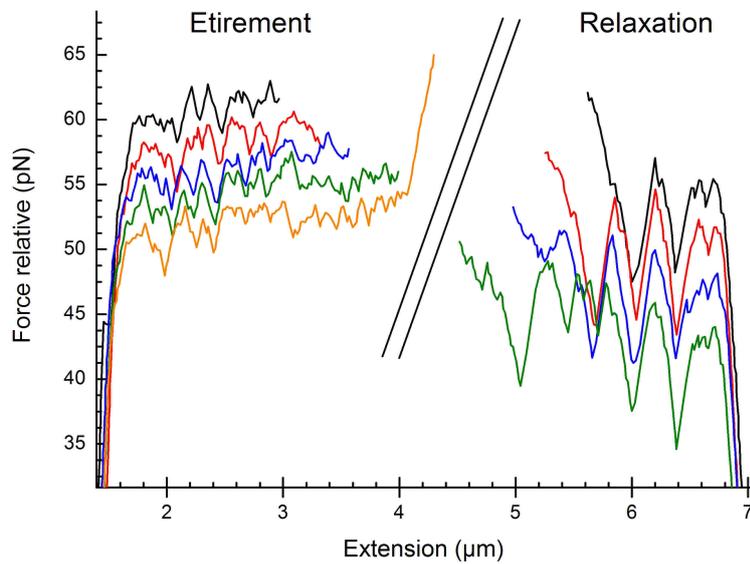


FIG. 3.4 – Profil de plateau de transition B-S obtenus après étirement successifs sur un même fragment molécule d'ADN de phage λ . La molécule a été coupée avec l'enzyme de restriction *Bsp120I*. Noter la grande reproductibilité du profil du plateau de transition, tant lors de l'extension que lors de la relaxation de la molécule.

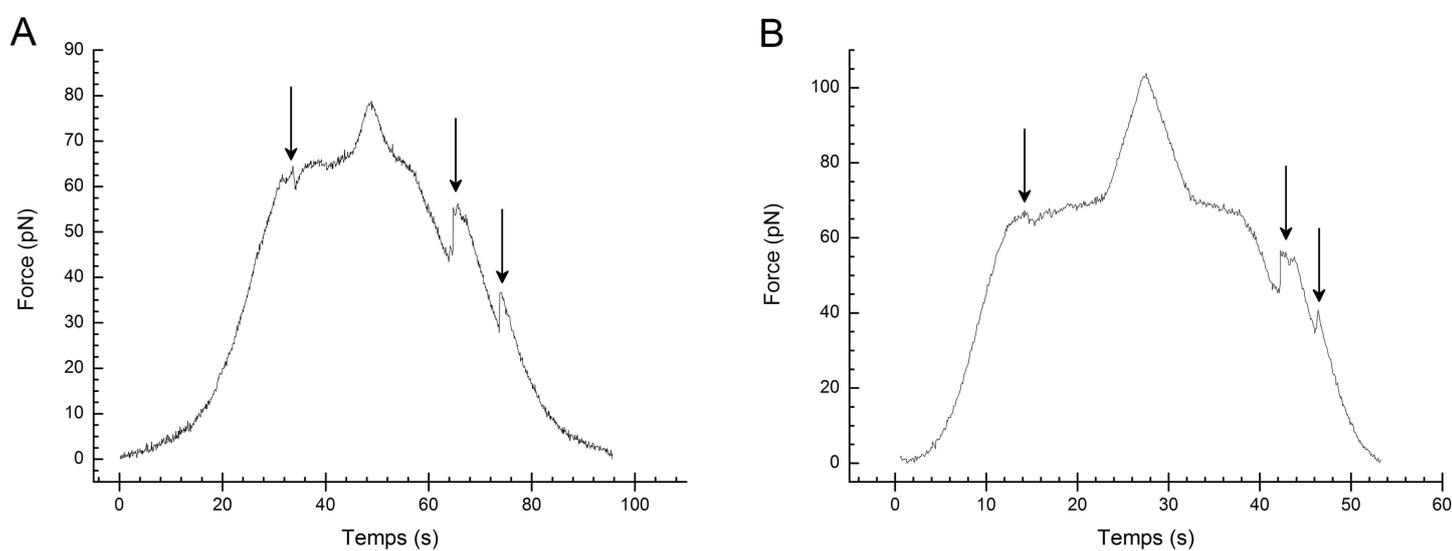


FIG. 3.5 – Étirement continu sur deux molécules d'ADN type pc : à 60 nm s^{-1} (A) et 120 nm s^{-1} (B). Ces étirements, enregistrés à deux jours différents, illustrent bien les caractères communs (flèches) des plateaux de transition, pour un type de molécule d'ADN. Ce n'est pas le cas pour toutes les molécules d'ADN d'un même type, certainement à cause des défauts, des brisures dans le squelette phosphaté parfois rencontrés sur ces molécules (Fig 3.8).

appelons "multimères de pBR322" (ou M13mp18), par exemple, est une molécule d'ADN linéaire composé d'une succession de séquences de pBR322 ; de tels multimères sont obtenus en ajoutant une ADN ligase dans une solution d'ADN pBR322 coupé par une enzyme de restriction.) et analyser le dessin du plateau de transition. Nous espérons alors distinguer une structure répétée sur le profil de plateau B-S qui correspondrait à celles enregistrée pour les monomères de ce type de molécule, mais nous n'avons pas encore de résultats concluants. Nous pensons que la trop grande taille de la molécule d'ADN de base (7252 bp et 4361 bp pour M13mp18 et pBR322 respectivement) et aussi du multimères final nous empêche de voir une régularité dans la structure du plateau : celle-ci est gommée par le bruit thermique sur une molécule aussi longue.

Cependant, c'est lors d'un simple test, en tirant jusqu'au plateau B-S sur un ADN destiné à une reconstitution de chromatine qu'à resurgi l'idée d'étudier une séquence d'ADN répétée. En effet, cette molécule (plasmid p2085S et cf section 2.2.2) comporte une même séquence répétée dix fois, beaucoup plus courte : la séquence 5S d'ADN-r d'oursin, positionnant l'octamère d'histone et longue de 208 bp. Dans ce cas le profil du plateau B-S est encore accidenté (Fig 3.6) mais plus régulièrement que pour les multimères de longues molécules dont la séquence est, au total, nettement moins répétée ; les multimères sur lesquels nous avons le plus de données sont des di-, tri- ou quadru-mères.

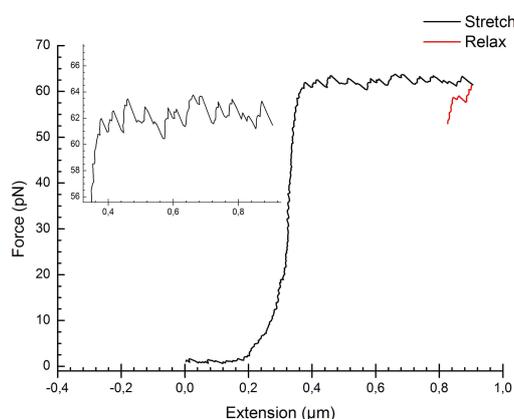


FIG. 3.6 – Profil d'étirement d'une séquence répétée de 5s ADN-r d'oursin.

Sur trois molécules différentes de plasmid p2085S, nous avons mesuré un allongement moyen de $60\% \pm 2\%$ de la phase S (fin de plateau) par rapport à la phase B. D'autre part nous avons mesuré l'extension obtenue pour chaque pic principal que l'on distingue sur le plateau B-S. Après ajustement avec une gaussienne, nous obtenons une valeur moyenne de ces extensions de $41 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ (SD). Cet allongement correspond à celui d'une séquence de longueur $41/0.6 \text{ nm}$ dans la phase B, soit une séquence contenant $41/(0.6 \times 0.34) = 201 \pm 10 \text{ bp}$. Ce résultat est compatible avec le nombre de paires de base qui compose la

séquence d'ADN-r 5S : 208 bp. Cette approche préliminaire suggère qu'on peut détecter la contribution au passage de la phase B à la phase S de chaque séquence élémentaire 5S, et que ces pics sont bien des signatures de la séquence de nucléotides.

Hystérésis et retour à la forme ADN-B

Nous avons aussi porté un intérêt particulier à la phase de relaxation, qui peut nous fournir des informations sur la nature du passage de la forme B à la forme S de l'ADN. D'une part, pour observer cet hystérésis, il n'est pas nécessaire de tirer au-delà du plateau B-S. Même si nous arrêtons l'étirement dans une position intermédiaire sur le plateau, la relaxation qui suit présente un net hystérésis (Fig 3.4).

Nous avons aussi observé que le plateau B-S de certains types de molécules n'était pas complètement hystérétique (Fig 3.7). Deux phases se détachent nettement : l'une sans hystérésis au retour, qui arrive en première lors de la relaxation, suivie d'une partie hystérétique, avant de rejoindre la courbe d'étirement de l'ADN-B.

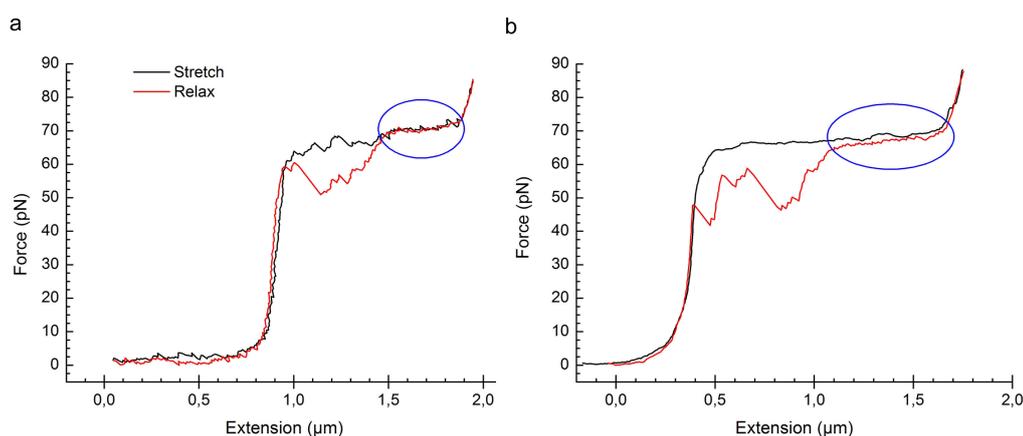


FIG. 3.7 – Profil d'étirement d'un ADN type pBR322 (a) et pc-DNA His-A,B,C (b). Nous distinguons sur ces deux plateaux B-S deux parties distinctes : l'une sans hystérésis (ellipses bleues) et l'autre avec.

Il arrive parfois que la molécule présente des cassures dans son squelette sucre-phosphate. En ce cas les courbes d'étirement sont modifiées, mais ne sont pas dénuées d'intérêt pour l'étude de ce changement de forme B-S. La Fig (3.8) illustre un de ces cas que nous avons rencontré sur une molécule type pc-DNA. Au premier étirement, le plateau B-S se déroule normalement mais déjà nous ne retrouvons complètement la forme B que pour une force avoisinant 10 pN lors de la relaxation, ce qui est inhabituel dans nos conditions. D'autre part l'hystérésis entre étirement et relaxation est présent tout le long du plateau B-S alors que ce n'est pas le cas avec la plupart des autres molécules de ce type (Fig 3.7, b)).

Les profils des deux étirements suivants sont singuliers et trouvent une explication dans la perte d'une partie d'un des brins. Dès le deuxième retour nous constatons que la relaxation ne se superpose pas à la courbe d'étirement, même pour des forces de 10 pN. Ces cycles extension-relaxation s'accompagnent au bout du troisième étirement d'une nette réduction de la longueur du plateau B-S qui n'atteint plus que 38% de la longueur curvilinéaire de la molécule au troisième étirement, (Fig 3.8, c)).

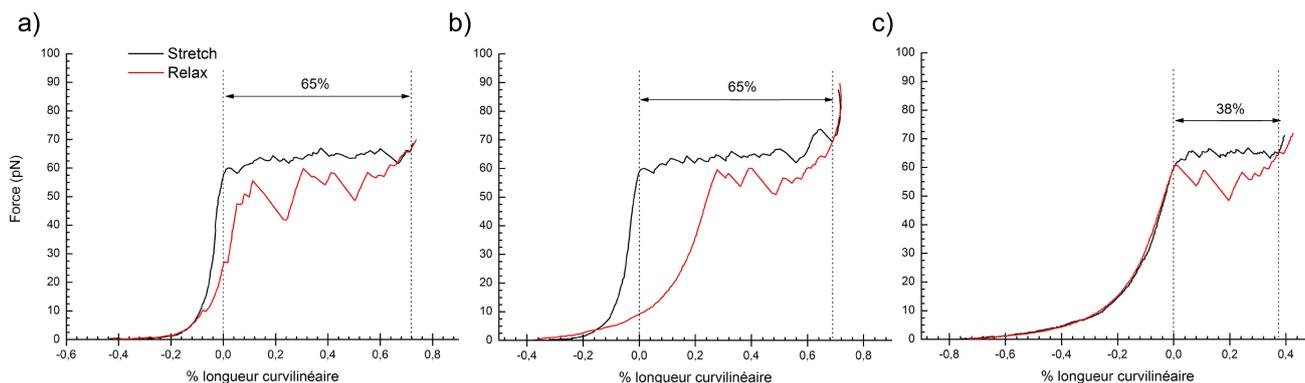


FIG. 3.8 – **Succession de profil d'étirement.** Ces séquences étirements-relaxation ont été produits successivement à partir de la même molécule d'ADN (type pc) endommagée. Voir la Fig 3.12 pour l'interprétation.

Mais nous avons continué à tirer sur cette molécule d'ADN incomplète. Nous en avons profité pour étudier cet hystérésis, et plus particulièrement les délais nécessaires au retour vers la forme B lors de la relaxation (Fig 3.9).

La transition B→S semble toujours suivre un chemin identique, mais il arrive parfois que le passage S→B se fasse selon des chemins différents (Fig 3.5) : plutôt que de transiter plus ou moins régulièrement de S→B en suivant un simili plateau pour une force moyenne inférieure au plateau B→S, la transition est parfois brutale, et la molécule retrouve sa forme B en une seule fois (Fig 3.9, ellipses bleues).

Toujours sur cette molécule particulière, après avoir été étirée jusqu'à la forme S puis détendue pour être soumise à une force inférieure à 60 pN (et parfois même inférieure à la valeur moyenne du plateau S→B), nous pouvons attendre plus de 10 s sans pour autant détecter le moindre début de transition (Fig 3.9, b)). Pensant à un problème de nucléation de forme B, nous avons effectué le même type d'expérience en fixant l'extension alors que le plateau de S→B avait commencé. Mais à nouveau, une fois l'extension entre les billes fixée, l'ADN se fige dans un état intermédiaire entre la phase S et la phase B sans évoluer pour autant, et ce, sur des temps de plusieurs secondes (Fig 3.9, d)).

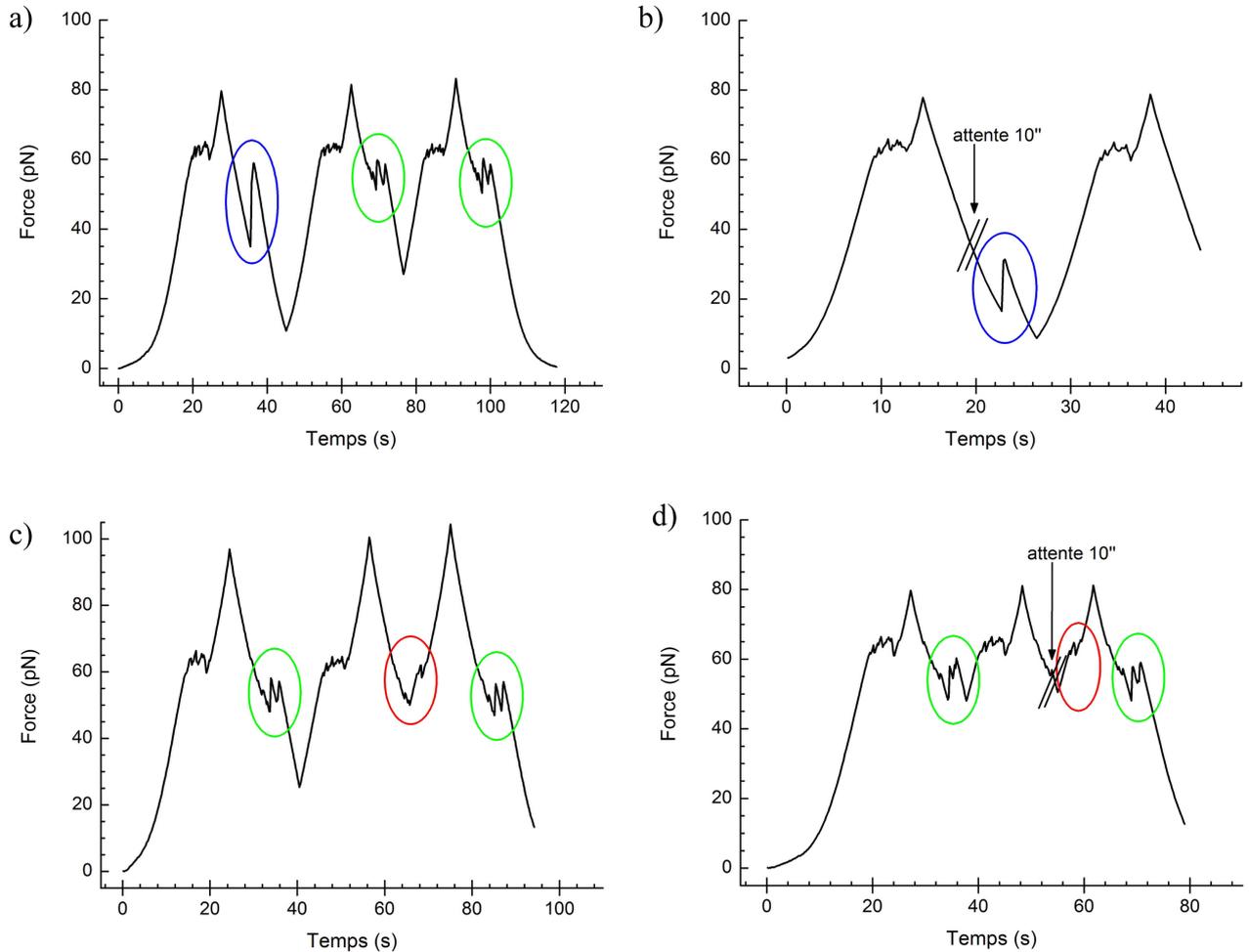


FIG. 3.9 – Différentes voies de retour du plateau B-S. Succession de cycles étirement-relaxation effectués sur une molécule d'ADN pc dans un tampon physiologique de PBS1×. Cette molécule n'est pas intacte (cf Fig 3.7) mais nous avons remarqué ainsi que la relaxation pouvait suivre diverses voies : une voie "classique", où nous pouvons distinguer deux pics majeurs dans le profil d'extension (ellipses vertes) ; et une autre voie où l'ensemble de la molécule transite d'un seul coup de la phase S vers la phase B (ellipses bleues). D'autre part, nous pouvons noter que le passage de la phase S à la phase B se fait pour une force inférieure à celle nécessitée pour la transition dans l'autre sens, et peut être suspendue pendant un temps de l'ordre de la dizaine de secondes à des forces inférieures à celle du plateau B→S (ellipses rouges).

3.2 Discussion

Comme nous l'avons évoqué dans la partie introductive (cf 1.3.3), les expériences de micromanipulation de molécule unique et la découverte de nouvelles structures de l'ADN lorsqu'il est soumis à des contraintes en tension [38][132] et/ou en torsion [4][90] ont suscité un fort engouement : en faisant varier les conditions de sels et de pH [164][159], en jouant sur la manière dont est attachée l'ADN aux billes [126], en faisant varier la séquence [37], ainsi qu'en jouant à la fois sur la tension et la torsion de l'ADN [90][29] ; et pour interpréter les résultats de ces expériences [1][126][82][81][123][39]. Deux catégories principales de modèles ont été proposées (Fig 3.10) pour décrire la transition B-S. Nous nous proposons d'interpréter nos résultats dans le cadre de ces modèles.

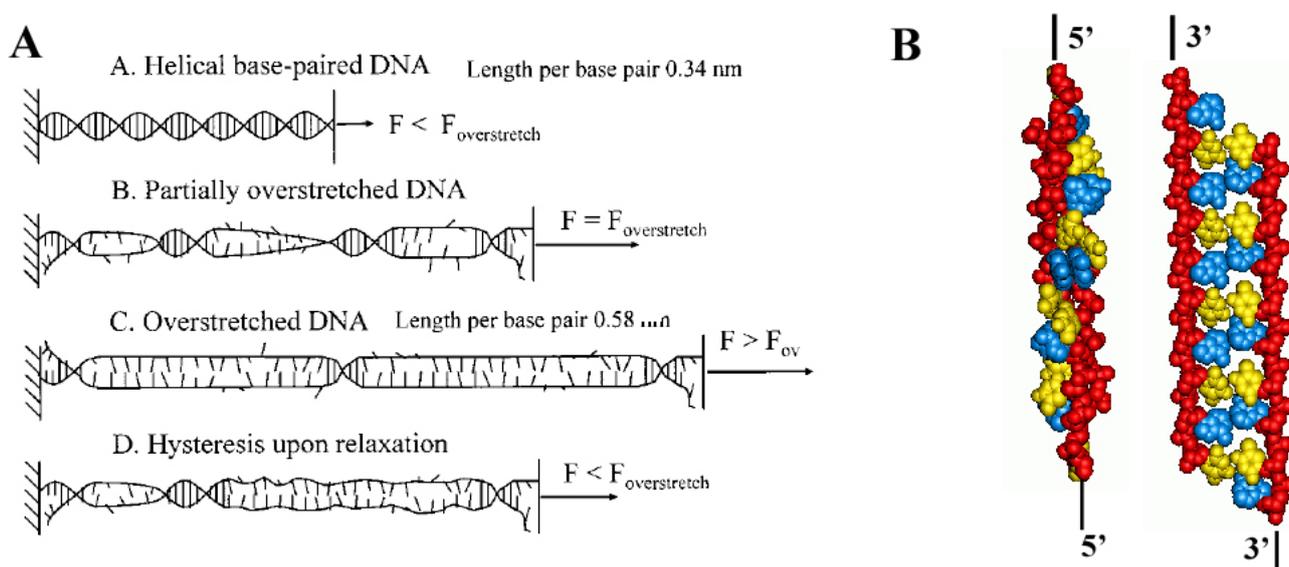


FIG. 3.10 – **Interprétations du plateau B-S.** Pour expliquer ce plateau B-S dans les profils force-extension des molécules d'ADN, les modèles de types WLC ne sont plus suffisant, il faut faire appel à la structure de la molécule d'ADN. **A** Modèle proposé par Williams & coll. [163] permettant d'interpréter l'ensemble de leurs données collectées après une étude approfondie de cette transition en fonction des conditions salines [159], de pH [164] et de température [165]. Les paires de bases sont bien dissociées dans la phase S et dans ce modèle thermodynamique, c'est la force qui pilote la transition. **B** Premières simulations numériques tentant d'interpréter le passage de la phase B à la phase S par un changement de structure [82]. Selon que la molécule est étirée par ses extrémités 3' ou 5', la structure varie globalement peu. C'est en fait essentiellement le pas de l'hélice qui changerait, les bases des deux brins restant appariées par leurs liaisons hydrogène et l'essentiel du travail à fournir pour passer d'une forme à l'autre serait dépensé dans la modification de l'énergie d'empilement entre les bases consécutives (voir aussi [132]). Dans ce cas nous n'avons plus affaire à une transition de phase proprement dite.

Un caractère important à maîtriser pour comprendre ce qui se passe lors de cette transition pilotée par la force est la libre rotation ou non de la molécule d'ADN sur elle-même ou non. En effet, si la molécule est attachée à au moins une de ses extrémités par un seul brin, ou si il existe une cassure dans son squelette sucre-phosphate, alors le plateau B-S se produit autour de 65 pN. Par contre, le profil d'étirement d'une molécule sans défaut et attachée par les deux brins à ses deux extrémités montre un plateau lui aussi, mais pour une force autour de 110 pN [90] [37] ; dans ce cas, il n'y pas d'hystérésis entre les phases d'extension et de relaxation de la molécule contrainte en torsion. Nous discuterons par la suite essentiellement des expériences menées sur des molécules d'ADN libres en torsion, ce qui est le cas de nos expériences.

3.2.1 Modèle de Cluzel & coll.

Ce modèle est l'un des premiers proposés pour expliquer le plateau B-S : par un changement de structure de l'ADN. Dans ce modèle, les deux brins restent appariés par leur bases complémentaires. Puis, selon que l'on tire sur les extrémités 3' ou 5', les simulations de dynamique moléculaire montrent, respectivement, une structure en forme d'échelle ou d'hélice dont le pas a été modifié (Fig 3.10, B) [82].

3.2.2 Modèle de Williams & coll.

Dans ce modèle, c'est la force qui pilote la transition entre un ADN double brin de forme B et deux brins d'ADN au voisinage l'un de l'autre, localement encore appariés, notamment dans des régions riches en C-G.

Les auteurs distinguent deux étapes dans leur modèle ; La première consiste en une transition à l'équilibre lors de laquelle des domaines d'ADN-S sont nucléés puis étendus pour une force de 65 pN. Au-delà du plateau B-S, nous avons affaire à un processus hors-équilibre lors duquel les régions d'ADN encore appariées sont détruites et les deux brins sont séparés, à partir de 68 pN et jusqu'à plus de 150 pN, selon le taux de charge.

3.2.3 Interprétations

Plateau B-S, étirement

En conditions de sels et de pH données, et quelle que soit la vitesse de l'étirement, le plateau B-S se manifeste toujours pour la même force. C'est donc un processus à l'équilibre, la molécule répond immédiatement à la contrainte imposée. Les deux modèles proposés précédemment satisfont cette condition.

Plateau B-S, relaxation

L'hystérésis constaté lors de la relaxation est par contre plus difficile à interpréter dans le cadre d'un modèle où seul l'agencement interne de la molécule est affecté par l'étirement alors que les bases restent appariées [163]. La nature des processus de changement de structure étant la même pendant l'extension que pendant la relaxation, la molécule devrait encore répondre immédiatement (à l'échelle des temps du laboratoire) et quasiment aussi rapidement que pendant l'extension. Nous ne devrions donc pas observer d'hystérésis. C'est effectivement le cas dans les expériences d'étirements où la molécule est contrainte en torsion. Dans ce cas un plateau est observé à 110 pN mais aucun à 65 pN. Les résultats [90][37][29] ainsi que des considérations théoriques [90][126] suggèrent d'ailleurs un diagramme des structures de l'ADN en fonction des paramètres couple et torsion, mais valable pour un ADN ayant ses deux extrémités fixées par les deux brins.

Si nous avons affaire à une transition impliquant un désappariement partiel, les domaines désappariés lors de la phase d'extension doivent ensuite se réappairier de façon correcte lors de la phase de relaxation : la molécule ne répond pas à la même vitesse que pour le processus de désappariement : il lui faut plus de temps pour explorer et trouver la conformation la plus stable en ADN B. C'est pour cette raison que le passage S→B se fait à une force plus faible qu'à l'étirement.

Plateau B-S et séquence d'ADN

La séquence joue elle aussi un rôle important, comme l'ont montré les expériences d'étirements de molécule avec un AFM [119][37]. Tout d'abord le plateau B-S se manifeste à des forces seuil différentes selon que l'on tire sur un ADN poly(dA-dT) ou un ADN poly(dC-dG) : 35 pN pour le poly(dA-dT) contre 65 pN pour le poly(dC-dG).

Pour un poly(dA-dT) la deuxième phase (après le plateau B-S), interprétée comme une phase d'éloignement des simples brins dans le modèle de Williams & al., n'apparaît pas. Celle-ci existe en revanche pour un poly(dC-dG) [37] et est sensible au taux de charge, ce qui fait penser à un phénomène hors-équilibre. D'autres expériences indiquent qu'au delà du plateau B-S, les simples brins ont tendance à se séparer [119]. Avec des constructions d'ADN particulières de poly(dC-dG) ou de poly(dA-dT), Rief & al. ont mis en évidence la formation de structures en épingle à cheveux dues à l'appariement d'un brin d'ADN avec lui-même [119] (Fig 3.11).

Ceci se produit lorsque la molécule est étirée une première fois au-delà du plateau B-S : les brins commencent à se désappairier. En relaxant la molécule, les deux brins ne s'apparient pas immédiatement complètement et sont piégés dans un état intermédiaire constitué par des appariements des brins avec eux-mêmes, (Fig 3.11). Avec l'étirement suivant, ce sont ces structures qui sont détruites. Très semblables à des expériences de dégrafrage d'ADN [51] ou d'ARN [94][64], les forces ainsi déterminées pour dégrader un

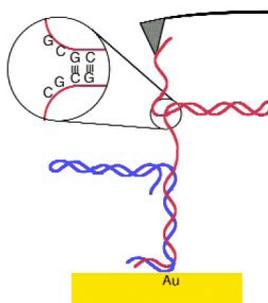


FIG. 3.11 – Schéma résumant la formation de structures en épingle à cheveux d'un même brin d'ADN. C'est ainsi qu'est interprétée l'apparition d'un nouveau plateau entre 9 pN et 20 pN selon la séquence et après un premier étirement jusqu'à la phase S. Extrait de [119].

assemblage poly(dA-dT) ou poly(dC-dG) sont aussi cohérentes avec les résultats connus (respectivement $\simeq 9$ pN et 20 pN).

Synthèse

A l'étirement, l'amplitude des fluctuations du plateau B-S ne dépasse pas quelques pN, sauf cas particuliers (Fig 3.2). C'est là la signature d'un changement coopératif que s'attachent à expliquer les modèles voulant décrire la transition B-S. Cet effet coopératif implique une extension par leurs extrémités des régions déjà dénaturées. Il est plus facile d'étendre une région S déjà existante plutôt que d'en nucléer une nouvelle.

Nous avons vu que pour les zones riches en A-T, le plateau B-S apparaissait en-deçà des 65 pN, ce qui suggère que ce sont ces régions plus fragiles qui vont transiter les premières vers un état désapparié. La transition de ces zones s'effectue toujours aux alentours de 65 pN, car il faut encore tenir compte de la présence des paires C-G : même si elles sont minoritaires, elles maintiennent la structure B en place jusqu'à ce qu'elles soient elles aussi fragilisées.

Les régions riches en C-G maintiennent les deux brins au contact et adoptent très certainement une structure S bien définie dont l'hélicité serait celle déterminée dans [90].

Au-delà de la transition, la plupart des paires de bases, y compris C-G, se désappariant, menant à une configuration de deux polyélectrolytes chargés en interaction complexe [39] : répulsion des squelettes phosphatés chargés négativement ($1 e^-$ par bp), et attraction entre les bases sur les brins différents ou sur le même brin. Ce passage d'une structure S définie vers un état désapparié au-delà de 65 pN doit s'accompagner d'un hystérésis ; et doit être dépendant du taux de charge. C'est ce qui est observé dans [119].

Le profil irrégulier du plateau peut s'expliquer par les variations dans la distribution des paires A-T le long de la molécule. L'hystérésis lors de la relaxation s'explique par des

raisons liés au désappariement des zones riches en A-T qui a eu lieu lors de l'extension. Tant que l'on ne dépasse pas le plateau B-S, le changement de structure des zones riches en C-G, sans désappariement des paires de bases, n'est pas source d'hystérésis à la relaxation.

Ainsi, avec un tel modèle, nous devrions observer des zones sans hystérésis si nous ne dépassons pas le plateau B-S. Ces zones riches en C-G (dont il reste à évaluer la coopérativité et le pourcentage en paire de bases C-G) doivent produire une signature visible : c'est effectivement le cas pour la molécule pBR322 ou pc-DNA his A,B,C (Fig 3.7).

Ainsi, lorsque le squelette sucre-phosphate de la molécule d'ADN présente une cassure, il est possible par simple étirement, au-delà du plateau B-S, qu'une partie simple brin se détache complètement du reste de la molécule (Fig 3.12). La molécule est alors partiellement simple brin, ce qui se voit clairement sur le profil d'étirement (Fig 3.8).

Les temps parfois longs pour retrouver la forme B de l'ADN rappellent ceux rencontrés dans les expériences d'ouverture de boucles d'ARN, où il faut aussi attendre plusieurs secondes pour que la structure se replie correctement après étirement [64]. Ces temps longs sont probablement dus ici, aux problèmes de réappariement entre paires de bases justement.

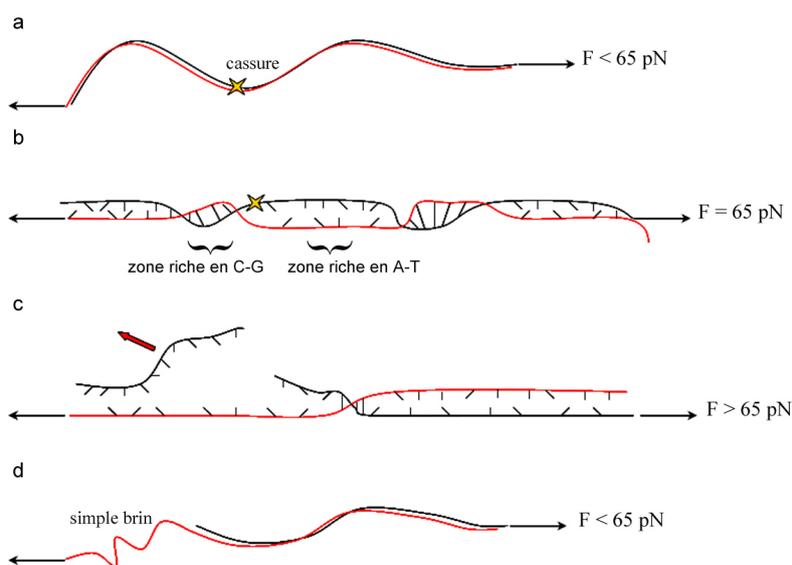


FIG. 3.12 – *Interprétation de l'étirement de la Fig 3.8 a, le squelette de phosphodiester de la molécule d'ADN est initialement cassé en un endroit. b, sur le plateau B-S les zones riches en A-T se désappariaient, les riches en C-G changent de structure. c, au-delà du plateau, même les zones riches en C-G se désappariaient, si les interactions entre les deux brins ne sont plus assez nombreuses pour retenir à proximité la partie du brin cassé qui n'est liée à aucune des billes. Celui-ci est alors libéré dans la solution. d, en retournant à des forces inférieures à 65 pN, la molécule d'ADN est mixte : une partie est simple brin, l'autre est restée double brin. Les profils d'étirements suivants ne se superposent plus à celui d'une molécule d'ADN complète.*

3.3 Commentaire sur la méthode : effet de la protéine MENT

3.3.1 Expériences

Nous avons aussi tenter de déterminer l'effet d'une protéine, MENT, sur une molécule d'ADN tendue entre nos deux billes. Cette protéine est connue pour promouvoir la condensation de la chromatine [63] : nous avons supposé qu'elle pouvait être capable de ponter deux molécules d'ADN. Nous espérons donc qu'en laissant à notre ADN suffisamment de liberté, MENT allait le ponter en différents endroits, formant ainsi des boucles d'ADN fermées par une ou plusieurs protéines. En tirant sur ce système, nous pensions dégrafer ces boucles d'ADN. Ceci nous aurait renseigné entre autre sur l'espace moyen entre chaque protéine et la force nécessaire pour les décrocher de l'ADN.

Nous avons été confrontés à de multiples problèmes de dilutions des protéines et de tampon de fonctionnalisation. Pourtant, de temps en temps, le diagramme force-extension présentait un plateau en dents de scie pour une force d'environ 15 pN (Fig 3.13), très reproductible, qui ne présente quasiment pas d'hystérésis. Nous l'avons tout d'abord interprété comme la signature de MENT accroché sur l'ADN.

Mais nous avons ensuite effectué une série de contrôles négatifs, c'est-à-dire une série d'étirements avec le même type d'ADN, dans le même tampon, mais cette fois ci, sans protéines. A notre grande surprise, nous observions à nouveau parfois (1 étirement sur 30 environ) ce plateau à 15 pN. Notre protéine n'était donc pas impliquée dans ce plateau autour de 15 pN.

3.3.2 Discussion

Cette (més-) aventure souligne bien le caractère important des contrôles à faire en sciences et en biologie en particulier. Sans ceux-ci il est quasiment impossible de conclure quoique ce soit d'une simple expérience d'étirement, et cela conduit souvent à des erreurs d'interprétations. Ceci peut même arriver à des équipes confirmées et reconnues [30][31].

Cette étude portait sur les interactions entre la condensine et l'ADN. Brièvement, le terme condensine désigne une classe de protéines qui contiennent une partie SMC et qui organisent et compactent le chromosome selon un processus encore inconnu.

Avec la même approche que nous avons eue avec MENT, les auteurs en mélangeant ADN et condensine, espéraient enregistrer un signal propre au complexe ADN-condensine en tirant sur la molécule d'ADN. Cette étude fait mention d'un plateau à 17 pN dans le profil d'étirement de l'ADN [30]. Les étirements successifs sont hautement reproductibles, et, pour retrouver sa configuration initiale après avoir été étiré, l'ensemble ne requiert pas d'énergie. Les auteurs ont alors proposé un nouveau modèle pour expliquer comment la condensine organise le chromosome *in vivo*.

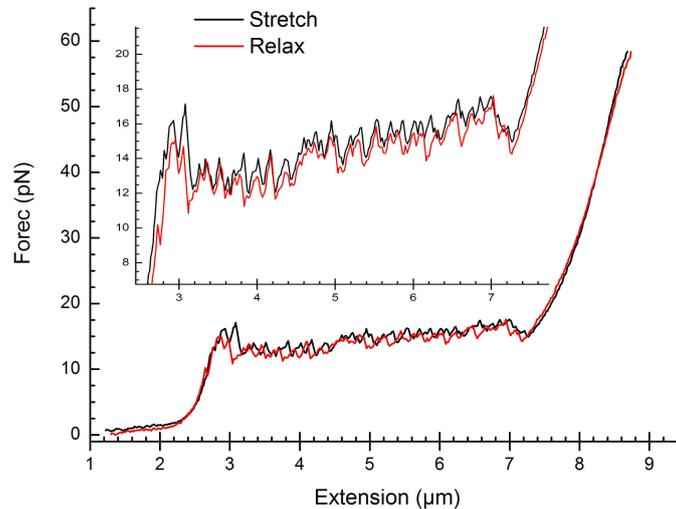


FIG. 3.13 – **Exemple de plateau à 15 pN.** Nous avons parfois observé ce type de profil en étirant un fragment d'ADN λ long de 38 kbp ($\sim 12.9 \mu\text{m}$). La presque parfaite reproductibilité du profil entre la phase d'étirement et celle de relaxation suggère un mécanisme bien défini, certainement l'appariement entre bases.

Ce plateau autour de 17 pN ressemblait fortement à celui que nous avons obtenu lors de nos expériences avec MENT. Et comme pour nous, cette équipe a eue le même problème avec l'ADN qu'elle utilisait : le plateau existait aussi parfois en l'absence de condensine. Seulement les contrôles négatifs ont été faits après publication et l'erreur a été mentionnée dans [31].

L'origine de cet artefact est un défaut dans l'ADN utilisé. Lors de la fonctionnalisation de l'ADN avec la biotine ou l'antidigoxigénine, un des brins peut être marqué aussi en son milieu. Par la suite, au moins une des deux billes se trouve fixée au milieu du brin d'ADN, et en tirant sur cette bille, l'ADN est dégrafé. Cela se traduit par une phase d'étirement où la force croît rapidement avec l'extension imposée, puis, une fois une force seuil atteinte (entre 10 et 20 pN), les brins de la molécule d'ADN sont séparés, toujours autour de cette force seuil ; ce qui se traduit par un pseudo plateau dans le diagramme force-extension. Il a été montré que les irrégularités de ce plateau sont essentiellement dues aux variations de la quantité de paire de base C-G ou A-T [24].

Nous nous trouvons bien dans la gamme de forces mentionnée par les équipes qui étudient le dégrafage de l'ADN [51] ou de l'ARN [94]. Lors de telles expériences de dégrafage, avec un dispositif permettant d'exercer une force constante (pincettes magnétiques), la grande reproductibilité du signal recueilli permettrait d'envisager d'analyser des séquences d'ADN [24]. C'est cette spécificité d'appariement des paires de bases qui se manifeste

lorsque nous utilisons des ADN de piètre qualité, et qui explique une telle reproductibilité des détails du plateau.

Chapitre 4

Résultats sur la chromatine

Bien que différent de celui d'une molécule d'ADN nu, le profil d'étirement de la chromatine conserve quelques similitudes : La courbe de relaxation est fort semblable à celle de la molécule d'ADN nu, et le plateau de transition B-S autour de 60 pN est conservé.

Conformément aux résultats obtenus lors d'autres expériences d'étirement de la chromatine, nous nous attendons à observer une courbe d'étirement, force-extension, présentant un profil en dents de scie pour une gamme de forces autour de 20 pN. Chaque pic est interprété comme le signal de décrochage ou de rupture d'un ou plusieurs nucléosomes. A partir de ces profils, il est possible d'extraire la longueur moyenne d'ADN libérée au cours de ces ruptures. Celle-ci est évaluée en mesurant la base du pic de rupture.

Le processus qui mène du nucléosome plus ou moins complet à un ADN + huit histones n'est pas déterministe. Même si c'est parfois le cas, le plus souvent nous n'observons pas de réel plateau sur les courbes d'étirements, où tous les nucléosomes seraient rompus à une même force.

Nous exposons dans cette partie les résultats obtenus sur chaque type de chromatine avec lequel nous avons travaillé, en soulignant les particularités de chacun. Nous les comparerons entre eux, et aussi avec ceux d'autres équipes, essentiellement dans le chapitre qui suivra.

4.1 Sur la chromatine reconstituée avec des histones recombinants et la nucléoplasmine

Les conditions de travail avec la nucléoplasmine et les histones recombinantes sont décrites en section 2.2.2.

Les profils d'étirements, s'ils sont nettement différents de ceux obtenus pour des molécules d'ADN nu, ne présentent que rarement des pics. Nous présentons une des courbes d'étirement sur laquelle, comme pour d'autres types de chromatine, des pics sont visibles, faisant penser à des ruptures de nucléosomes (Fig 4.1). Cependant les analysant de plus

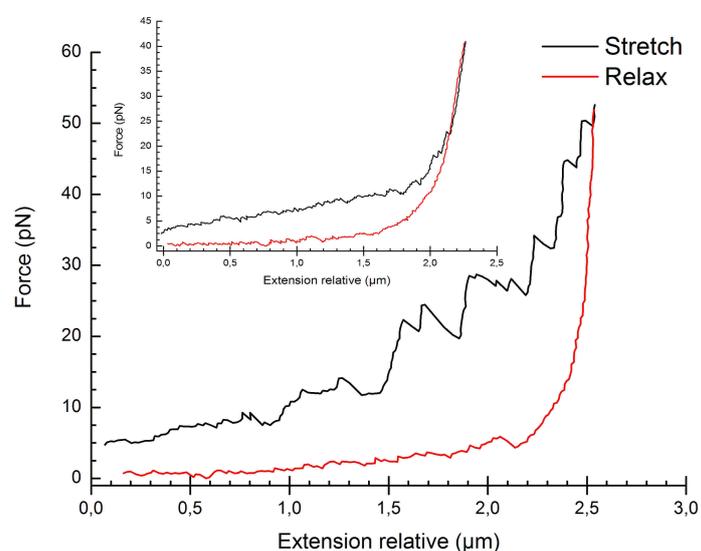


FIG. 4.1 – Exemple d'étirement sur une molécule d'ADN dans une solution d'histones et de nucléoplasmine. Le plus souvent les profils d'étirements ne présentent pas de pics mais diffèrent quand même nettement des profils force-extension d'une molécule d'ADN nu (insert). On voit (sous le microscope et sur la courbe) l'existence d'une force autour de 5 pN qui tend à rapprocher les deux billes avant même la phase d'étirement. La courbe de relaxation ressemble plus à celle d'une molécule d'ADN nu.

près, les longueurs d'ADN libérées sont bien trop importantes et trop dispersées pour être interprétées ainsi. Néanmoins ces pics signent bien la rupture d'une association entre ADN et histones : en présence de nucléoplasmine seule, le profil d'extension de l'ADN est celui d'une molécule nue.

Le profil de la phase de relaxation est très semblable à celui d'une molécule d'ADN nue.

D'autre part, après incubation, la force de début d'étirement n'est pas nulle comme c'est le cas (hors entropie) avec une molécule d'ADN seule, non étirée initialement. Nous avons enregistré le signal en continu pendant la phase d'association ADN-histone et nucléoplasmine, pour pouvoir récolter des informations sur les complexes ainsi constitués (Fig 4.2). Dans nos conditions expérimentales (cf section 2.2.2), la force seuil au-delà de laquelle l'ADN ne peut plus être associé avec les histones et la nucléoplasmine est de l'ordre de 5 pN. La vitesse à laquelle est réalisée la complexation est dépendante de la force appliquée sur l'ADN et semble ici (Fig 4.2) s'arrêter à 4.5 pN environ.

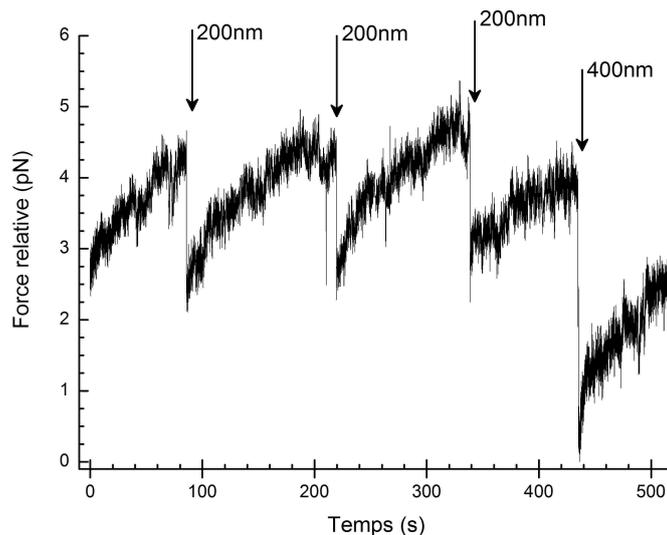


FIG. 4.2 – **Enregistrement de la diminution de longueur entre les billes pontées par une molécule d'ADN.** Cette molécule est un fragment de phage λ dans une solution diluée d'histones recombinant et de nucléoplasmine. Le piège est maintenu fixe et l'ADN est initialement tendu avec une force de quelques pN. Les flèches indiquent la longueur dont nous rapprochons les billes et donc la longueur d'ADN libre pour s'associer avec les histones. Nous pouvons nettement détecter une force qui rapproche les deux billes. La vitesse de condensation varie avec la tension de l'ADN.

Nous avons aussi regardé les effets d'un mélange ADN-histone, sans nucléoplasmine : dès que la solution contenant les histones seules est introduite dans la chambre, la distance

entre nos deux billes décroît rapidement. La molécule d'ADN se condense avec les histones libres en solution, sans aucun ordre. Il est ensuite pratiquement impossible d'étirer cet agrégat ADN-histones, même avec une force de l'ordre de 140 pN. Cette agrégation rapide et solide semble appartenir à ces phénomènes de condensation de l'ADN avec des ions multivalents comme la spermidine par exemple. Dans le vocabulaire de la physique des polyélectrolytes ; on passe de l'état de "bobine aléatoire" à l'état de "globule".

4.2 Résultats obtenus sur la chromatine reconstituée à partir d'extraits d'œufs de *Xenopus Laevis*

4.2.1 Contournement des problèmes dus aux impuretés de l'extrait

Très souvent les extraits contiennent encore de nombreuses impuretés, débris membranaires, agrégats d'actine etc... Elles sont elles aussi capturées dans le piège optique, et viennent s'agréger sur notre bille. Le bruit sur notre signal augmente rapidement, mais en plus, la relation reliant constante de raideur du piège et la puissance du laser utilisée devient vite inutilisable ; selon la qualité de l'extrait, le temps d'une expérience peut varier entre 20 s. et 20 mn.

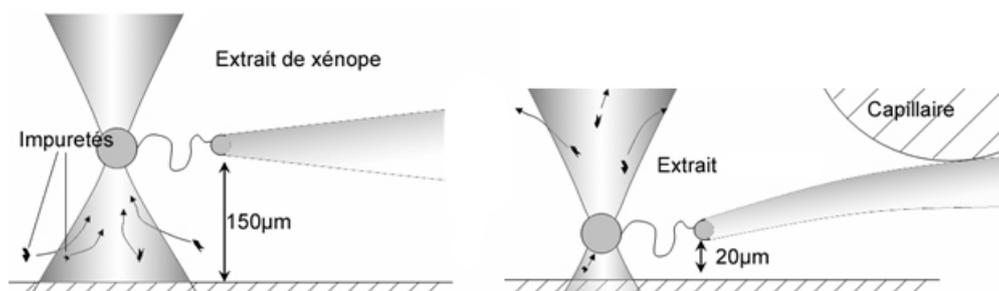


FIG. 4.3 – Schéma de notre cellule expérimentale avant et après modification pour travailler avec l'extrait d'œufs de *Xenopus Laevis*. Pour réduire la pollution de notre bille piégée par les impuretés présentes dans l'extrait d'œufs de *Xenopus Laevis*, nous rapprochons la micro-pipette de la paroi inférieure de la chambre en la courbant avec un micro-levier (un morceau d'une autre micro-pipette).

Pour augmenter ce temps exploitable, il ne faut utiliser une puissance laser importante (~ 800 mW) que pendant la phase d'étirement ; nous réduisons à 200 mW (puissance laser en sortie de tête) la puissance pendant l'incubation ADN + extrait.

Les particules susceptibles d'être piégées sont celles qui se trouvent en amont du point focal du faisceau laser, celles se trouvant en aval sont éjectées par la pression de radiation

qui l'emporte sur la force de piégeage. Pour ces expériences avec l'extrait, nous avons réduit la distance entre l'extrémité de la micropipette, et la surface de verre amont afin de diminuer la quantité d'impuretés pouvant s'adsorber sur notre bille. Comme notre conception des chambres expérimentales ne nous permet pas de régler la hauteur de la micro-pipette nous avons rapproché l'extrémité de la surface de verre en insérant une petite tige de verre en travers, faisant ainsi levier et incurvant la micropipette (Fig 4.3). Nous réduisons ainsi la distance d'un facteur 5 environ, passant de $150 \mu\text{m}$ à $30 \mu\text{m}$ en moyenne. Le temps disponible pour l'expérience est accru, jusqu'à 45 mn - 1 h.

4.2.2 Distributions

Un profil d'étirement typique de la fibre de chromatine reconstituée avec l'extrait d'œufs de *Xenopus Laevis* est représenté sur la Fig (4.4).

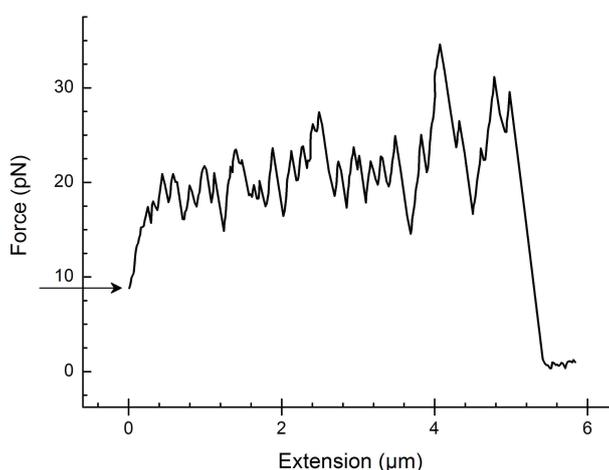


FIG. 4.4 – Diagramme d'étirement d'une fibre chromatinique reconstituée avec de l'extrait d'œufs de *Xenopus Laevis*. *En dents de scie*, ce profil est très différent du profil d'extension d'une molécule d'ADN nue. Chaque dent est attribuée à la libération brusque de l'ADN impliqué dans un ou plusieurs nucléosomes ou même, éventuellement, dans d'autres structures de type boucle d'ADN. Avec l'extrait, il est également probable que certains pics correspondent aussi à la libération d'ADN engagé dans des structures autres qu'un nucléosome. Ici, en fin, d'étirement l'ADN se détache de l'une des billes.

Les distributions en forces de rupture et en longueurs d'ADN libérées sont relativement larges. Soucieux de ne pas biaiser nos résultats nous avons tenu compte de tous les pics observés, même si certaines longueurs pourraient plutôt correspondre à de grandes boucles d'ADN ou à des structures plus étendues qu'un simple nucléosome.

Nous avons procédé à un grand nombre d'étirements, collectant ainsi un échantillon de pics pertinents pour procéder à son analyse : plus de 420 pics pour les expériences de références, avec la protéine B4 présente.

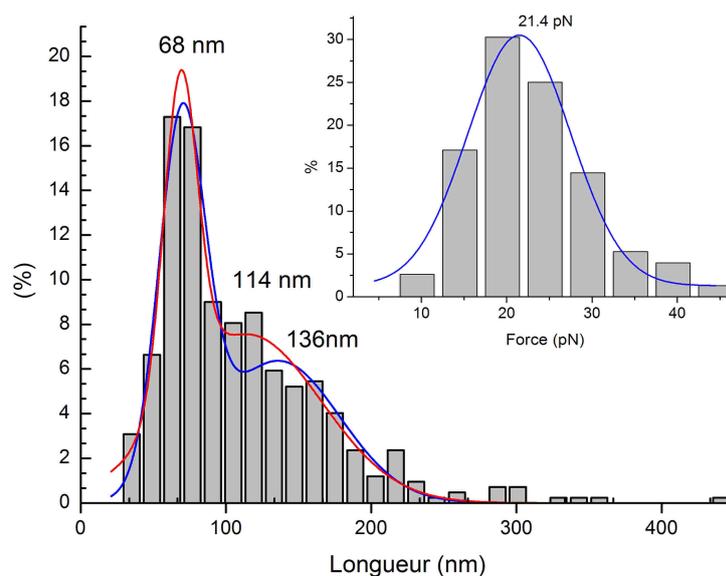


FIG. 4.5 – **Histogramme des longueurs libérées lors des phénomènes de rupture.** *Etirements sur des fibres de chromatines reconstituées avec un extrait d'œufs de Xenopus Laevis contenant la protéine B4. Lignes continues : Ajustement de deux gaussiennes, en rouge avec les longueurs moyennes libres et en bleu avec pour contrainte la deuxième longueur qui est le double de la première. Une longueur de 68 nm se dégage nettement de la distribution. La longueur double, supposée correspondre à la rupture simultanée de deux nucléosomes, est noyée dans la queue de la distribution. Insert, histogramme de la distribution des forces de rupture lors de l'étirement de cette fibre de chromatine et ajustement avec une gaussienne (courbe en bleu)*

L'histogramme (Fig 4.5) révèle une longueur autour de $68 \text{ nm} \pm 1.7 \text{ nm}$ (SE) et une autre, plus étalée, autour de $114 \text{ nm} \pm 4.7 \text{ nm}$ (SE). La distribution en forces de type gaussienne, est centrée autour de $21 \text{ pN} \pm 0.6 \text{ pN}$ (SE).

Dans la plupart des expériences sur l'extrait d'œufs de *Xenopus Laevis* ou de *Drosophila*, l'ADN n'est pas initialement tendu. Pourtant nous remarquons une diminution très nette de la distance entre les deux billes à mesure que la fibre de chromatine se constitue. Le piège restant fixe, une force de résistance à la formation de la fibre apparaît, et peut atteindre 8-10 pN avant que la distance entre les billes ne se stabilise. Ensuite, le profil d'étirement n'est pas modifié et reste en dents de scie.

4.2.3 Cinétique de formation

Reconstitution sur une molécule d'ADN isolé

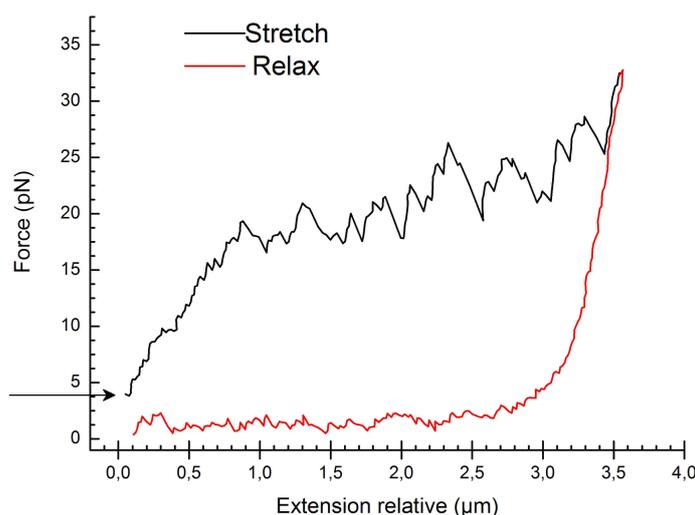


FIG. 4.6 – Autre exemple typique d'étirement d'une fibre de chromatine reconstituée avec l'extrait de *Xenopus Laevis*. Cette fois la relaxation est bien visible et semblable à celle d'un ADN nu. Les nucléosomes ne se reconstituent pas au fur et à mesure que la force décroît. Par contre, comme nous pouvons le constater sur ce profil d'étirement, la fibre de chromatine peut se former sur une molécule d'ADN jusqu'à ce que la force de tension soit comprise entre 4 et 10 pN; flèche noire sur cette figure et sur Fig (4.5).

Dans ce type d'expérience, nous ne disposons que de très peu de molécules d'ADN, quasiment seulement celles qui sont attachées à la bille, les autres étant rincées avant l'arrivée de l'extrait. La qualité de l'extrait est très variable, et il n'est pas rare d'observer des fragments de membranes ou autres petits "aérolithes" en suspension, susceptibles de se faire happer par le piège, venant ainsi polluer notre signal. La durée d'incubation, limitée donc par la contamination de notre bille, pourrait être insuffisante pour reconstituer une fibre de chromatine complète, si l'on s'en tient au temps caractéristique de 1 h [136][43] évoqué dans la communauté des biologistes. Pourtant une autre étude détermine un temps de formation bien différent, plutôt de l'ordre de la minute [80], plus proche de nos premiers résultats. Nous avons donc procédé à l'expérience suivante pour avoir un ordre de grandeur de la cinétique de formation de la chromatine dans nos conditions expérimentales et pour savoir si les fibres reconstituées en si peu de temps étaient bien formées :

Avant l'introduction de l'extrait, nous étirons une molécule d'ADN longue de 10 kbp jusqu'à sa longueur curvilinéaire (force ~ 3 pN), puis nous réduisons de 300 nm la distance

entre les billes. La longueur disponible d'ADN autorise, en théorie, la formation de 4-5 nucléosomes complets (~ 200 bp soit 68 nm par nucléosome) avant que l'ADN ne soit sous tension, empêchant ainsi l'addition de tout nucléosome en plus. L'extrait est ensuite introduit. Après une incubation de 3 mn nous étirons une première fois la molécule puis nous ajoutons 900 nm d'ADN libre de plus. Pour ce deuxième étirement, ce sont alors 1200 nm d'ADN qui sont disponibles pour former des nucléosomes. Après le même temps d'incubation, soit 3 mn, nous procédons au deuxième étirement. Les résultats sont représentés Fig (4.7). Les longueurs libérées au cours de ces deux phases correspondent bien à 300 et 1200 nm, et les nombres de pics attendus sont eux aussi conformes à ce que nous attendions : conformes au nombre de nucléosomes susceptibles de se former sur l'ADN non étiré. Dans ces conditions, la fibre de chromatine est rapidement formée, en comparaison avec les temps de référence employés en biologie moléculaire.

De plus un autre série d'expériences vient confirmer les résultats de cette première approche, et nous indique elle aussi clairement un temps d'incubation court pour aboutir à la formation d'une fibre de chromatine (Fig 4.8).

Reconstitution en présence d'ADN compétiteur

Toujours pour étudier ce problème de cinétique de formation de la chromatine à partir d'extrait, et comprendre les quelques discordances concernant celle-ci, nous avons regardé l'influence de l'addition d'ADN compétiteur. En effet, la différence majeure entre ces expériences sur molécule unique et celles opérées classiquement dans les laboratoires de biologie est le rapport (quantité d'ADN)/(quantité de protéines), très faible dans le premier cas, et proche des conditions physiologiques dans le deuxième.

Avant d'injecter l'extrait dans notre chambre nous lui avons ajouté une quantité d'ADN telle que la concentration finale en ADN soit de $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$, ce qui correspond à des conditions caractéristiques employées en biologie moléculaire. Les étirements sur la molécule d'ADN exposée à cet extrait contenant de l'ADN compétiteur sont ensuite effectués. Même en accroissant le temps d'incubation entre chaque phase d'étirement (10 mn, 20 mn, 35 mn), il n'apparaît aucune structure évoquant la rupture d'un nucléosome complet dans le diagramme force-extension. Néanmoins, la réponse à l'étirement est suffisamment différente de celle d'une molécule d'ADN nue pour supposer la fixation de protéines de façon non spécifique sur l'ADN (Fig 4.9).

4.2.4 Effet du tampon

Ainsi une incubation dans l'extrait de quelques minutes suffit pour constituer des nucléosomes sur notre molécule d'ADN. Ceux-ci sont *a priori* brisés lors de l'étirement. En effet, en étirant successivement la même molécule d'ADN en des temps rapprochés, le premier étirement souligne clairement la présence de nucléosomes, mais le second, si il a la même amplitude (en force) que le premier, ne présente quasiment aucun pic dans son

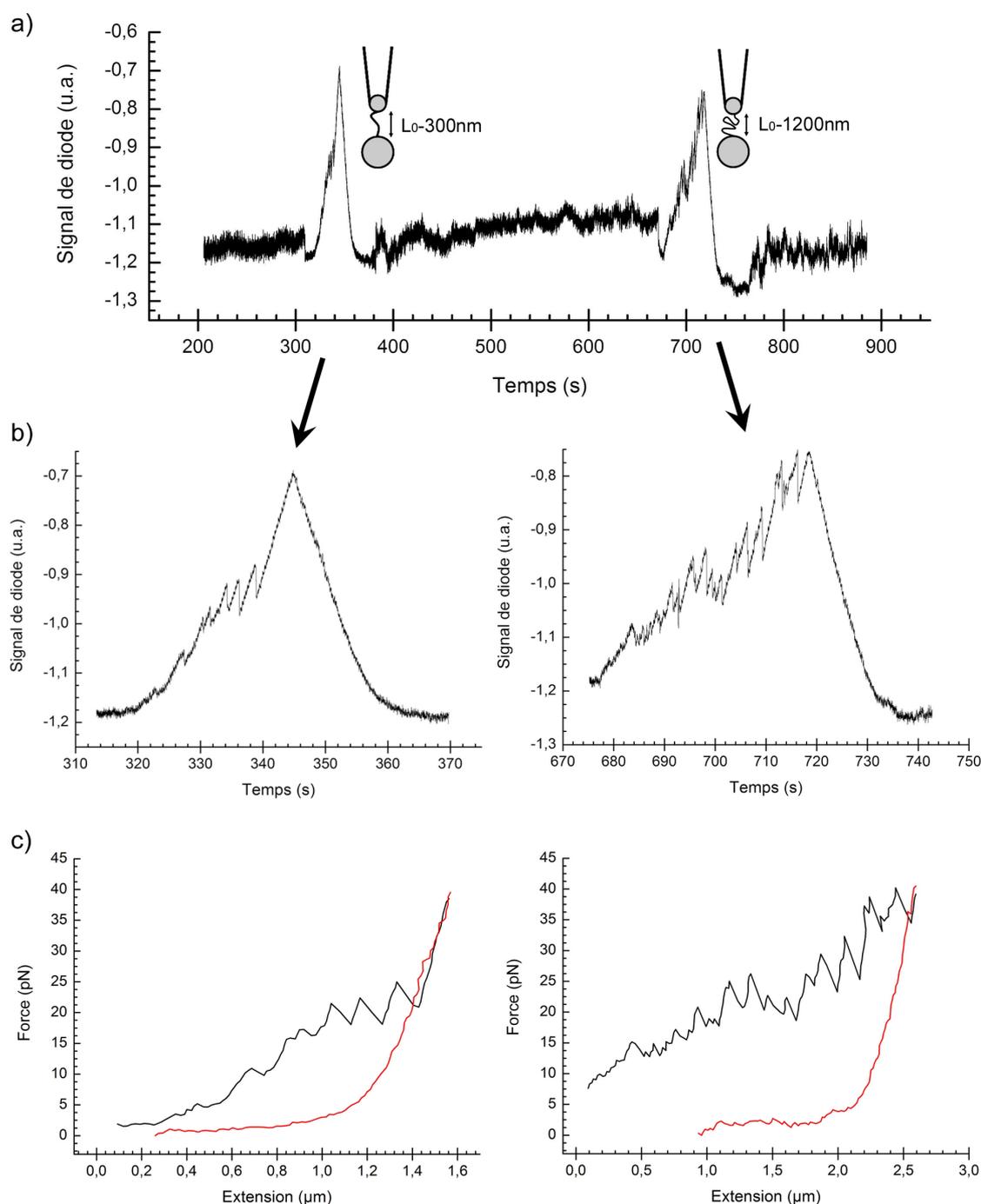


FIG. 4.7 – Profils d'étirements successifs : étude du nombre de nucléosomes constitués avec la longueur d'ADN laissée libre. Dans une première étape nous réglons l'extension de la molécule d'ADN entre nos deux billes de façon que seulement $L_{DNA} - L_{bille-bille} = L_0 = 300\text{ nm}$ soient disponibles pour former une fibre avec l'arrivée de l'extrait. Le premier cycle extension-relaxation est effectué dans l'extrait et est suivi d'une deuxième phase d'incubation de 3 mn lors de laquelle nous avons réduit la distance entre les deux billes par rapport au premier étirement, $L_0 = 1200\text{ nm}$. Le profil du deuxième étirement est ponctué de plus de pics que le premier, quatre fois plus environ, conformément à ce que nous attendons si ces pics sont bien la signature de la rupture de nucléosomes. **a)**, déroulement de l'expérience, signal recueilli non traité. **b)**, isolation du signal des deux étirements. **c)**, conversion en force et en extension.

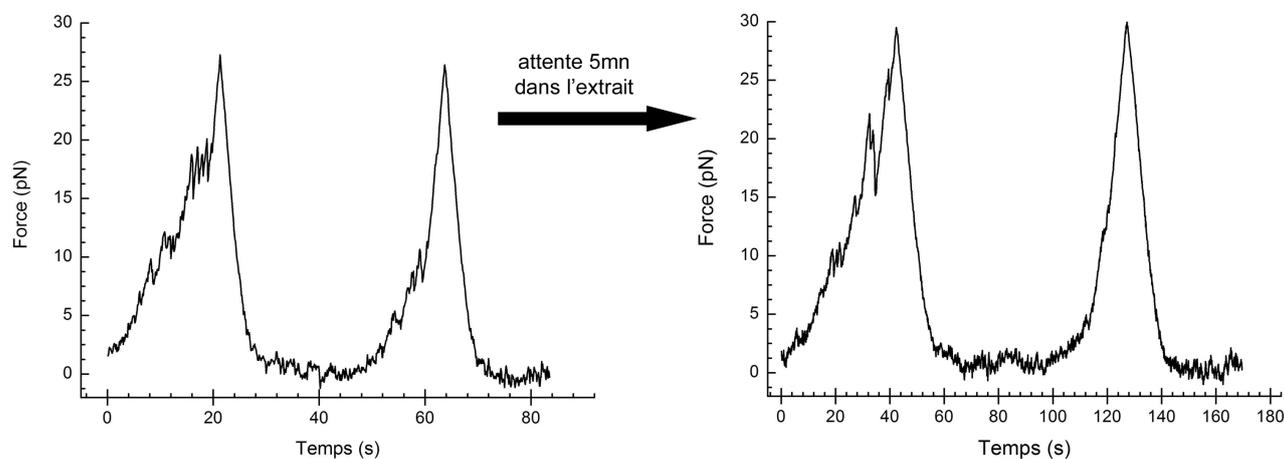


FIG. 4.8 – Profils d'étirement successif d'une fibre reconstituée dans l'extrait : étude de la vitesse de formation de la fibre. Entre deux étirements successifs, les nucléosomes n'ont pas le temps de se reconstituer : nous n'observons pas ou peu de ruptures sur les étirements immédiatement suivants. Mais en attendant quelques minutes, la fibre est reconstituée.

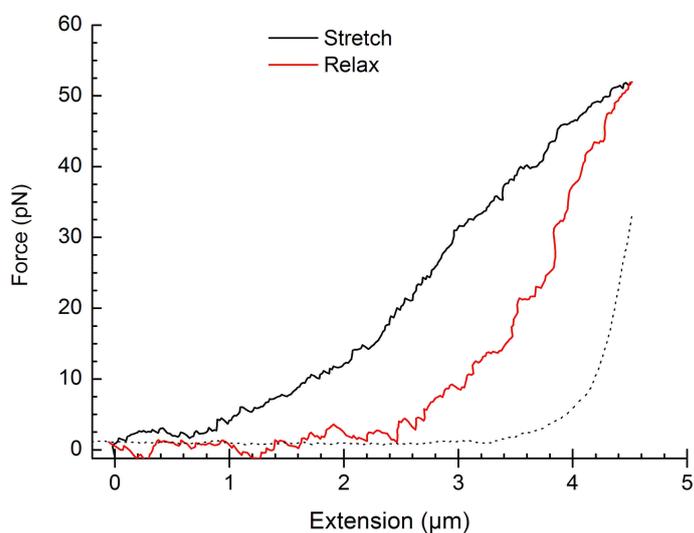


FIG. 4.9 – Profil d'étirement d'ADN dans l'extrait de *Xenopus Laevis*, avec ADN compétiteur. $[ADN_{\text{compétiteur}}]=50 \text{ ng/l}$. En pointillé, courbe d'étirement d'une molécule d'ADN nu semblable.

profil. A nouveau, si on laisse assez de temps à la fibre pour se reconstituer, le troisième étirement aura lui aussi un profil en dent de scie.

De même, si lors du premier étirement tous les nucléosomes n'ont pas été détruits, si l'amplitude du second étirement est plus grande, les nucléosomes restants sont à leur tour dégradés, ce qui est visible sur le diagramme force-extension.

Afin d'étudier les étapes suivant la rupture du nucléosome, nous avons reconstitué la fibre de chromatine dans l'extrait avec un temps d'incubation moyen de 10 mn. Puis la chambre est rincée, l'extrait est remplacé par un tampon physiologique. Nous étirons ensuite une première fois la fibre, détectant la présence de nucléosomes. Les profils d'étirement suivants ne présentent pas de pics en général.

Nous devons cependant mentionner une exception pour laquelle des pics sont apparus de nouveau après un délai de 5 mn entre les deux étirements. Le tampon employé était alors de 10 mM PIPES, 0.4M NaCl. Pour expliquer ce phénomène, nous supposons que nous avons, dans ces conditions, cassé les liaisons histones histone, en particulier dimères-tétramères, mais que les liaisons histones-ADN sont conservées. Les constituants de l'octamère ne sont alors pas libérés dans la solution et peuvent reconstituer un nucléosome plus ou moins complet après une attente suffisamment longue (de l'ordre de 5 mn).

4.2.5 Déplétion de la protéine B4

Une autre étude mentionne une longueur caractéristique de rupture du nucléosome reconstitué avec l'extrait d'environ 64 nm [21]. Cette longueur est trop importante pour correspondre à l'ADN enroulé autour d'un seul octamère. La présence à la sortie de la NCP du substitut de l'histone de liaison dans l'extrait, la protéine B4, est une des explications envisagées. Pour tester cette hypothèse, nous avons conduit le même type d'expériences avec un extrait sans B4. Nous n'avons pas observé de différence majeure entre les deux distributions, avec ou sans B4 (Fig 4.10), même si les ruptures de petites longueurs d'ADN semblent plus nombreuses pour les fibres reconstituées avec l'extrait sans B4. Nous devons encore confirmer ce résultat, car nous rencontrons avec l'extrait des problèmes inhérents aux expériences sur molécules uniques (cf p.155).

4.3 Résultats obtenus avec la chromatine native et la chromatine reconstituée sur 5S

Reconstituer la chromatine avec l'extrait est facile à mettre en oeuvre mais comporte un inconvénient majeur : la fibre ainsi générée n'est pas bien définie. Du fait de la présence d'une seule molécule d'ADN, de nombreuses autres protéines ont tendance à s'associer avec elle et à perturber l'édifice. D'autre part, nous ne savons pas encore très bien quel rôle vont jouer les protéines HMG dans ce contexte. Nous avons donc décidé de nous tourner

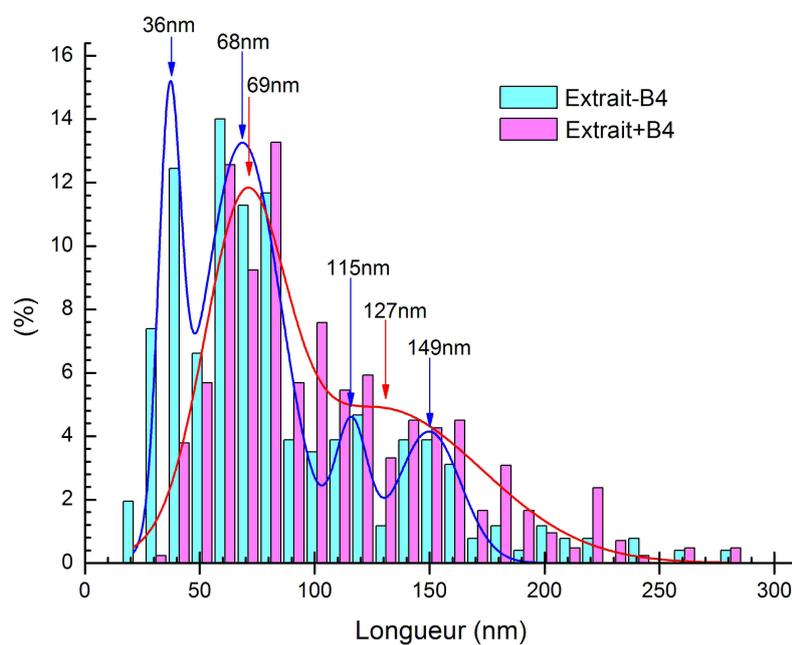


FIG. 4.10 – Comparaison des distributions des longueurs d'ADN libérées lorsque les expériences ont été faites sur des fibres reconstituées avec des extraits déplétés ou non de la protéine B4. On semble voir une réduction de la longueur moyenne principale d'ADN libéré; néanmoins, un test T de Student sur ces distributions (montre que la distinction n'est pas significative).

vers des systèmes mieux définis, quoique plus complexes à construire et à manipuler : un nucléofilament reconstitué sur une séquence répétée positionnant l'octamère d'histones, et la chromatine native issue de noyaux d'érythrocytes de poulet.

4.3.1 Chromatine reconstituée sur une séquence répétée de 5S ADN-r d'oursin

NCP complètes

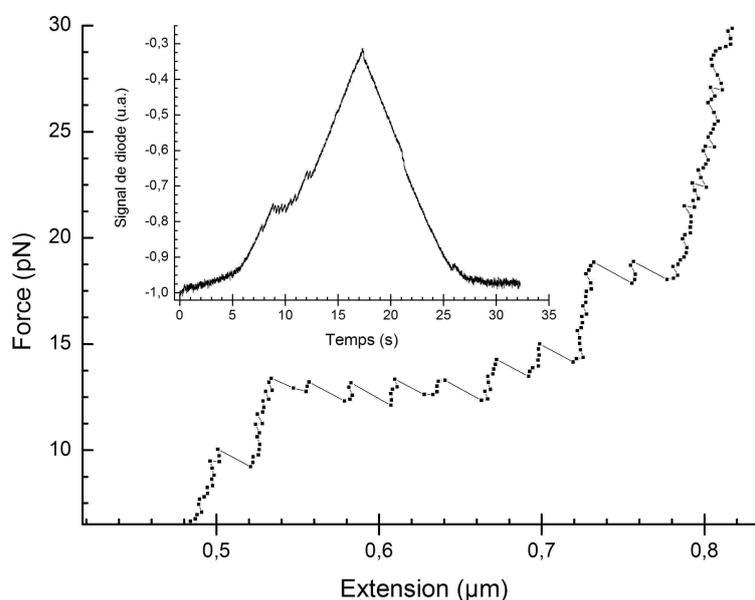


FIG. 4.11 – Profil d'étirement obtenu avec des NCP reconstituées sur une séquence répétée de 5S ADN-r. Profil complet en insert. Comme pour l'extrait de *Xenopus Laevis*, chaque saut est la signature de la libération de l'ADN nucléosomal. Cet échantillon est mieux défini que ne l'est la fibre reconstituée avec l'extrait et le signal récupéré est plus propre.

Dans des conditions salines autour de 100 mM NaCl, la longueur de rupture est distribuée autour de 24 ± 3.3 nm (SD) et la force autour de 17.6 ± 3.5 pN (SD) (Fig 4.12). L'addition d'ions divalents en concentration raisonnable (≤ 2 mM) dans la solution perturbe peu ces distributions. Tant en longueur qu'en force, elles restent statistiquement indiscernables, après l'ajout de 1 mM Mg^{2+} dans la solution (Tab 4.1). Nos résultats sont semblables à ceux obtenus dans [27] sur un système analogue.

Cependant, la distribution en longueur présente un épaulement vers les longueurs supérieures à 24 nm, ce qui n'est pas mentionné dans l'étude précédente [27].

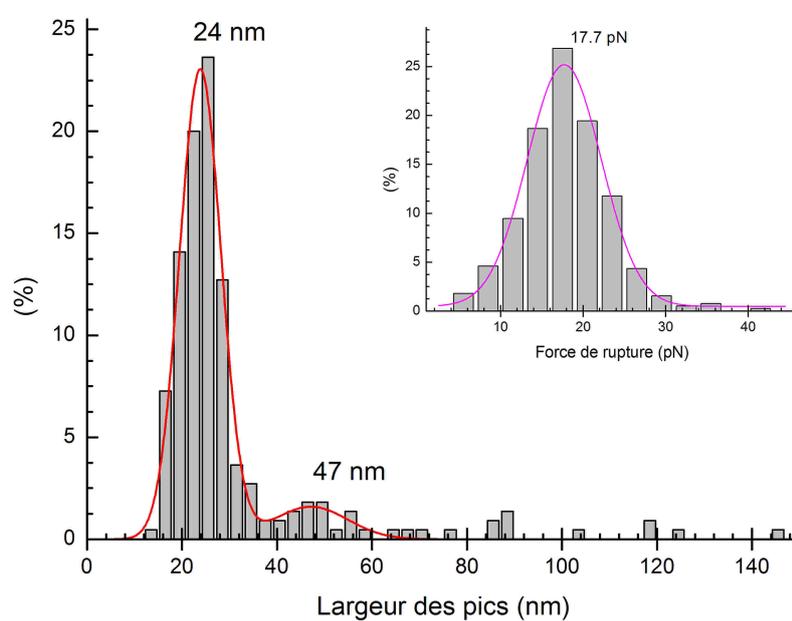


FIG. 4.12 – Distributions des longueurs d'ADN libérées lors des étirements sur les NCP reconstituées sur une séquence répétée 5S ADN-r positionnant l'octamère. La majeure partie de la population est centrée autour de 24 nm. On notera l'existence d'un épaulement non négligeable à cette distribution, pour des longueurs plus importantes.

Une autre observation que nous pouvons faire porte sur le nombre de pics observés sur les profils d'extension. Lors d'un étirement le nombre de pics que nous attendons est au maximum de 10, si nous ne considérons que les séquences 5S, ou 12 si nous considérons la longueur totale du fragment d'ADN. Bien souvent, parce que la reconstitution impose un rapport (nombre d'octamères)/(nombre de site d'ADN) < 1 pour éviter toute agrégation, le nombre de pics que nous comptons lors d'un étirement est ≤ 10 . Pourtant, nous avons enregistré plusieurs étirements avec plus de 12 pics, allant même jusqu'à 17 pics (Fig 4.13).

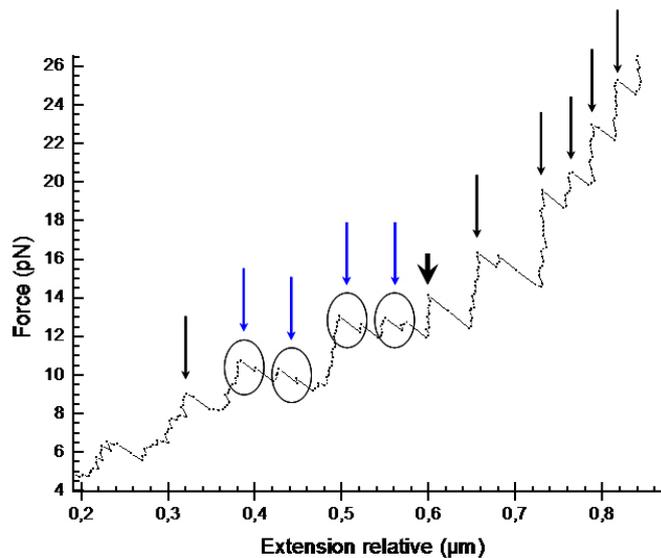


FIG. 4.13 – **Exemple de profil d'étirement particulier** Ce profil présente plus de pics que de sites accessibles à la formation d'un nucléosome : nombre de pics > 14 , au lieu des 10 attendus au maximum. Certains de ces pics semblent aller par paire (flèches bleues) alors que les autres sont clairement isolés (flèches noires). La flèche noire en gras désigne un pic libérant environ 50 nm d'ADN, les flèches noires plus fines désignent des pics libérant autour de 25 nm d'ADN.

Certains de ces pics sont particuliers : ils semblent aller par paire, et, chose étonnante, la force de rupture du second pic est légèrement inférieure à celle du premier. Bien qu'ils soient présents en quantité non négligeable ($> 20\%$), nous n'avons pas pris en compte ce type de double pics dans notre analyse, ne sachant pas comment les considérer. La longueur libérée par le premier pic est de 24 nm, et si nous mesurons la longueur totale libérée par le pic total, constitué des deux petits pics, elle est de ~ 50 nm. S'agit-il d'un seul nucléosome, et nous voyons alors les deux tours dérouler l'un après l'autre (25 nm puis 25 nm) ? Ou deux nucléosomes différents qui ne libèrent qu'un seul tour chacun, mais quasiment en même temps ?

Fibre reconstituée uniquement avec des tétramères H3-H4

La longueur caractéristique de 25 nm qui est libérée à chaque rupture correspond à la longueur d'ADN impliquée dans un seul tour de l'octamère d'histone. Si, comme le supposent certains modèles [27], cet ADN libéré correspond à ~ 80 bp en contact avec le tétramère H3-H4, nous devrions observer le même type de profil d'étirement en effectuant nos expériences sur une reconstitution avec seulement des tétramères H3-H4.

Le protocole de préparation de telles fibres ne diffère pas beaucoup de celui de la reconstitution par dialyse de NCP complètes (cf 2.2.2). Néanmoins, pour éviter autant que possible toute dimérisation des tétramères H3-H4, le rapport ADN/protéine est augmenté jusqu'à 2.5.

Nous avons effectué les expériences d'étirement dans un tampon de PBS $1\times$, comme pour une grande partie des fibres de NCP reconstituées ou la chromatine native.

Les courbes d'extensions obtenues sont similaires aux courbes obtenues avec des NCP complètes. Le nombre moyen de ruptures observées par étirement est cependant inférieur à son analogue avec des NCP, approximativement d'un facteur 3. Ceci est certainement dû à la plus grande difficulté à reconstituer des particules ne comportant qu'un seul tétramère ; L'ensemble ADN + tétramères est moins stable et en plus le rapport ADN/histones est plus grand dans le cas de cette dernière reconstitution que dans celui des NCP complètes.

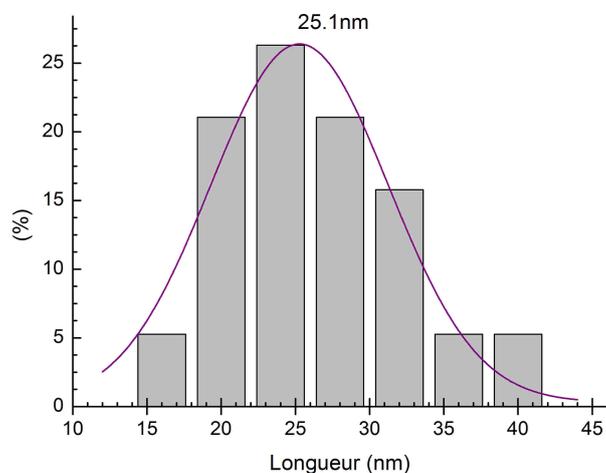


FIG. 4.14 – **Histogramme de la distribution des longueurs d'ADN libérées lors de l'étirement de fibre reconstituées uniquement avec des tétramères (H3-H4).** Cette distribution est centrée autour de 25.1 ± 4.8 nm.

Les étirements effectués sur les fibres ne contenant que de l'ADN enroulé autour des tétramères mettent en évidence une longueur de 25.1 ± 1.2 nm (SE) alors que la force de rupture est distribuée autour de 14.7 ± 0.4 pN (SE). Cependant cette appa-

décroissance de la force de dissociation entre les expériences sur les particules de cœurs complètes et sur l'ADN enroulé autour des tétramères n'est peut-être pas significative (test T de Student).

4.3.2 Chromatine native

Les fibres de chromatine native ont jusqu'alors fait l'objet d'une seule étude sous étirement [42]. Cette étude c'est surtout intéressée aux propriétés élastiques de la fibre de 30 nm, dans un régime de force faible, n'excédant pas 20 pN. Les profils d'étirements force-extension recueillis n'ont pas un aspect en dents de scie, signature de la rupture de nucléosome individuel. Ils présentent en revanche un hystérésis entre les phases d'extension et de relaxation, qui est interprété comme la signature indirecte de la dissociation des nucléosomes.

Nous avons effectué une étude sur la chromatine native issue de noyau d'érythrocytes de poulet, dans une gamme de force plus large (jusqu'à 40 pN en moyenne), et avec une résolution plus fine qui nous permet d'enregistrer la rupture de nucléosomes individuels. Notre première série d'expériences avec la chromatine native a été réalisée dans des conditions physiologiques classiques : TE 1 ×, 50-100 mM NaCl (parfois PBS 1 ×, mais sans différence dans les résultats avec TE 1 ×, 100 mM NaCl) et sans chromatine exogène. Les courbes d'étirements ont, cette fois, un aspect en dents de scie.

La distribution des forces de rupture est centrée autour de 19.4 ± 6 pN (SD) tandis que la distribution en longueur de rupture fait apparaître une nette majorité de pics autour de 24 nm. Notons tout de même une contribution non négligeable de pics libérant bien plus de 24 nm. Un ajustement bimodal gaussien met en évidence des longueurs de 23.4 ± 5 nm et 38.8 ± 15 nm (SD), même si cette dernière valeur est à relativiser car noyée dans la queue (Fig 4.15).

En comparant les résultats obtenus sur la chromatine native ou la chromatine reconstituée sur une séquence répétée 5S ADN-r avec ceux obtenus sur une fibre de tétramère, nous n'entrevoions pas d'effet net de la part des dimères H2A-H2B sur la stabilité du nucléosome. Et ce qui peut paraître encore plus troublant, nous ne voyons pas l'effet de l'histone de liaison (H1 ou H5) sur les étirements de la chromatine native alors que les gels réalisés par ailleurs soulignent clairement sa présence.

Des études ultérieures portant sur la stabilité du nucléosome (synthétisé essentiellement dans [174], cf 1.2.1) peuvent nous apporter des éléments d'explication. Non seulement la concentration en ions monovalent est un facteur de stabilité, mais aussi, la concentration en NCP elles mêmes. Nous décrivons dans la section suivante nos résultats d'expériences portant sur l'influence de ces deux paramètres.

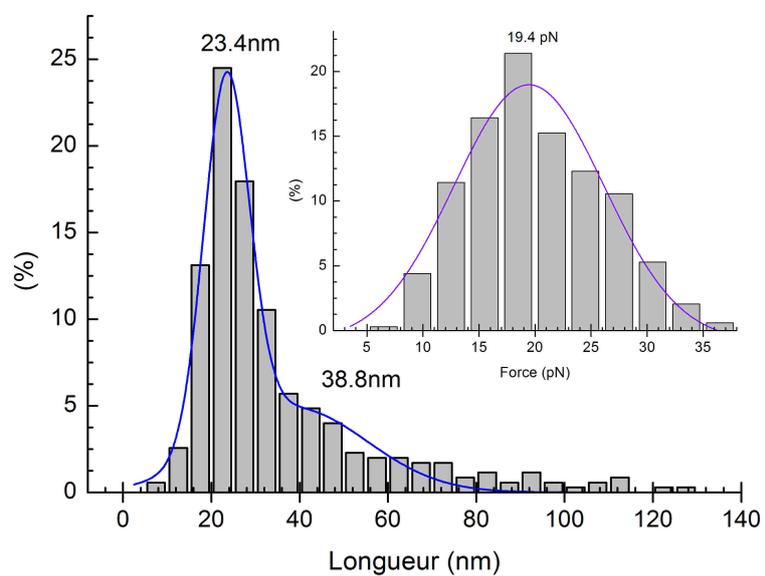


FIG. 4.15 – Distribution des longueurs d'ADN libérées lors des étirements sur les fibres de chromatine native issues de noyaux d'érythrocytes de poulet. Une longueur d'environ 23.5 nm se détache clairement et la queue de la distribution n'est pas négligeable.

4.4 Résultats dans des conditions avec chromatine exogène ou salinité plus faible

4.4.1 Chromatine reconstituée sur une séquence 5S d'ADN-r

NCP reconstituée avec des histones non-variants et en présence de chromatine exogène

Les expériences sur la chromatine reconstituée sur une séquence répétée 5S d'ADN-r ont été répétées en présence de chromatine exogène (non marquée par biotine et anti-digoxigénine, donc complètement passive vis-à-vis du processus d'étirement) à une concentration $OD_{260} = 2$ et dans un tampon physiologique de PBS $1\times$ (cf 2.3.1). Il apparaît alors clairement dans la distribution un accroissement de la quantité de ruptures libérant environ 50 nm d'ADN (Fig 4.16). Nous avons tenter sans succès d'accroître encore la concentration en chromatine exogène car nous rencontrons alors de nombreux problèmes pour accrocher une fibre entre les billes. Dans ce cas, nous soupçonnons la chromatine exogène, complexe fortement chargé, de s'adsorber non spécifiquement sur la surface des billes (même après ajout préalable de BSA à 1 mg/ml). En couvrant ainsi la surface de la bille, elle réduit considérablement la probabilité d'accrochage d'une fibre marquée.

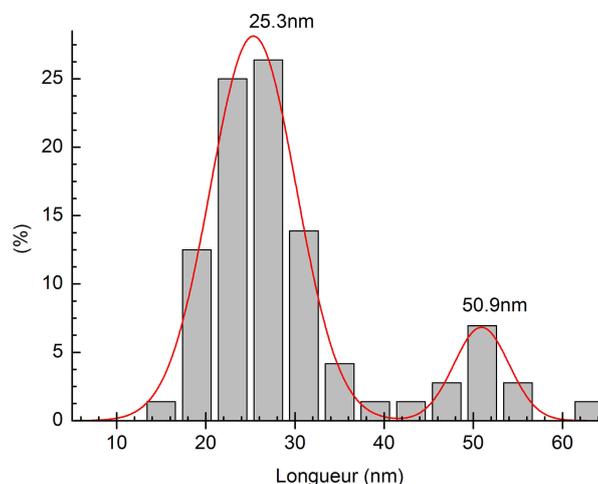


FIG. 4.16 – Histogramme des longueurs d'ADN libérées lors de l'étirement de fibre de chromatine reconstituée sur une séquence répétée 5S ADN-r avec de la chromatine exogène dans le milieu. La concentration de la chromatine exogène est de $OD_{260}=2$, Le milieu est du PBS $1\times$. La distribution est bimodale autour de 25.2 ± 3.9 nm (70%) et 50.5 ± 3.8 nm (30%) d'après l'ajustement avec deux gaussiennes (courbe rouge).

NCP reconstituées avec H2ABbd et avec une concentration locale accrue de chromatine

Nous avons exploré une autre voie pour accroître la concentration en matériel. Plutôt que d'augmenter la concentration en chromatine dans toute la solution, nous l'avons augmentée localement, sur les billes (cf 2.3.1).

Nous avons conduit une série d'expériences de ce type avec des NCP reconstituées avec un variant de l'histone H2A : H2ABbd. Le tampon employé est du TE 1 ×, 100 mM NaCl.

La distribution en longueur d'ADN libérée est nettement bimodale (Fig 4.17), autour de 23.7 ± 3.3 nm et 49.8 ± 4.4 nm (SD)

Ici, le rapport (fibre non marquées)/(fibres marquées) est de 20 (cf 2.3.1), mais nous n'avons pas pu l'augmenter davantage, les temps d'attente pour fixer une fibre entre nos deux billes devenant bien trop important (de l'ordre de 20 mn).

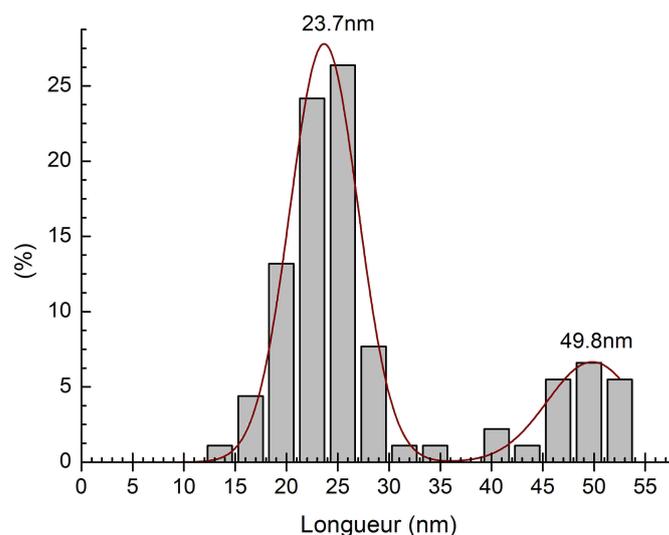


FIG. 4.17 – Distribution des longueurs libérées lors des étirements sur des fibres reconstituées avec la variante H2ABbd de l'histone H2A, dans des conditions localement stabilisantes. Cette distribution est clairement bimodale. Les ajustements ont été réalisés avec deux gaussiennes centrées autour de 23.7 ± 3.3 nm (76%) et 49.8 ± 4.4 nm (24 %)

4.4.2 Chromatine native

Concentration en sel monovalent : 50 mM

Nous avons repris le même type d'expérience avec la chromatine native, mais dans une solution à 50 mM NaCl. La comparaison avec les expériences dans 100 mM sels monovalents fait apparaître un accroissement de la population des pics libérant une longueur de 50 nm. Cette population se détache alors nettement de la queue de la distribution centrée autour de 24 nm (Fig 4.18).

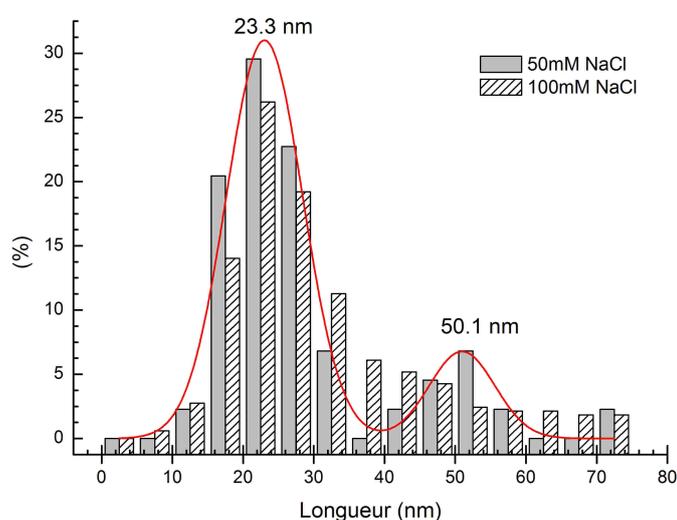


FIG. 4.18 – Comparaison des distributions obtenues après étirement de fibre de chromatine native dans des conditions de dilutions identiques mais à des concentrations salines différentes. A 50 mM en sels monovalents, nous pouvons distinguer deux populations centrées autour de 23.3 ± 5 nm (84 %) et 50.1 ± 4.5 nm (16 %).

En présence de chromatine exogène

Nous avons procédé à des étirements sur des fibres de chromatine native en présence de chromatine exogène dans la solution. Nous nous sommes placés dans une solution de TE 1×, 100 mM NaCl et pour éviter à tout instant la dilution importante des fibres de chromatine marquées (sauf au moment même de l'étirement), nous avons suivi le protocole décrit dans 2.3.1. La concentration en chromatine exogène est de l'ordre de : $OD_{260}=2$.

Encore pour des problèmes d'adhésion non spécifique de cette chromatine sur nos billes, nous ne sommes pas allés au-delà de cette concentration.

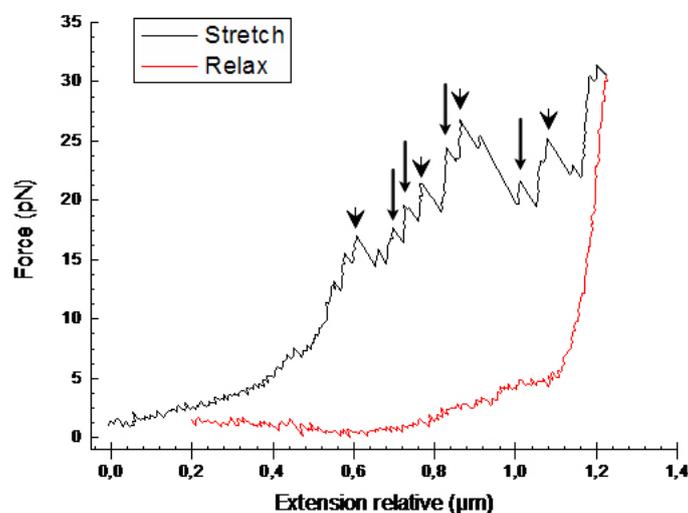


FIG. 4.19 – Exemple de profil d'étirement de fibre de chromatine native en conditions stabilisantes. Nous distinguons deux sortes de pics, petits (25 nm, petites flèches) et plus grand (50 nm, flèches larges)

La force nécessaire à la rupture ne varie pas, comparé à ce que nous avons déterminé pour les étirements de fibre native en l'absence de chromatine exogène ; diagramme typique, Fig (4.19). La distribution est centrée autour de, 20.8 ± 5 pN, Fig 4.20, insert. Par contre la distribution des longueurs d'ADN libérées est nettement bimodale. Les longueurs sont distribuées autour de 23.8 nm et 51.7 nm (Fig 4.20).

L'ensemble des résultats précédents est résumé dans le tableau qui suit (Tab 4.1). Dans les expériences qui mettent en évidence deux populations majoritaires de longueurs d'ADN libérées, nous n'avons pas noté de corrélation entre la longueur et la force de rupture moyenne : les distributions de force sont les mêmes pour les deux populations.

4.5 Expériences de dilutions successives et analyse sur gel

Nous avons tenté de confirmer nos résultats avec une expérience relevant du domaine de la biochimie. L'idée est d'étudier la stabilité de nucléosome (chromatine native) ou de NCP (chromatine reconstituée sur une séquence positionnante) au cours de dilutions successives, l'analyse des résultats se faisant par migration électrophorétique sur gel. Cette série d'expériences a été menée en collaboration avec Dimitri Angelov (LR6, ENS Lyon) et Stefan Dimitrov (IAB, Grenoble).

Type de chromatine	Concentration saline	Longueur de rupture \pm SD (nm)		Force de rupture \pm SD (pN)
		1 ^{ier} pic	2 ^{ième} pic	
reconstituée à partir d'extrait d'œufs de <i>Xenopus Laevis</i>	n/a	68 \pm 11	114 \pm 50	21.4 \pm 6
native	100mM NaCl	23.4 \pm 5	38.8 \pm 15	19.4 \pm 6
native	50 mM NaCl	23.3 \pm 5	50.1 \pm 4.5	20 \pm 7.5
native, conditions stabilisantes	100 mM NaCl	23.8 \pm 7.5	51.7 \pm 8.4	20.8 \pm 5
reconstituée sur une séquence répétée 5S	100 mM NaCl	24 \pm 3.3	47.5 \pm 5.4	17.6 \pm 3.5
reconstituée sur une séquence répétée 5S	100 mM NaCl, 1mM MgCl ₂	23.3 \pm 3.4	49.2 \pm 4.2	19.1 \pm 4.5
reconstituée sur une séquence répétée 5S, avec chromatine exogène à OD ₂₆₀ = 2	100 mM NaCl	25.2 \pm 3.9	50.5 \pm 3.8	17.8 \pm 5.5
Tétramères H3-H4 seulement reconstitués sur une séquence répétée 5S	100mM NaCl	25.1 \pm 4.8	n/a	14.7 \pm 1.8

TAB. 4.1 – Résumé des résultats obtenus sur tous les types de chromatine que nous avons tester

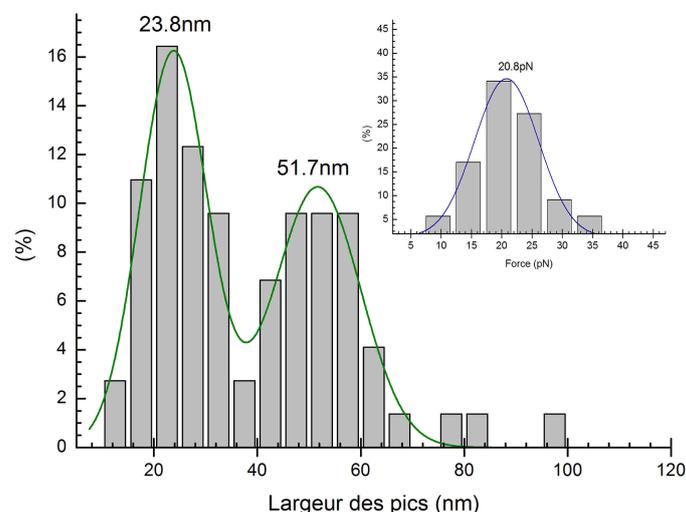


FIG. 4.20 – Distribution des longueurs d’ADN libérées, pour les expériences sur fibre de chromatine native et avec de la chromatine exogène dans le milieu. Deux populations se répartissent autour de $23.8 \pm 7.5 \text{ nm}$ (55 %) et $51.7 \pm 8.4 \text{ nm}$ (45 %)

4.5.1 Dilution de NCP

Pour étudier la stabilité de l’octamère d’histones avec la dilution, nous avons employé des histones marquées radioactivement afin de pouvoir en détecter de très faibles concentrations ($\leq 1 \text{ nM}$). Nous avons reconstitué des NCP sur des séquences 601 avec soit des histones H2B radioactives, soit des histones H3 radioactives. Puis nous avons étudié la stabilité de ces particules avec leur dilution dans des solutions de TE 1 \times , 10 mM NaCl et PBS 1 \times ($\approx 160 \text{ mM Na}^+$). Bien entendu les volumes analysés sur le gel sont tous identiques, quel que soit l’échantillon. Ainsi chaque échantillon dilué deux fois est deux fois moins radioactif qu’avant dilution (ramené au même volume).

Si le dimère n’est plus associé aux NCP contenant l’histone H3 radioactive, alors une seconde bande avec un mobilité plus faible apparaît. Cette bande correspond au tétramère H3-H4 seul. Aucune bande de cette sorte ne peut être détectée sur les NCP reconstituées avec l’histone H2B radioactif, n’ayant aucun marquage sur le tétramère résiduel : dans ce dernier cas, seule une décroissance en intensité peut-être détectée, causée à la fois par la dilution et par l’éventuel détachement des dimères H2A-H2B. En accord avec ce qui est établi pour la stabilité des NCP [174] [71], l’effet de la dilution sur la stabilité de ces NCP est beaucoup plus prononcé pour les expériences faites à concentration ioniques modérées (PBS1 \times) qu’à faible concentration en sel monovalent (10 mM NaCl).

Déjà à 40 nM, dans PBS 1×, une bande correspondant aux tétramères se détache nettement (Fig 4.21, PBS1×, ligne 1'). A mesure que la dilution augmente, le nombre de NCP intactes décroît, jusqu'à quasiment disparaître et ne laisser que des tétramères pour une dilution, dans PBS 1×, de 5 nM (Fig 4.21, PBS 1×, ligne 4').

D'autre part nous avons constaté que l'addition dans la solution de dilution de détergeant non ionique (NP40) à une concentration finale de 0.03% (v/v) accroît la stabilité des NCP au cours des dilutions (Fig 4.21, gels du bas). Cet effet disparaît pour la dilution la plus importante à 5 nM, en particulier pour les expériences en solution saline physiologique autour de 100 mM sel monovalent.

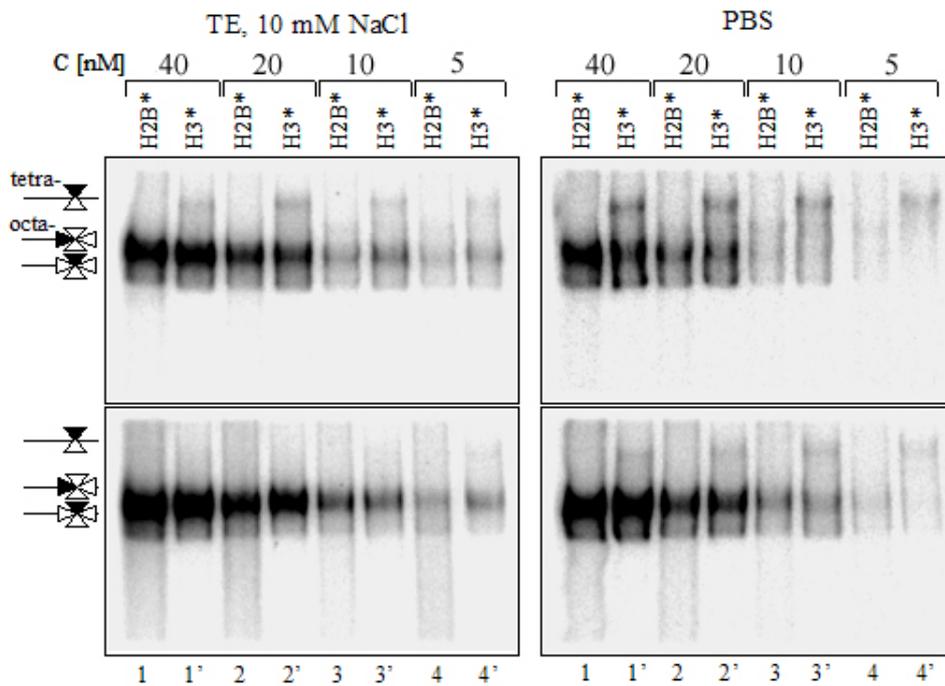


FIG. 4.21 – EMSA de nucléosomes reconstitués dans deux tampons différents, étude de l'effet de la dilution. Les nucléosomes sont marqués radioactivement par un isotope du phosphore : ^{32}P , soit sur l'histone H3 (H3^*) soit sur l'histone H2B (H2B^*). Les tétramères isolés sont marqués radioactivement par l'intermédiaire de H3^* . A gauche de la figure, les positions des NCP complètes et des tétramères sont indiquées. A une concentration saline (sel monovalent) de 130 mM (PBS1×), les NCP sont plus sensibles à la dilution qu'à une concentration saline plus basse, 10 mM : les dimères H2A-H2B se dissociant du tétramère H3-H4. Par contre l'addition d'un détergeant non ionique, NP40 à 0.03% (v/v) (gels du bas) a un effet stabilisateur sur les NCP.

4.5.2 Dilution de nucléosomes

Nous avons conduit le même type d'expérience avec la chromatine native. Une fois les solutions diluées obtenues, nous précipitons les résidus de chromatine, et analysons leur contenu en histones avec une électrophorèse sur gel de SDS. Dans ce cas, nous avons aussi une information sur la présence des histones de liaison H1 et H5. L'intensité correspondant à ces histones décroît avec la dilution, et il est quasiment impossible de détecter quoi que ce soit aux dilutions les plus importantes (2.5 et 1.25 nM). Par contre, les bandes correspondant aux histones H2A et H2B ont une intensité constante jusqu'à 5 nM, et seulement alors l'intensité décroît avec la dilution, reflétant un détachement des dimères du nucléosome (Fig 4.22).

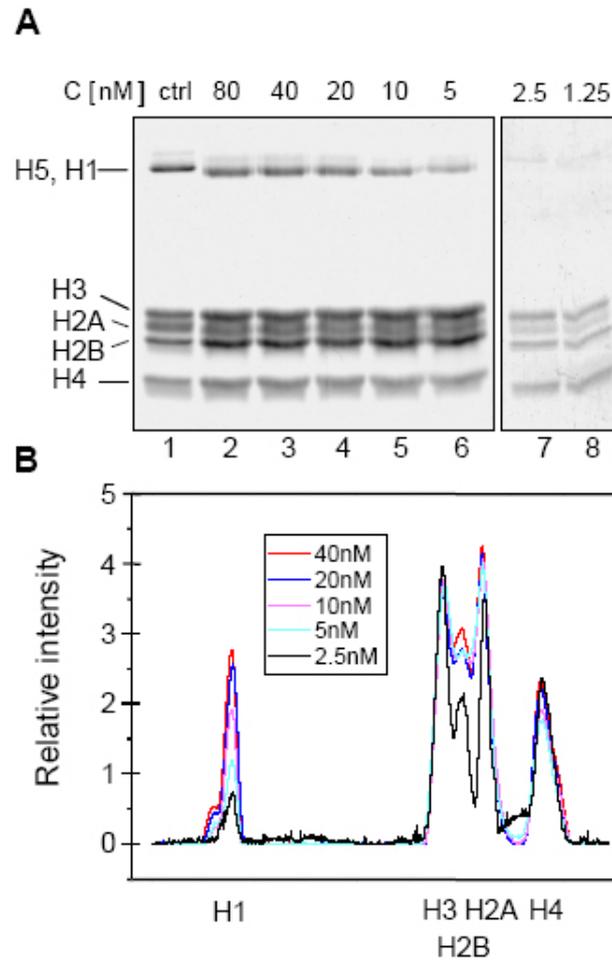


FIG. 4.22 – Effet de la dilution sur des fragments de chromatine native issus d'érythrocyte de poulet. **A**, échantillon contenant $4\ \mu\text{g}$ (ligne 1-6) et $2\ \mu\text{g}$ (ligne 7-8) de chromatine, dilués dans un tampon de PBS1 \times aux concentrations finales indiquées. Les positions de migrations des histones de cœur ainsi que des histones de liaisons sont indiquées à gauche. **B**, analyse du gel (**A**). La quantité de matériel dans les lignes 7 et 8 est deux fois plus petites que celle des lignes précédentes, et une normalisation de l'intensité est nécessaire pour pouvoir comparer les résultats. Les histones de liaisons sont libérés les premiers avec la dilution, suivis des dimères H2A-H2B.

4.6 Modèle de déroulement du nucléosome

Dans cette section, j'introduis le modèle que j'ai développé en collaboration avec H. Schiessel, au Lorentz Centrum de Leiden. Initialement écrit par Kulič I. et Schiessel H. [78], nous avons regardé plus en détail si nous pouvions décrire le comportement d'un nucléosome complet (deux tours d'ADN) sous étirement, ainsi que les problèmes d'énergie d'adsorption de l'ADN nucléosomal sur l'octamère d'histone. Nous l'avons alors confronté à nos résultats expérimentaux. Nous y reviendrons dans le chapitre "Discussion".

4.6.1 Brève description du modèle

Dans ce modèle, l'ADN est adsorbé sur un cylindre, selon un chemin hélicoïdal pré-défini par la structure chimique de ce cylindre. On note R le rayon du cylindre, H sa hauteur, h le pas de l'hélice et ε_{ads} l'énergie nette d'adsorption par unité de longueur : ε_{ads} tient compte de la différence entre le coût de courbure de l'ADN et l'énergie d'adsorption "brute".

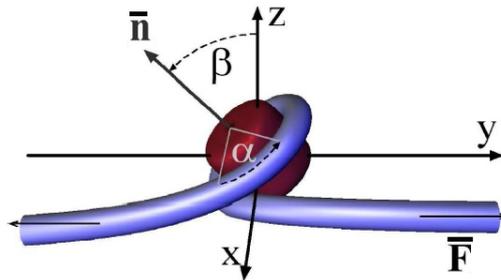


FIG. 4.23 – Schéma du nucléosome modèle considéré. Pour les détails sur les paramètres α , β et \bar{n} , voir le texte. D'après [78]

Le degré de déroulement de l'ADN est décrit par l'angle α : $\alpha = 0$ pour une NCP avec un tour complet, et $\alpha > 0$ pour une NCP avec l'ADN partiellement déroulé. Lorsqu'une force est exercée sur ce système, le déroulement de la bobine n'est pas plan, et on introduit l'angle β pour décrire la rotation de la bobine par rapport à sa configuration complètement enroulée. Du fait de la symétrie du problème, le vecteur normal \bar{n} appartient au plan (OYZ) , tandis que l'axe de la dyade coïncide toujours avec l'axe (OX) . La force est exercée selon l'axe (OY) (4.23).

La réponse à une force d'étirement selon l'axe (OY) se traduit par :

- Une déformation de l'ADN.
- Une rotation de la bobine.
- Une désorption de l'ADN en contact avec le cylindre.

Les extrémités de l'ADN sont supposées libres en rotation. La désorption de l'ADN est symétrique dans ce modèle. L'énergie de l'ensemble peut s'écrire comme la somme de trois termes :

$$E_{totale} = 2R\varepsilon_{ads}\alpha + 2E_{courbure} - 2F\Delta y. \quad (4.6.1)$$

Ensuite en déterminant la forme optimale pour les brins d'ADN (brins liant la bobine au dispositif d'étirement), et en passant dans le repère tournant avec la bobine :

$$E_{totale}(\alpha, \beta) = 2R\varepsilon_{ads}\alpha + 2FR \left(\sin \alpha \cos \beta - \frac{h}{2\pi R}(\pi - \alpha) \right) \sin \beta - \alpha \quad (4.6.2)$$

$$+ 8(AF)^{1/2} \left(1 - \sqrt{\left(1 + \frac{R}{R \cos \beta \cos \alpha} + \frac{H}{2\pi R} \sin \beta \right) / 2} \right). \quad (4.6.3)$$

Dans ces trois termes, le premier décrit le coût énergétique de désorption de l'ADN. Le second décrit le coût en énergie potentielle, suite aux diverses rotations (α et β). Et enfin, dans le dernier terme, deux effets ont un poids égal : la courbure des brins d'ADN libres, et la perte en énergie potentielle suite à cette courbure. L'ADN étant incurvé à la sortie de la bobine, ce n'est pas directement une énergie proportionnelle à la longueur d'ADN libérée que l'on gagne, mais une énergie un peu plus faible, tenant compte de la projection de l'ADN libéré sur l'axe d'étirement.

4.6.2 1 tour puis N tours

Nous avons considéré le cas d'une bobine à deux tours d'ADN. Le pas, h , de l'hélice ne change pas, mais la hauteur totale H dont nous tenons compte est doublée. Dans le modèle à un tour $H = h$, ici, $H = 2h$. Avec des considérations simples nous pouvons déterminer une nouvelle expression pour l'énergie globale de ce système sous tension. Tenant compte du fait que la hauteur varie de h , entre le premier et le deuxième tour d'ADN libéré, mais que la tangente au brin, en sortie de bobine, est imposée par le pas de l'hélice qui ne change pas, une modification est à apporter seulement dans le second terme de l'énergie globale. Nous introduisons une fonction de type tangente hyperbolique, θ : si $0 < \alpha < \pi$ alors $H = 2h$, si $\pi < \alpha < 2\pi$ alors $H = h$.

$$E_{totale}(\alpha, \beta) = 2R\varepsilon_{ads}\alpha + 2FR \left(\sin \alpha \cos \beta - \frac{h}{2\pi R}(\pi - \alpha) \right) \sin \beta - \alpha \quad (4.6.4)$$

$$+ 8(AF)^{1/2} \left(1 - \sqrt{\left(1 + \frac{R}{R \cos \beta \cos \alpha} + \frac{H\theta}{2\pi R} \sin \beta \right) / 2} \right). \quad (4.6.5)$$

Nous disposons ainsi du paysage énergétique du système à deux tours, dans les coordonnées α , β (Fig 4.24). Nous pouvons alors étudier l'influence de la force et/ou de l'énergie d'adhésion de l'ADN sur les barrières énergétique, toujours dans le but d'interpréter

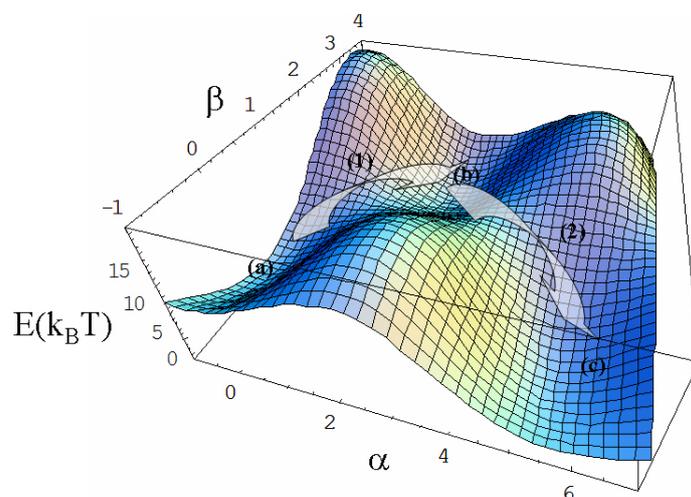


FIG. 4.24 – **Représentation du paysage énergétique généré par le modèle exposé ci dessus** : Dans les coordonnées α et β et pour les valeurs de paramètres suivantes : $\varepsilon_{ads} = 0.7 k_B T$ pour les deux tours, $A = 50 \text{ nm}$, $h = 2.8 \text{ nm}$, $R = 4.5 \text{ nm}$, $F = 4 \text{ pN}$.

certaines de nos étirements ; en particulier ceux concernant la chromatine reconstituée sur une séquence répétée 5S, ADN-r (cf section 4.3.1).

Chapitre 5

Chromatine : Discussion

Dans cette partie nous nous proposons d'interpréter les résultats, parfois très différents, obtenus sur ces diverses sortes de chromatine. Nous montrerons comment ils peuvent nous aider à comprendre un peu mieux la dynamique qui anime le nucléosome, cruciale pour la régulation de l'expression génétique.

Mais nous commencerons par évoquer les problèmes de vitesse de reconstitution de la chromatine avec l'extrait d'œufs de *Xenopus Laevis*.

5.1 Extrait d'œufs de *Xenopus Laevis* et dilutions

5.1.1 Cinétique de formation à partir de l'extrait d'œufs de *Xenopus Laevis*

Il est communément admis en biologie que le temps de formation de la chromatine à partir d'extrait d'œufs de *Xenopus Laevis* est long, de l'ordre de l'heure [136][43]. Pourtant, des expériences de biologie "en tubes", font état de temps beaucoup plus courts [80][155], de l'ordre de la minute. Nous aussi, après 3 mn d'incubation de l'ADN dans l'extrait, nous avons constaté la présence de pics sur les courbes d'étirements qui suivent, révélant des nucléosomes. Les expériences dans lesquelles nous contrôlons la longueur d'ADN disponible pour former des nucléosomes (Fig 4.7) ainsi que celles portant sur des étirements successifs, (Fig 4.8), évoquent clairement un temps court pour la constitution de nucléosomes et à terme de la fibre de chromatine. Nous avons effectué le même type d'expérience sur la chromatine reconstituée à partir d'extraits de drosophile (plus propre), avec des résultats similaires.

Nous avons supposé que ces données apparemment contradictoires n'étaient que la manifestation d'un problème de rapport de concentrations. En effet, la différence majeure entre les expériences de biologie, concernant de grande quantité et d'ADN et d'extrait, et celles de type molécule unique, est dans le rapport (quantité d'ADN disponible)/(volume

d'extrait). Ce rapport est très faible dans les expériences de molécule unique : quelques nM d'ADN (quelques mM dans les expériences plus classiques de biologie) contre un nombre de facteurs protéiques disponibles pour former la fibre de chromatine très important. Avec un tel déséquilibre stoechiométrique, le temps nécessaire à la formation d'une fibre de chromatine est *a priori* réduit.

En effet, l'expérience consistant à regarder l'effet d'ADN compétiteur vient confirmer cette hypothèse (Fig 4.9) : En ajoutant de l'ADN compétiteur dans l'extrait dans des proportions quasi stoechiométriques, la plupart des protéines sont mobilisées pour former la chromatine. Le temps moyen de formation d'une fibre de chromatine dans notre cellule d'expérimentation est accru. Même après 35 mn d'incubation, nous n'avons pas encore de nucléosome normalement constitué. Mais ce n'est pas pour autant que nous avons affaire à une molécule d'ADN nue : De multiples protéines s'adsorbent certainement plus ou moins spécifiquement sur la double hélice, modifiant le profil d'étirement par rapport à ce qui est attendu pour une molécule d'ADN nue (Fig 4.9, pointillés).

5.1.2 Qualité de l'extrait

Si la solution d'assembler la chromatine directement dans la cellule d'expérimentation peut sembler élégante, il ne faut pas perdre de vue que l'extrait issu de *Xenopus Laevis* est un système qui n'est pas complètement maîtrisé et qui est sensible aux variations de son environnement, et notamment à la dilution. D'autre part, nous ne connaissons pas les concentrations relatives des différentes protéines nécessaires à l'assemblage de la fibre, d'autant plus qu'elles peuvent varier de façon significative d'un extrait à l'autre. Du fait de ces incertitudes, les résultats obtenus à partir de ce type de chromatine sont parfois difficiles à interpréter.

Nos résultats portant sur la chromatine ainsi reconstituée corroborent ceux obtenus dans [21] : une distribution principale de longueur d'ADN libérée centrée autour de 65-67 nm avec un prolongement vers les longueurs plus élevées ; une distribution en force étalée entre 15 et 40 pN, pour des taux de charges comparables. Mais, avec le même protocole de reconstitution que dans [21] et toujours avec une collection de données étendue, les auteurs de [115] trouvent des longueurs différentes, dont une distribution centrée autour de 30 nm. La longueur de 59 nm trouvée dans cette deuxième étude est, quant à elle, assimilée à celle de 65 nm.

Ces quelques discordances peuvent avoir plusieurs origines : l'extrait employé dans [21] et [115] est dilué 80 fois, alors que nous utilisons pour notre part un extrait non dilué (cf 2.2.2).

Contrairement à l'ADN qui est une molécule stable vis à vis des petites variations du milieu physiologiques, nous verrons que la chromatine y est quant-à elle beaucoup plus sensible. Si les concentrations salines jouent un rôle important dans la stabilité de l'édifice, c'est aussi le cas des concentrations relatives des différents composants (ADN, histones, CAF) comme nous l'avons vu avec l'extrait de *Xenopus Laevis* (cf 5.1.1). Plus généralement,

la concentration en chromatine elle-même est un paramètre à ne pas négliger, comme nous l'avons constaté lors de nos expériences sur la chromatine reconstituée ou sur la chromatine native (cf 4.4).

5.2 Chromatine native et reconstituée : effet de la dilution

5.2.1 Comment interpréter la longueur déroulée de 24 nm ?

Une étude précédente portant sur le même type de chromatine, reconstituée sur une séquence répétée de 5S ADN-r, propose un modèle intéressant pour expliquer le profil des courbes d'étirements [27]. Les auteurs distinguent trois phases (Fig 5.1). Pour une gamme de forces dite faible, autour de 10 pN, 76 bp sont pelées au total, de part et d'autre de l'octamère d'histones. Cette rupture serait graduelle, sans que le profil d'étirement ne soit ponctué de pics. Ils ne restent alors plus que ~ 80 bp associées à l'octamère, formant un tour complet autour de celui-ci. La deuxième étape consiste à libérer lors d'un seul évènement et de façon discontinue ces paires de bases encore en contact avec l'octamère. Le mécanisme permettant de passer de l'octamère avec un tour d'ADN autour, à l'octamère simplement lié à un ADN tendu n'est pas explicité par les auteurs. Enfin pour une tension de la molécule d'ADN suffisamment importante, au delà de 50 pN, l'octamère et l'ADN sont complètement dissociés : les étirements suivants ne présentent plus alors ce type de discontinuités.

Nos premières études portant sur la fibre de chromatine reconstituée sur une séquence répétée de 5S ADN-r cadrent bien avec ces résultats. Nous observons aussi que la majorité des longueurs d'ADN libérées le sont autour de 24 nm, correspondant à environ 70 bp libérées en une seule fois. Les forces mises en jeu sont comparables, à taux de charge comparables (vitesse d'étirement comprise entre 20 et 100 nm s⁻¹).

Si les 24 nm d'ADN libérés correspondent à l'ADN enroulé de façon symétrique par rapport à l'axe de la dyade, alors il s'agit de l'ADN en contact quasi-exclusif avec le tétramère de H3-H4. Ainsi, si nous tirons sur des fibres reconstituées avec seulement les tétramères, nous nous attendons à obtenir des résultats similaires, ce qui est le cas : la distribution des longueurs est elle aussi centrée autour de 25 nm. Ces pics sont la signature de la libération de l'ADN essentiellement en contact avec le tétramère H3-H4.

Notons une différence entre ces deux études. Dans [27], il n'est pas fait mention d'une queue dans la distribution pour des longueurs nettement plus importantes que 24 nm . Ces longueurs excessives peuvent certes être liées à la rupture simultanée de nucléosomes ; mais dans ce cas pourquoi n'observons-nous pas le même phénomène, la même extension de la distribution, avec les étirements sur les fibres ne contenant que des tétramères ?

Une des explications possibles pourrait être une interaction inter-nucléosomale via les dimères H2A-H2B ou les queues N-terminale de ces histones. En effet, autour de 200 mM

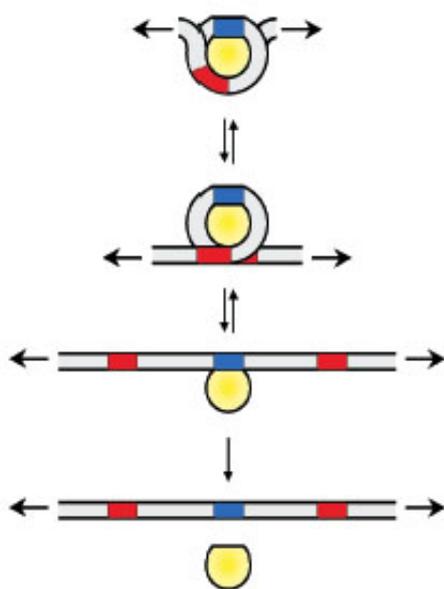


FIG. 5.1 – **Modèle en trois étapes de déroulement de la particule de cœur, proposé dans [27].** Pour une gamme de force autour de 10 pN, l'ADN est pelé symétriquement de la surface de l'octamère jusqu'à ce qu'il ne subsiste plus qu'un tour d'ADN enroulé. Ensuite, pour des taux de charges de l'ordre de 5 pN s^{-1} , le dernier tour est déroulé d'un seul coup, pour une force centrée autour de 20 pN, libérant 25 nm d'ADN. Ensuite selon la tension atteinte, les histones se détachent plus ou moins de l'ADN. Reproduit de [27]

en sels monovalents, les queues des histones ne sont pas condensées sur la NCP mais ont tendance à s'étendre dans le milieu et, c'est encore une hypothèse, pourraient être la source d'une interaction inter-nucléosomale [99][22]. Dans le même esprit, il a aussi été montré que les queues des histones (en particulier l'extrémité -N de H4) sont indispensables au repliement correct de la chromatine en une fibre de 30 nm [3][48].

Si nous comparons ces résultats avec ceux obtenus sur les fibres reconstituées avec l'extrait de *Xenopus Laevis*, nous pouvons tenter d'interpréter cette différence majeure dans la longueur moyenne d'ADN libérée : les protéines mimant l'histone de liaison, comme la protéine B4, ou les protéines de type HMG, peuvent avoir un rôle stabilisateur. D'après les clichés de microscopie électronique ou les expériences de digestion de la chromatine, ces protéines ferment les deux tours d'ADN autour de l'octamère d'histones et, du fait de leur queue C-terminale riche en résidus chargés positivement, maintiennent au contact les brins d'ADN entrant et sortant du nucléosome. En tirant sur une telle structure, c'est l'ensemble de l'ADN impliqué dans le chromatosome qui est libéré d'un seul coup, à cause de l'effet stabilisateur d'une protéine type histone de liaison.

Nous avons donc poursuivi notre étude avec des fibres de chromatine native, issues de noyaux d'érythrocytes de poulet. Dans le cas de ces fibres, tous les histones sont présentes, y compris les histones de liaison, majoritairement H5 et H1. Nous nous attendions à observer des pics ayant une largeur autour de 56 nm, soit 166 bp, pour correspondre aux données de digestion par la Mnase de ce type de chromatine, et à l'idée que nous avions sur le rôle de l'histone de liaison (d'après les clichés de microscopie électronique) : stabilisateur du nucléosome dans sa forme fermée.

Notre première série de résultats sur la chromatine native nous conforte dans cette interprétation. Si la force moyenne invoquée ne varie pas trop (on passe de 17 pN pour la chromatine reconstituée sur une séquence de type 5S, à 20 pN en moyenne pour ce type de chromatine, à taux de charge égale) c'est aussi le cas de la distribution en longueur d'ADN libérée. A nouveau la distribution est centrée autour de 24 nm avec toutefois un épaulement aux longueurs plus importantes encore plus flagrant que pour la chromatine reconstituée.

5.2.2 Etude de la dilution

A ce stade, une hypothèse s'offre à nous : au moment de l'étirement, notre chromatine native ne contient peut-être pas, ou alors en faibles proportions, l'histone de liaison. Nous nous retrouvons dans la configuration des expériences conduites sur la chromatine reconstituée à partir d'octamères d'histone seulement. Les résultats d'expériences de FRAP effectuées dans des cellules vivantes sur différentes régions du noyau montrent une grande mobilité de l'histone de liaison [105]. Elle diffuse constamment dans le nucléoplasme selon un mécanisme dit de "marche-arrêt" : diffusion libre dans le nucléoplasme puis fixation sur la chromatine pendant un temps moyen de 220 s, puis à nouveau diffusion, etc... Ceci suggère une barrière énergétique peu élevée à franchir pour pouvoir libérer ce type d'his-

tone de la sortie des NCP. A l'échelle de temps de nos expériences sur molécule unique, un tel relargage dans le milieu des histones de liaison est plus que probable.

Dans les expériences en molécule unique, les conditions de sels et de pH du noyau cellulaire (ou tout du moins dans lesquelles la chromatine est stable) sont en général respectées mais ce n'est pas le cas de la concentration en chromatine elle-même. Celle-ci est le plus souvent très diluée (< 1 nM). Dans ce cas, si l'histone de liaison est relarguée, la probabilité de fixation sur un autre nucléosome proche après une étape de diffusion est très faible, contrairement à ce qui se passe dans le noyau de la cellule. Elle est définitivement perdue pour l'expérience.

Si ce problème est rencontré avec les histones de liaisons, qu'en est-il pour les autres sous-unités composant l'octamère d'histones? En effet, il ne faut pas perdre de vue que l'octamère n'est pas une entité solide, un bloc, mais plutôt un complexe tripartite. Par exemple, en solution physiologique, l'octamère seul n'est pas stable, ce sont les dimères H2A-H2B et les tétramères H3-H4 qui sont stables séparément. L'ADN est indispensable pour stabiliser l'ensemble. Même en sa présence, il est possible de rencontrer des NCP incomplètes (cf 1.2.1), comme l'ont précisé les études de stabilité de la chromatine en fonction de la concentration mais aussi en fonction de la concentration en chromatine elle-même [93][174][71]. Même dans des conditions de sels et de pH physiologiques, il semble possible de rencontrer une association entre histones et l'ADN qui ne soit pas la NCP classique, mais plutôt un composé incomplet sans les dimères H2A-H2B. Le diagramme de [174] suggère que nous pouvons rencontrer cet état à nouveau pour de très faibles concentrations en chromatine, comme celles que nous sommes susceptibles d'avoir dans nos premières expériences sur molécule unique.

Etude de la dilution par migration sur gel

Afin de confirmer nos doutes quant à la composition de nos fibres de chromatine, natives ou reconstituées, quand elles sont fortement diluées, nous avons étudié la stabilité de NCP individuelles reconstituées sur une séquence type 601, et la stabilité de fragments de fibre de chromatine avec la dilution (et aussi en fonction du tampon). Les résultats obtenus lors de ces deux séries d'expériences vont bien dans le sens d'une déstabilisation de l'octamère d'histones croissant avec la dilution.

Cet effet pour de si faibles concentrations était difficile à mettre en évidence, et c'est la raison pour laquelle nous avons utilisé un marquage radioactif des histones. Une autre étude récente mentionne cet effet déstabilisateur de la dilution et montre un début de dissociation des dimères H2A-H2B des NCP pour quelques nM (et en l'absence de leur double doigt de polyacrylamide stabilisateur, qui vient s'insérer dans deux sillons majeurs de l'ADN enroulé autour de l'octamère).

L'histone la plus sensible à la dilution est, conformément aux multiples études précédentes, l'histone de liaison H5 ou H1 dans le cas de notre chromatine de poulet. Le seuil de dilution pour libérer les dimères H2A-H2B est plus élevé pour les NCP reconsti-

tuées sur une séquence 601 (10 nM) ; ayant pourtant une grande affinité pour positionner l'octamère d'histones ; que pour les NCP natives (5-2.5 nM). Les NCP sur la chromatine native ont été réellement assemblées par la cellule, ce qui pourrait les rendre plus stables que leurs homologues reconstituées. Nous ne pouvons pas écarter des effets stabilisateurs entre proches voisins dans la fibre native, effets que nous pouvons ne pas avoir dans le cas de NCP reconstituées.

Etude de la dilution par addition de chromatine exogène

Dans notre étude des propriétés élastiques des fibres de chromatine, nous avons tenté de stabiliser le plus possible les NCP en conservant les fibres destinées à être étirées dans un milieu concentré en chromatine. Plusieurs solutions ont été testées (cf 4.4). Les expériences réalisées en conditions dites stabilisantes, tant pour la chromatine native que pour la chromatine reconstituée, mettent en évidence une distribution bimodale des longueurs d'ADN libérées : le premier pic autour de 24 nm ; et le second autour de 50 nm que nous interprétons comme la signature de la libération en un seul évènement de l'ensemble de l'ADN enroulé autour de l'octamère d'histones, soit 147 bp environ.

Chromatine reconstituées sur une séquence répétée 5S ADN-r Un autre fait vient appuyer cette interprétation, c'est le nombre de discontinuités observées dans certains profils d'étirements de la chromatine reconstituée sur une séquence répétée de 5S r-ADN. Nous ne disposons sur ce fragment d'ADN que de 10 sites de fixation privilégiés pour l'octamère. La longueur totale de l'ADN autorise au plus, la reconstitution de 12 NCP. Pourtant, comme mentionné auparavant (cf 4.3.1), il est parfois possible de compter 17 discontinuités. Plusieurs d'entre elles semblant aller par paire.

La longueur d'ADN libérée lors du premier saut est de 24 nm en moyenne et celle libérée sur la totalité de l'évènement est de 50 nm environ. Il ne peut s'agir pour l'ensemble de ces évènements de la rupture simultanée de deux nucléosomes : leur nombre serait trop grand, comparé à la longueur de l'ADN disponible. Il est possible que, lors de ces ruptures particulières, nous visualisions un état intermédiaire instable dans le déroulement du nucléosome : le premier pic libérant 24 nm d'ADN correspondrait au premier tour d'ADN enroulé, le deuxième pour une force égale, voire légèrement inférieure, libère l'ADN restant, soit un tour aussi.

Une autre explication peut provenir d'une reconstitution imparfaite des NCP. Sur ces fibres, une partie des NCP serait complète alors que d'autres ne le seraient pas ; les NCP incomplètes seraient constituées d'un seul tétramère. L'ADN n'opérant qu'un seul tour autour des tétramères, la longueur disponible pour constituer d'autres NCP (ou tétramères + ADN) est plus grande, ce qui conduit ainsi à un surnombre de pics de rupture.

Mais cet argument portant sur une reconstitution imparfaite est invalidé dès lors que nos gels révèlent uniquement des nucléosomes (cf 4.5).

Chromatine native En affinant l'histogramme de la Fig (4.20) nous pouvons même distinguer quatre populations (Fig 5.2). Il n'existe pas de critère bien défini pour fixer l'échantillonnage maximum d'un histogramme cependant nous pouvons citer les critères proposés par Sturges ou par Scott [141][128]. Dans ces deux cas nous avons un échantillonnage trop fin pour pouvoir conclure avec certitude quant à la pertinence de ces pics dans la distribution ; même si les longueurs pour lesquelles ils sortent sont cohérentes avec un modèle de nucléosome plus ou moins dissocié. On peut suggérer l'identification suivante :

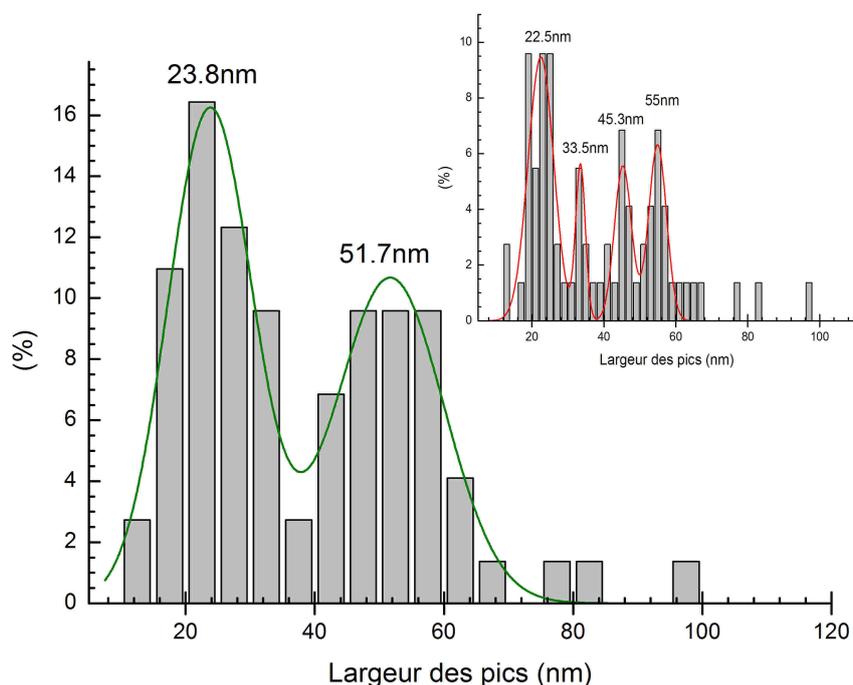


FIG. 5.2 – Même histogramme que la Fig (4.20) En insert, même distribution mais pour un échantillonnage plus fin, faisant apparaître quatre populations de longueurs qui peuvent être reliées à des quantités d'ADN mises en jeu dans le nucléosome.

- 22.5 nm \pm 3.5nm : tétramère
- 33.5 nm \pm 1.3 nm : tétramère plus 1 dimère (interprétation spéculative)
- 45.3 nm \pm 2.5 nm : octamère complet
- 55 nm \pm 2.5 nm : octamère complet + histone de liaison.

Nous avons montré par deux genres d'expériences (type molécule unique et biologie classique) que la dilution importante des fibres de chromatine, de l'ordre du nM, altère celles-ci ; La chromatine native résiste mieux à la dilution que la chromatine reconstituée sur une séquence répétée 5S, néanmoins dans les conditions classiques d'expériences en molécule unique, la plupart des NCP sont endommagées : elles perdent l'histone de liaison

mais aussi un voire deux dimères H2A-H2B. En revanche, le tétramère reste enroulé avec l'ADN. Ainsi, si on ne prend pas garde à stabiliser les NCP, les étirements ne se font pas sur des NCP complète comme on les trouve "in vivo". La stabilisation des NCP par ajout de chromatine exogène voire pas addition de détergent non ionique à une concentration avoisinant le mM, nous a permis d'étudier la rupture de NCP complète sous étirement. Cependant il subsiste de nombreuses questions en suspens : pourquoi les forces de rupture sont-elles si élevées ? Pourquoi subsiste il une grande proportion de pics autour de 24 nm (plus de 50%), et ce, même en condition stabilisant les NCP ? Enfin, pourquoi ne distinguons nous pas la présence de l'histone de liaison avec la chromatine native stabilisé alors que cela semble être le cas avec la protéine B4 et la chromatine reconstituée à partir d'extrait d'œufs de *Xenopus Laevis* ?

C'est à ces questions que nous tenterons d'apporter des éléments de réponses dans la section qui suit. Nous considérerons les propositions déjà faite à ce sujet et tenterons d'interpréter nos données dans ce contexte tout en nous appuyant sur le modèle de déroulement de nucléosome complet. Partis d'un modèle existant, nous l'avons complété avec la collaboration de Helmut Schiessel mais il reste encore à étayer pour pouvoir faire des prédictions expérimentales en vue de le confirmer.

5.3 Dynamique et stabilité du nucléosome

Tout le long de cette partie, nous nous replacerons sans cesse dans le contexte de la dynamique du nucléosome qui allie stabilité de la structure et accessibilité de son ADN. Nous essaierons d'interpréter nos résultats en gardant à l'esprit cette ambivalence, même si d'autres suggestions sont possibles, nous indiquant par là des pistes d'expériences à approfondir.

Il est difficile d'expliquer la présence d'un pic à 24 nm dans la distribution des longueurs pour les expériences sur la chromatine reconstituée. Les deux tours sont traités différemment dans le modèle proposé par Brower-Toland & al. : le premier tour est pelé symétriquement de la surface de l'octamère pour des forces avoisinant 8 pN, et le second libère l'ADN au cours d'un unique évènement très rapide, pour une force d'environ 20 pN (à taux de charge donné). L'explication proposée dans [27] pour expliquer cette différence de comportement entre les deux tours est difficile à argumenter : même au regard des données cristallographiques, en décomptant les liaisons aux points de contact ADN-histones, rien ne permet, *a priori*, d'expliquer une telle différence de force entre les deux tours, allant du double au triple.

5.3.1 Force nécessaire à la rupture d'un nucléosome.

Quel que soit le type de chromatine étirée, la distribution des forces associées à la rupture du nucléosome est centrée autour de 20 pN, cf 4.1 et aussi [21][27][26][35].

La première étude d'étirement menée sur la chromatine native fait aussi état d'une force d'environ 20 pN au delà de laquelle les profils présentent un net hystérésis entre les phases d'étirement et de relaxation [42]. Contrairement à nos expériences menées sur un substrat semblable, dans cette étude le dispositif employé n'offre pas une résolution suffisante pour distinguer la rupture de nucléosomes individuels (déplacement de la platine piézo-électrique par pas ≥ 50 nm). Néanmoins cet hystérésis est corrélé selon eux à la libération irréversible de l'ADN nucléosomal.

Seule une étude récente fait apparaître une distribution des forces de rupture beaucoup plus large [61] allant même près du plateau de transition B-S de l'ADN, ce qui peut laisser perplexe. En effet les zones proches du plateau B-S des courbes force-extension où sont supposés se dérouler puis se ré-enrouler le nucléosome ressemblent fortement à certains de nos profils obtenus avec des molécules d'ADN nues. Ces pics, dont la longueur n'est d'ailleurs pas bien définie, appartiennent probablement au signal de la transition B-S.

Il n'en reste pas moins que les forces nécessaires à la rupture d'un nucléosome par étirement sont élevées.

Des forces élevées

Effectivement, les forces mentionnées sont un ordre de grandeur plus élevées que celles évoquées pour peler l'ADN nucléosomal de la surface de l'octamère à l'équilibre thermodynamique. Des études mesurant le déroulement partiel des nucléosomes, sans force extérieure, à l'équilibre thermodynamique, suggèrent plutôt une énergie globale de $30 k_B T$ pour dérouler l'ensemble des 147 bp [147] : soit une force moyenne de 2.5 pN. Mais ces études ont été réalisées à très faible concentration de NCP, et le système est alors très sensible aux moindres variations des conditions (sels, température, impuretés dans la solution). Les mêmes auteurs ont montré par la suite qu'en réalité, avec de telles expériences, il est impossible de mesurer une énergie moyenne d'adhésion de l'ADN sur l'octamère [146].

Si aucune mesure directe de cette énergie d'adsorption n'est encore disponible, il est néanmoins possible d'en donner un ordre de grandeur à partir d'expériences utilisant des protéines, autres que les histones qui se lient naturellement à l'ADN nu [114][113][7][6]. Essentiellement pour des questions d'encombrements stériques, ces protéines sont incapables de se lier à l'ADN enroulé autour de l'octamère. Mais même dans ce mélange NCP + protéines, un équilibre s'établit entre l'ADN lié à l'octamère d'histones et l'ADN lié aux protéines. Ce sont en fait les fluctuations thermiques qui libèrent temporairement des segments d'ADN de l'octamère et auxquels peuvent alors s'accrocher les autres protéines. Avec un tel mécanisme, les bp situées près de l'axe de la dyade sont moins accessibles, d'un facteur $200 \sim$, que celles situées près de la sortie du nucléosome.

Ces expériences suggèrent une énergie d'adsorption par point d'ancrage autour de $2 k_B T$ [127], soit pour les 14 points d'ancrages que comptent la NCP une énergie globale de $28 k_B T$ par NCP.

Plus récemment, des expériences utilisant des techniques de fluorescence sur une collection de NCP [92][91] ou sur des NCP individuelles (FRET) [148], ont permis de mesurer des temps d'ouverture et de fermeture moyens de la NCP à l'équilibre : ~ 250 ms dans l'état fermé et ~ 50 ms dans un état où l'ADN n'est pas attaché aux 2-3 premiers sites au moins. Cependant la complexité des interactions entre ADN et octamères d'histones n'a pas encore permis d'évaluer correctement l'énergie d'adhésion entre ces deux entités, d'autant plus qu'il ne s'agit que de NCP isolées et non pas d'une véritable fibre de chromatine dans laquelle des interactions stabilisatrices inter-nucléosomales peuvent exister.

Pour expliquer ce désaccord entre les résultats d'expériences d'étirements et d'expériences plus classiques près de l'équilibre thermodynamique, plusieurs interprétations ont été proposées ; il s'agit de déterminer les mécanismes menant à une force de rupture si élevée.

Explications possibles

Barrière énergétique Une hypothèse retenue est la présence d'une barrière énergétique aux positions ± 40 bp par rapport à l'axe de la dyade de la NCP [27]. Mais après examen de la structure cristallographique de la NCP [96], il n'y a aucune raison de trouver une barrière énergétique d'importance à cette place plutôt qu'à une autre.

Loi de l'équilibre thermodynamique Une autre explication peut provenir du fait que l'étirement de la fibre n'est pas un processus qui se fait à l'équilibre thermodynamique [101]. Il faut tenir compte du taux de charge appliqué au système et dans ce cas, les forces prédites pour la libération de l'ADN nucléosomal sont au moins supérieures à 2 pN.

Rôle de l'électrostatique Les interactions électrostatiques non spécifiques jouent un rôle prépondérant dans la complexation du nucléosome. Certains modèles prédisent qu'à elles seules, elles peuvent rendre compte de cette force élevée pour dérouler les NCP (cf p.147), tandis que d'autres invoquent cette contribution de l'électrostatique de concert avec un aspect plus mécanique (cf p.148).

Condensation ionique Ce modèle, de [74], par sa simplicité, peut faire l'objet de nombreuses critiques mais il est aussi attrayant pour le physicien. Il ne tient pas compte des propriétés mécaniques de l'ADN ou du détails de la répartition des charges sur l'octamère d'histones mais considère le système globalement comme une NCP plus ou moins déroulée + l'ADN libéré.

Brièvement, l'idée est la suivante : la NCP est globalement chargée négativement, les charges positives des histones (~ 146 charges +) ne suffisent pas à compenser les : 147 (bp) $\times 2 = 294$ charges négatives du squelette sucre phosphate de l'ADN nucléosomal. La libération de l'ADN de la surface de l'octamère est énergétiquement défavorable car elle

s'accompagne d'une perte d'entropie issue de la condensation de cations sur l'ADN. Ce phénomène a été très étudié pour comprendre la complexation d'un macro-ion par une molécule filamenteuse de charge opposée, essentiellement l'ADN (cf section 1.3.1).

Les auteurs de [74] montrent qu'au début du déroulement de l'ADN, cette condensation défavorable est contre-balançée par une diminution globale de la charge négative du NCP, qui libère des anions dans la solution. Par contre, une fois atteinte la neutralité de la NCP partiellement déroulée, il devient très difficile de dérouler l'ADN, la condensation d'ions jouant doublement en la défaveur du déroulement : anions sur l'ADN et cations sur la NCP partielle. Cette neutralité est atteinte pour quasiment un tour d'ADN enlevé ; au-delà, il devient difficile d'atteindre l'état dissocié ADN + octamère, système dont l'énergie est plus élevée que celui de la NCP seule.

Mécanisme proposé par Kulič et Schiessel La possibilité que nous favorisons considère ce problème sous un aspect plus mécanique. Alors qu'une barrière énergétique aux positions $\sim \pm 40$ bp par rapport à l'axe de la dyade paraît peu probable, Schiessel & Kulič ont proposé un mécanisme pour la transition menant d'une configuration "1 tour d'ADN enroulé autour de l'octamère d'histones" à une configuration "ADN tendu + histones" [78] (cf 4.6). Nous avons modifié le modèle pour considérer les deux tours complet de l'ADN enroulé autour du nucléosome et avons examiné l'influence de l'énergie d'adsorption.

L'application d'une force aux extrémités de ce système sur ce modèle de NCP en bobine révèle deux puits de potentiel : l'un en $\alpha \approx 0$ et $\beta \approx 0$; c'est la bobine complète ; et l'autre pour $\alpha \approx \pi$ et $\beta \approx \pi$; c'est la bobine avec un tour de moins. Pour des forces de l'ordre de grandeur de celle exercée par les fluctuations thermiques, soit quelques pN, la hauteur de la barrière séparant ces deux puits est de quelques $k_B T$ (typiquement $4 k_B T$ à 4 pN).

Il est possible de franchir une telle barrière énergétique en des temps raisonnables : de l'ordre de 10^{-4} s. Cependant une fois libéré un tour complet d'ADN, il pourrait être plus difficile de libérer, même partiellement le second tour d'ADN : En effet, lors du déroulement du premier tour d'ADN, on bénéficie aussi de la répulsion électrostatique entre les deux tours enroulés. Lors du déroulement du second tour, nous ne bénéficions plus de cette répulsion et l'énergie d'adsorption apparente est fortement augmentée. Elle est à l'origine d'une barrière énergétique beaucoup plus importante que pour le premier tour, (Fig 5.3). C'est ce type de phénomène qui est supposé dans [78] et que nous avons introduit dans notre modèle à deux tours par l'intermédiaire d'une fonction type Heaviside, θ dans le terme d'énergie d'adsorption.

Là encore ce sont des interactions électrostatiques qui sont invoquées pour d'expliquer pourquoi les deux tours d'ADN nucléosomal semblent se comporter différemment dans les expériences de molécule unique. Mais dans ce modèle, ce sont des interactions répulsives

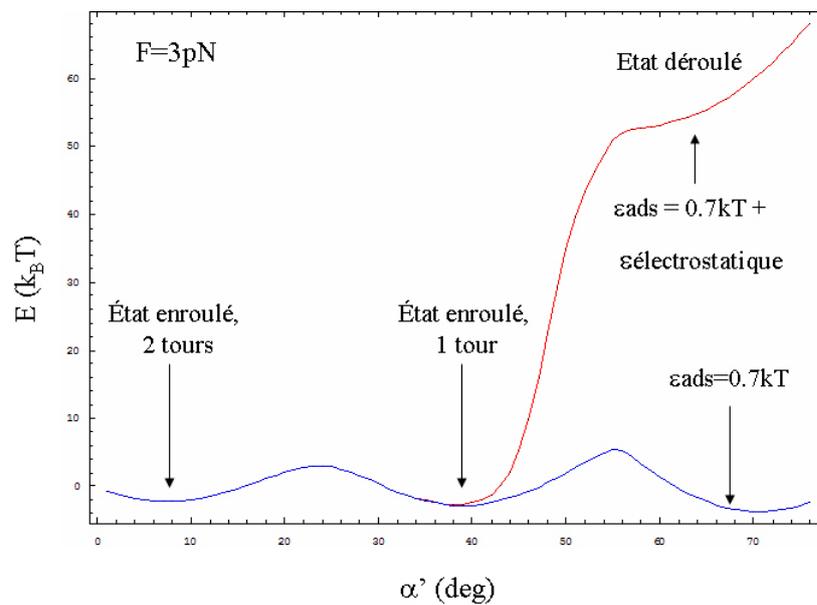


FIG. 5.3 – Comparaison des profils énergétiques selon l'énergie d'adsorption de l'ADN. Projection selon α des barrières énergétiques séparant les puits de potentiels décrits par notre modèle (cf section 4.6.2). Courbe bleue : l'énergie d'adsorption de l'ADN sur l'octamère est identique pour les deux tours. Courbe rouge : Les deux tours sont traités différemment ; la barrière énergétique séparant l'état enroulé à un tour et l'état déroulé est plus importante que dans le cas précédent car on tient compte de la suppression de la répulsion électrostatique ADN-ADN une fois que le premier tour d'ADN est déroulé.

entre brins d'ADN (et non plus un accroissement de l'entropie comme dans la section 5.3.1) qui sont responsables de cette barrière énergétique.

Bien qu'ayant distingué deux puits de potentiel avant d'accéder à un état ADN libre + bobine, nous verrons dans la section qui suit, que la barrière qui sépare ces deux puits est trop petite pour expliquer le déroulement successif des deux tours d'ADN à des forces avoisinant les 20 pN. Nous discutons de la validité du modèle, des hypothèses manquantes mais aussi des informations qu'il suggère sur la stabilité du nucléosome faiblement contraint.

5.3.2 Accès à l'ADN nucléosomal

Loin de l'image figée que peuvent en donner les structures obtenues par diffraction de rayons X, le nucléosome est une entité mobile : globalement, il peut être déplacé par des complexes protéiques sur l'ADN (CAF...). Mais il est aussi animé d'une dynamique interne : l'octamère d'histones, même s'il ressemble à une bobine sur les clichés de microscopie électronique, est une entité tripartite. Les dimères H2A-H2B sont souvent échangés ou enlevés par diverses classes de protéines (FACT, SWI/SNF) [106][9]. En revanche, le tétramère apparaît plus solidement lié à l'ADN.

ADN adsorbé

Avec le modèle décrit p. 135, Nous avons regardé l'influence de la force appliquée sur le paysage énergétique (Fig 5.4) et tenté d'esquisser les traits généraux du profil d'étirement d'une fibre reconstituée avec de tels NCP, toujours en liaison avec nos expériences.

Nous devrions observer la succession de phénomènes suivante : pour des force de 3-4 pN, le nucléosome oscille entre deux états, 2 tours ou 1 tour d'ADN enroulé. La barrière entre ces deux états étant de l'ordre de quelques $k_B T$ et le temps caractéristique de franchissement de l'ordre de 10^{-4} s. Dans un profil force-extension, à faible loading rate, on peut s'attendre à observer un plateau autour de 3 pN, témoin de cette coexistence. A des forces plus importantes, on attend un profil plus classique, en dents de scie, révélant la libération du second tour d'ADN, soit 25 nm \sim .

Ce modèle ne reproduit pas nos motifs de rupture libérant 50 nm d'ADN, soit les deux tours d'ADN déroulés en un seul évènement. Pour expliquer ce désaccord, nous supposons que le modèle doit très certainement aller un degré au dessus dans la description de l'interaction entre ADN nucléosomal et histones. En particulier, l'enchevêtrement des queues N-terminales des histones entre les deux tours de l'ADN nucléosomal (H4, H2A) ou de part et d'autre (H3, H2B) joue certainement un rôle en plus de la seule énergie d'adsorption. Le degré d'adsorption de ces extrémités -N sur l'ADN, qui varie avec la concentration saline [99], est lui aussi à prendre en compte.

Néanmoins, nous estimons que tous les pics libérant une longueur courte d'ADN ne correspondent pas à des nucléosomes incomplets : ainsi selon que la NCP est ouverte ou fermée au moment de l'étirement ; selon que les brins d'ADN entrants et sortants de la

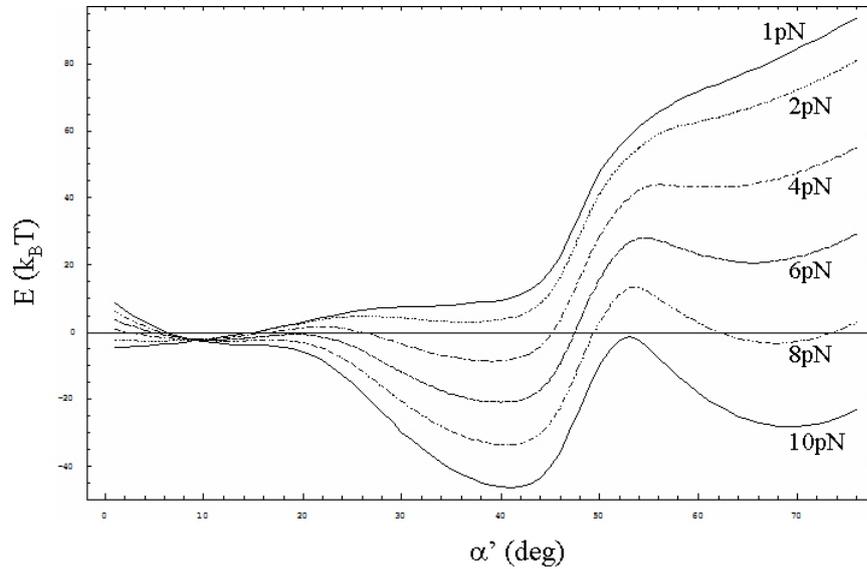


FIG. 5.4 – Evolution, avec la force appliquée des deux barrières énergétiques à franchir pour dérouler un nucléosome complet. L'énergie d'adsorption est supposée différente entre chaque tour, cf 5.3.1

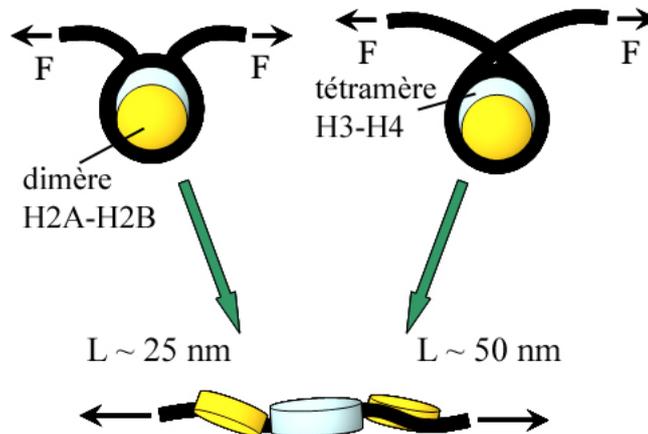


FIG. 5.5 – NCP en configuration ouverte ou croisée au moment de l'étirement ; longueur d'ADN libérée A gauche, NCP ouverte lors de l'étirement, seul un tour d'ADN est complet et donc susceptible de produire une signature visible sur le profil force-extension ; la longueur d'ADN alors libérée est de ~ 25 nm. A droite, NCP croisée (ou fermée) au moment de l'étirement. Deux tours d'ADN correspondant à une longueur de 50 nm sont libérés.

NCP se croisent ou non, alors ce seront 24 nm (sans croisement, Fig 5.5, gauche) ou 50 nm (avec croisement Fig 5.5, droite) qui seront libérés. Nous proposons que si la NCP est partiellement déroulée, alors, comme suggéré par [27] l'ADN est tout d'abord pelé de la surface de l'octamère, puis la bobine à un tour restant tourne sur elle-même pour libérer soudainement 25 nm d'ADN.

Si la NCP est fermée, alors la configuration géométrique interdit à l'ADN d'être pelé : on passe immédiatement à la rotation de la bobine sur elle-même et ce pour chacun des deux tours. La longueur d'ADN libéré est de 50 nm \sim . Encore une fois, le modèle ne nous permet pas d'interpréter ces événements mais nous pensons que ceci est dû au fait qu'il faudrait détailler plus précisément les interactions ADN-histones.

Ainsi, dans le cas de NCP reconstituées sur une séquence répétée positionnant l'octamère, les fluctuations de l'ADN sortants des NCP réduisent la probabilité de tirer sur des NCP fermées. Nous observons donc un pic autour de 50 nm mais qui ne pourra jamais réunir 100% de la distribution, comme le suggèrent les dernières expériences de FRET sur les NCP [148][91].

Nous pouvons aussi formuler une autre critique sur la façon de traiter la NCP. Tant dans les expériences que dans la modélisation, il faudrait considérer l'octamère d'histone non pas comme un simple cylindre, mais plutôt comme une particule composite constituée d'une partie centrale (le tétramère H3-H4) accolé à deux sous-unités (dimères H2A-H2B) dont la mobilité est fonction de leurs interactions avec le tétramère.

En effet il n'est pas clair qu'avec un étirement on produise un simple déroulement de l'ADN. D'une part parce que l'octamère n'existe pas seul autour de 100 mM NaCl : l'ADN est indispensable à l'assemblage de l'édifice. D'autre part, parce que les liaisons entre dimères et tétramères sont fragiles : seulement trois liaisons hydrogènes entre H4 et H2B [96]. Ainsi, en pelant l'ADN de la surface de l'octamère il est probable qu'on emporte (avec l'ADN pelé) les dimères H2A-H2B, et qu'on ne finisse plus par tirer que sur une série de tétramères H3-H4 (Fig 5.6) avec 25 nm d'ADN libérés d'un seul coup.

Bref, même si le modèle ne tient pas compte des détails de la NCP et ne nous fournit pas d'explication au déroulement des deux tours d'ADN simultanément, il permet tout de même de retrouver la force de rupture d'une NCP sous tension, et avec les hypothèses qui caractérisent l'énergie d'adsorption de l'ADN sur la NCP (cf 5.3.1) nous avons aussi là une explication possible de l'accessibilité de l'ADN nucléosomal à diverses protéines. C'est la répulsion électrostatique entre les deux tours d'ADN enroulés qui autorise la désorption partiel de l'ADN qui permet la fixation d'une protéine (ARN polymérase sur un promoteur...) à cet emplacement et qui en recrutant d'autres protéines, notamment de remodelage de la chromatine, devient opérationnelle sur le nucléofilament. Cet équilibre entre ADN adsorbé partiellement ou non sur l'octamère pourrait-être une façon de plus de réguler l'expression génétique.

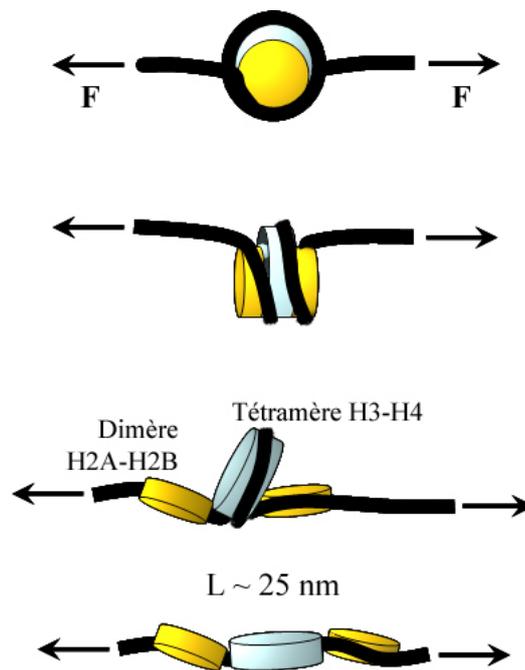


FIG. 5.6 – Dissociation de la NCP sous étirement. La première phase de l'étirement correspond à la dissociation de l'octamère d'histones : les dimères H2A-H2B se détachent du tétramère H3-H4. L'ADN entourant le tétramère est ensuite libéré par le processus de retournement décrit dans [78]. Dans ce cas la longueur d'ADN libérée est de $\sim 25 \text{ nm}$: même si la NCP est complète, elle n'est pas fermée au moment de l'étirement.

Effet et rôle de l'histone de liaison

Nous allons ici tenter de comprendre pourquoi nous semblons détecter la présence d'une protéine équivalente à l'histone de liaison dans l'extrait de *Xenopus Laevis*.

Chromatine reconstituée avec l'extrait d'œufs de *Xenopus Laevis* Dans nos fibres reconstituées avec l'extrait d'œufs de *Xenopus Laevis*, la protéine substitut de l'histone de liaison est la protéine B4. Elle est très certainement présente sur nos reconstitutions, et c'est ainsi que nous interprétons la différence majeure de longueur moyenne d'ADN déroulé entre ces expériences et celles produites sur les deux autres classes de chromatine. Cependant 68 nm est une longueur trop importante pour être simplement interprétée comme étant la longueur de l'ADN au contact de l'octamère + B4 (longueur totale ~ 56 nm).

Une explication possible pourrait provenir de la longueur totale d'ADN en interaction avec une protéine de liaison. En effet, même si nous ne disposons pas encore de cristaux de nucléosomes complets (avec l'histone de liaison), cette interaction pourrait mettre en jeu une longueur d'ADN plus importante que celle communément admise, qui ne prend en compte que la longueur au contact de la partie globulaire (structurée), de ce type de protéine. La longueur au contact avec la partie globulaire est d'environ 20 bp, résultat obtenu après digestion par la Mnase de nucléosome complet, et qui révèle une longueur d'ADN protégée de ~ 166 bp (NCP seule ~ 147 bp). Comme nous l'avons mentionné dans la partie introductive (cf 1.2.1), cette interaction entre l'extrémité N-terminale, *a priori* non structurée, de l'histone de liaison, et l'ADN de liaison est bien établie. La queue N-terminale, fortement chargée positivement, peut elle aussi jouer un rôle et impliquer une longueur d'ADN plus importante dans la structure à dérouler. Les travaux théoriques et de modélisation de [23] suggèrent un total d'environ 40 bp en interaction avec l'histone H1. Si ce nombre est similaire avec la protéine B4, c'est sur une libération d'un total de ~ 187 bp soit ~ 64 nm qu'il faut compter.

Cependant, en supposant vérifiée cette hypothèse attirante, il devient plus difficile de comprendre pourquoi ces 20 bp additionnelles ne sont pas détectées lors des expériences de digestion avec Mnase. L'explication pourrait certainement provenir de l'adhésion non spécifique d'autres protéines sur la fibre reconstituée, comme nous l'avons montré dans la section 4.2.3.

Pour détecter un effet de la protéine B4, nous avons réalisé le même type d'expériences mais avec un extrait dont nous avons éliminé cette protéine. Nous n'enregistrons pas de différence dans la force requise pour dérouler un nucléosome avec ou sans la protéine B4, et il en est de même pour la chromatine native et l'histone de liaison (cf paragraphe suivant). Par contre nous enregistrons une diminution dans la longueur d'ADN libérée, le pic principal de la distribution passant de 68 nm (avec B4) à 60 nm (sans B4). Cette diminution n'est certes qu'une tendance, car après un test T de Student, il s'avère que nous ne pouvons statistiquement pas distinguer les populations avec et sans B4. Nous

pensons que nous pouvons confirmer cette tendance, et donc confirmer l'effet de la protéine B4 en travaillant sur un extrait réellement déplété de B4. En effet, pour enlever cette protéine de l'extrait, nous avons utilisé une méthode d'immunoprécipitation, efficace à 95 %. Seulement, nous travaillons dans des conditions où la quantité d'ADN disponible est très faible ; alors, les 5 % de protéines B4 restantes sont suffisants pour encore constituer des nucléosomes complets. Il nous faut encore travailler avec un extrait dont B4 a été complètement éliminée.

Une étude d'étirement récente sur le même substrat (chromatine reconstituée à partir d'extraits d'œufs de *Xenopus Laevis*) semble, elle, distinguer les nucléosomes avec ou sans B4 non pas par une différence de force mais par une différence de longueur libérées sous étirement. Les auteurs ont aussi montré par une technique de DFS sur l'ensemble de leur étirement l'existence de trois sortes de barrières énergétiques, mais il n'y a aucune corrélation entre la hauteur de la barrière et la présence supposée de la protéine B4 [115].

Néanmoins, la composition de l'extrait n'étant pas complètement maîtrisée et l'interaction de ses composants avec l'ADN encore moins, nous ne sommes pas en mesure d'affirmer que nous détectons bien la protéine B4 et elle seule. Si nous voulons détecter un véritable effet de l'histone de liaison, nous devons plutôt regarder vers nos données sur la chromatine native.

Chromatine native Nous avons réussi à observer la rupture de nucléosomes individuels sur la chromatine native. Nous avons montré qu'avec de faibles concentrations en chromatine (~ 1 nM, conditions diluées), les dimères H2A-H2B sont libérés de la NCP. L'histone de liaison lié avec une plus faible affinité est lui aussi absent des nucléosomes incomplets que l'on trouve avec la chromatine native diluée (cf 4.5.2).

Dans les expériences où nous ajoutons de la chromatine exogène afin de stabiliser le nucléosome, les histones de liaisons sont présents, ce que viennent d'ailleurs confirmer les analyses sur gel.

La présence des histones de liaison H1 et H5 ne se manifeste ni dans la distribution des forces de ruptures, ni par l'apparition, nette, d'un pic autour de 56 nm dans la distribution des longueurs d'ADN libérées (cf section 5.2.2). Comment pouvons cependant détecter leur présence ?

Encore une fois, rappelons nous que l'affinité entre l'histone de liaison et l'ADN est plus faible que celle entre ADN sur l'octamère. C'est aussi ce que suggère les expériences visant à mesurer la mobilité des différents composants du nucléosomes *in vivo* par des techniques de fluorescence [105][87] : Une grande mobilité de l'histone de liaison qui s'explique par une affinité avec l'ADN plus faible que celle entre dimère H2A-H2B et ADN et à plus forte raison entre tétramère H3-H4 et ADN. Ainsi, nous pouvons suggérer que dès l'on commence à tirer sur l'ADN d'un nucléosome complet (i.e. avec l'histone de liaison), la force exercée réduit la barrière énergétique séparant l'état "nucléosome complet" de l'état "NCP + histone de liaison". Et l'histone de liaison est déconnecté de la structure (libéré

dans la solution ou encore adsorbé sur l'ADN) pour une force faible, de quelques pN, sans que cela ne soit détectable directement, en force comme en extension.

Pourtant nous devrions être capable de mesurer un effet indirect de cette histone sur nos profils d'étirements. D'après les données de microscopie électronique [20], et les modélisations moléculaires [23] l'histone de liaison se place temporairement à la sortie de la NCP. Ensuite selon le modèle proposé [20], en présence de l'histone de liaison qui écrante les répulsions électrostatiques, les brins d'ADN sortants de la NCP se croisent ($\Delta L_k = 2$) ou non ($\Delta L_k = 1$). En tirant sur ces nucléosomes, nous libérons soit 50 nm d'ADN d'un seul coup, si celui-ci était dans une configuration croisée ; soit 25 nm, si il était dans une configuration ouverte.

Ainsi, la présence initiale de l'histone de liaison a orienté une partie des NCP dans une configuration croisée (Fig 5.7). Néanmoins, toutes les NCP ne sont pas orientées dans cette configuration au moment de l'étirement, et, même en présence de H1 ou H5, nous ne pouvons pas espérer avoir l'ensemble des longueurs de rupture d'ADN autour de 50 nm sur un étirement classique où nous ne contrôlons pas la torsion (donc ΔL_k).

Nous ne savons pas ce qu'il advient de l'histone de liaison au cours de l'étirement. Est-il libéré pour des forces ≤ 10 pN, ou alors reste-t-il adsorbé sur l'ADN ? Nous ne pouvons pas dire avec certitude que nous détectons un effet direct de cette histone sur les longueurs d'ADN libérées ; c'est-à-dire, un pic dans la distribution autour de 56 nm, car la distribution est trop large autour de cette longueur pour véritablement trancher.

Pourtant, comparé au cas sans histone de liaison, nous devrions observé un accroissement des longueurs de rupture autour de 50 nm lorsque cette histone est présente. Si la présence de l'histone de liaison n'est ni détectable dans la distribution en force ou par un pic autour de 56 nm dans la distribution en longueur, elle doit se manifester par une plus grande proportion de pics autour de 50 nm pour les étirements chromatine complète avec H1 ou H5. Il semble que ce soit le cas en comparant directement Fig (4.20) et Fig (4.16) ; mais cette comparaison est abusive, ne traitant pas du même type de fibre de chromatine.

Cet effet serait une conséquence du rôle supposé de l'histone de liaison dans la régulation de l'expression génétique : l'histone de liaison pourrait intervenir en diminuant le temps d'accessibilité de l'ADN nucléosomal aux facteurs de transcription en réduisant considérablement les fluctuations des brins d'ADN entrants et sortants de la NCP [92][91][148] qui sont supposés être l'une des portes d'accès à cet ADN nucléosomal.

Nous commençons alors à avoir un contexte physique cohérent de la régulation de l'expression au niveau du nucléofilament : L'affinité de l'octamère d'histone pour une séquence d'ADN, la présence ou non de l'histone de liaison sur les NCP ou même l'acétylation de certains résidus des extrémités N-terminales des histones de cœur contrôle les fluctuations de l'ADN à la sortie de la NCP, et donc l'accessibilité de cet ADN nucléosomal aux facteurs de transcription. Ensuite il est plus difficile d'avoir une vision globale des mécanismes de régulation, ne connaissant pas encore tous les acteurs ni tout leurs rôles.

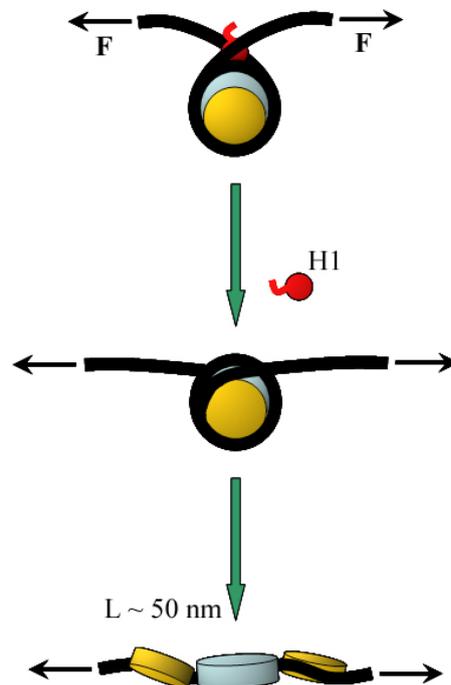


FIG. 5.7 – Schéma d'étirement du nucléosome complet ou de la NCP fermée qui conduit à la libération de 50 nm d'ADN. L'étirement d'une NCP fermée conduit à la libération de l'ADN nucléosomal d'un seul coup, soit ~ 50 nm. L'histone de liaison, H1, a pour effet d'augmenter la probabilité de tirer sur une NCP fermée : accroché plus faiblement à la NCP que les dimères H2A-H2B, il est libéré au tout début de l'étirement.

Toujours dans ce contexte de régulation et de rôle multiple, nous pouvons évoqué comment l'histone de liaison aide à la répression de la transcription. La microscopie électronique ne nous donne qu'une image figée du nucléosome : Nous n'avons qu'un accès très limité à la dynamique du nucléosome mais il est clair qu'en l'absence de H1, la NCP adopte une structure beaucoup plus ouverte, avec des bras d'ADN entrants et sortants sujets à l'agitation thermique [20].

Les expériences de types biologie moléculaire et de biophysique nous donne une information complémentaire ou l'histone de liaison est perçu beaucoup moins comme une colle qui lierait les brins d'ADN mais plutôt comme un ligand avec une faible affinité.

Nous pouvons envisager une implication de celui-ci à deux niveaux de régulation. Lorsque la répression de la transcription doit être forte, la chromatine est organisée en une fibre dense de chromatine, avec la participation de l'histone de liaison pour ordonner le repliement [69]. Puis nous rencontrons des états moins compacts de la fibre de chromatine dont le degré de condensation est aussi fonction du besoin de transcription :

Si un gène est transcrit très intensément (quasiment en continu) alors ce sont l'ensemble des nucléosomes qui sont enlevés, pour laisser l'ADN nu.

Entre les deux, si la transcription doit être modérée, alors le nucléosome (et toutes les transformations dont il peut être l'objet) est un outil de régulation modulable.

Structure et régulation vont de pair et utilisent les mêmes outils de bases : les histones.

Chapitre 6

Conclusion

6.1 Résumé

Cette thèse s'inscrit dans la recherche des propriétés mécaniques et de fonctionnement d'ensemble moléculaire biologique à partir d'expériences dite de molécule unique. Ce travail s'intéresse en particulier aux propriétés élastiques de fibres de chromatine et plus accessoirement à la transition B-S de l'ADN. Pour cela, nous utilisons une pince optique.

A l'interface physique-biologie, nous commençons en introduisant les connaissances qui ne vont pas de soit si on appartient plus fortement à l'une ou l'autre des communauté : nous faisons le point sur la chromatine ; puis nous nous attardons sur les concept rencontrés dans les expériences type molécule unique, développées ces dix dernières années (chapitre 1). Nous détaillons ensuite notre outil de travail : la pince optique. Nous expliquons nos choix expérimentaux : objectif à immersion eau, cellule d'expérimentation, détection ; et nos préparations biochimiques : préparations des billes et des différentes fibres de chromatines (chromatine reconstituée avec un extrait d'œufs de *Xenopus Laevis*, chromatine reconstituée sur une séquence répétée d'ADN positionnant l'octamère d'histones et chromatine native). Nous expliquons aussi le dispositif de pince magnéto-optique que nous avons mis au point afin d'appliquer un couple aux molécules d'ADN et à termes aux fibres de chromatine. Nous donnons alors un premier exemple de manipulation que nous avons réalisé avec ce dispositif sur des molécules d'ADN.

Nous exposons ensuite les résultats obtenus sur le plateau de transition B-S de molécule d'ADN nu (chapitre 2). Ces résultats ont été obtenu en parallèle avec nos expériences portant sur les fibres de chromatine. Nous nous sommes en particulier intéressés à l'hystérésis de ce plateau entre les phases d'étirement et de relaxation. A la lumière d'autres études et avec en plus, quelques étirements fortuits sur des molécules d'ADN endommagées, nous proposons un modèle pour expliquer comment se déroule le plateau B-S. Il est mixte, c'est à dire à la frontière entre deux modèles suggérés auparavant : A 65 pN environ, les régions riches en A-T se désappariaient tandis que les régions plus riches en

C-G restent appariées mais changent de structure. Ce n'est qu'au delà de 65 pN que ces régions se désappariaient elles aussi.

Nous mentionnons aussi comment un problème de préparation de l'ADN nous a conduit à produire des expériences de dégraissage de l'ADN.

Puis nous exposons l'ensemble des résultats obtenus sur trois types de chromatine différents (chapitre 3). Nous avons regardé pour la chromatine reconstituée à partir d'extrait d'œufs de *Xenopus Laevis* l'influence du rapport quantité d'ADN/quantité de protéines sur la cinétique de formation de la fibre.

Pour les deux autres types de fibres, chromatine native reconstituée sur une séquence répétée 5S (sans histone de liaison) et chromatine native issue d'érythrocytes de poulet (avec H5); nous avons regardé essentiellement l'influence de deux paramètres, la concentration saline et la concentration en chromatine elle-même. En complément, nous avons aussi étudié la réponse de fibre de tétramère H3-H4 reconstitués sur une séquence répétée 5S. En parallèle, nous montrons aussi les résultats d'expériences de dilutions de NCP, native et reconstituées, analysés sur gel d'électrophorèse. Ces résultats viennent confirmer ceux obtenus par étirement.

Nous exposons aussi un modèle que nous avons développé en collaboration avec H. Schiessel à partir du modèle qu'il avait proposé dans [77]. Il s'agit de décrire la rupture sous étirement d'un nucléosome complet, par la rotation deux fois de suite de l'octamère sur lui même.

Enfin, le chapitre 5 est consacré à la discussion des résultats sur la chromatine. Après avoir traité de la cinétique de formation, rapide, de la fibre de chromatine à partir d'extrait de *Xenopus Laevis*, dans les conditions de molécule unique; nous abordons le problème de la dilution importante des fibres natives ou reconstituées sur 5S. Nous travaillons *in vitro*, et l'environnement moléculaire est très différent de celui rencontré *in vivo*, même si les conditions de sels et de pH semblent respectées. Pour l'étude de certaines enzymes, ces conditions ne posent pas de problèmes, puisqu'ils fonctionnent très bien *in vitro* et sont fréquemment utilisés dans des manipulations de routine de biologie moléculaire. Par contre, un édifice moléculaire comme la chromatine est sensible à sa propre concentration, comme nous avons pu le montrer. Dans ce cas, même si les expériences sont rendues beaucoup plus contraignantes, nous avons aussi montré que nous pouvions stabiliser la chromatine en augmentant sa concentration. La plupart des dimères H2A-H2B restent alors attachés au tétramère : Cet effet se manifeste par l'apparition d'une longueur caractéristique supplémentaire dans la distribution des longueurs d'ADN libérées : 24 et 50 nm.

Ensuite nous discutons des forces nécessaires à la rupture du nucléosome, toujours trop importante par rapport à la gamme de force invoquée par des considérations d'équilibre thermodynamique. Nous poursuivons en développant le modèle de déroulement précédemment expliquer; la force de rupture du nucléosome est du même ordre de grandeur que celle déterminée expérimentalement. Néanmoins il ne nous permet pas d'interpréter l'ensemble de nos résultats, notamment la libération des 50 nm d'ADN en une seule fois.

Nous pensons que le modèle ne va pas assez loin dans la description du nucléosome et nous en proposons dans un premier temps de tenir compte de la structure tripartite de l'octamère d'histones : un tétramère H3-H4 et deux dimères H2A-H2B. Nous proposons ensuite quelques pistes à suivre pour comprendre comment les NCP sont dissociées avec l'étirement et comment nous pouvons enregistrer une signature indirecte de la présence de l'histone de liaison.

6.2 Perspectives

Les expériences concernant l'étude du plateau B-S sont à poursuivre : avec des molécules d'ADN courtes, (2 kbp maximum) présentant une séquence répétée. Celles ci pourront permettre de déterminer le pourcentage critique en C et G pour distinguer une région riche d'une région pauvre en C-G, dont nous avons une estimation autour de 60 %, après analyse du plateau lors de la relaxation.

Pour la chromatine, il faut encore déterminer avec certitude le réel mécanisme de rupture des nucléosomes étirés. Pour cela le couplage sur le même dispositifs des techniques de molécule unique avec des techniques de visualisation en temps réel. Nous pourrions par exemple déterminer si tous les histones sont présentes dans nos conditions ; si lors de la rupture du nucléosome sous tension, les histones sont relarguées dans le milieu ou pas ; et si oui, si elles le sont toutes etc... Ces techniques de visualisation à l'échelle de la molécule unique sont en plein développement, microscopie de fluorescence dans des milieux dilués, microscopie multiphotonique, nanocristaux, microscopie interférentielle, pour en citer quelques-unes.

Nous devons aussi répéter les expériences sur l'extrait de *Xenopus Laevis* sans B4. Pour éliminer la protéine B4 à quasiment 100 %, plutôt que d'utiliser des techniques d'immunoprécipitation, nous envisageons d'utiliser une construction d'ADN particulière : le "four way junction" pour lequel la protéine B4 a une affinité plus forte que pour la NCP. Il s'agit d'introduire dans l'extrait en grande quantité ces "four way junction", sur lesquels vont venir se fixer les protéines B4 (et éventuellement des protéines HMG) sans pour autant recruter les histones qui seront alors libres pour constituer une fibre de chromatine.

Enfin il faut aussi exploiter le degré de liberté de rotation. Nous pourrions ainsi tester véritablement notre modèle : selon le sens de la rotation imposé à la fibre, croiser l'ADN sortant des NCP ou le dérouler, ce qui, si le modèle est juste, devrait se manifester dans les proportions des populations d'ADN libéré autour de 24 et 50 nm après étirement. A plus long terme, le but est de regarder la transcription sur une fibre unique de chromatine afin de comprendre l'ARN polymérase et son cortège de facteurs de remodelage s'accomode de l'obstacle que représente le nucléosome.

Bibliographie

- [1] A. Ahsan, J. Rudnick, and R. Bruinsma. Elasticity theory of the B-DNA to S-DNA transition. *Biophys J*, 74(1) :132–7, Jan 1998.
- [2] Alberts. *Essential Cell Biology*. 1998.
- [3] J. Allan, N. Harborne, D.C. Rau, and H. Gould. Participation of core histone "tails" in the stabilization of the chromatin solenoid. *J Cell Biol*, 93(2) :285–97, May 1982.
- [4] J.F. Allemand, D. Bensimon, R. Lavery, and V. Croquette. Stretched and overwound DNA forms a Pauling-like structure with exposed bases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(24) :14152–7, Nov 1998.
- [5] S. Almagro, D. Riveline, T. Hirano, B. Houchmandzadeh, and S. Dimitrov. The mitotic chromosome is an assembly of rigid elastic axes organized by structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins and surrounded by a soft chromatin envelope. *J Biol Chem*, 279(7) :5118–26, Feb 2004.
- [6] J.D. Anderson, A. Thåström, and J. Widom. Spontaneous access of proteins to buried nucleosomal DNA target sites occurs via a mechanism that is distinct from nucleosome translocation. *Mol Cell Biol*, 22(20) :7147–57, Oct 2002.
- [7] J.D. Anderson and J. Widom. Sequence and position-dependence of the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites. *J Mol Biol*, 296(4) :979–87, Mar 2000.
- [8] D. Angelov, A. Molla, P.Y. Perche, F.Hans, J. Côté, S. Khochbin, P. Bouvet, and S. Dimitrov. The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol Cell*, 11(4) :1033–41, Apr 2003.
- [9] D. Angelov, A. Verdel, W. An, V. Bondarenko, F. Hans, C.M. Doyen, V.M. Studitsky, A. Hamiche, R.G. Roeder, P. Bouvet, and S. Dimitrov. SWI/SNF remodeling and p300-dependent transcription of histone variant H2ABbd nucleosomal arrays. *EMBO J*, 23(19) :3815–24, Sep 2004.
- [10] A. Ashkin. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Methods Cell Biol*, 55 :1–27, 1998.
- [11] A. Ashkin and J.M. Dziedzic. Observation of radiation-pressure trapping of particles by alternating light beams. *phys. rev. lett.*, 54(12) :1245–1248, Mar 1985.

- [12] A. Ashkin and J.M. Dziedzic. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*, 235(4795) :1517–20, Mar 1987.
- [13] A. Ashkin, J.M. Dziedzic, J.E. Bjorkholm, and S. Chu. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt. Lett.*, 11 :288–290, 1986.
- [14] J. Ausió. Are linker histones (histone H1) dispensable for survival? *Bioessays*, 22(10) :873–7, Oct 2000.
- [15] J. Ausió, D.W. Abbott, X. Wang, and S.C. Moore. Histone variants and histone modifications : a structural perspective. *Biochem Cell Biol*, 79(6) :693–708, 2001.
- [16] J. Ausio, D. Seger, and H. Eisenberg. Nucleosome core particle stability and conformational change. Effect of temperature, particle and NaCl concentrations, and cross-linking of histone H3 sulfhydryl groups. *J Mol Biol*, 176(1) :77–104, Jun 1984.
- [17] A. Banerjee, W. Yang, M. Karplus, and G.L. Verdine. Structure of a repair enzyme interrogating undamaged dna elucidates recognition of damaged dna. *Nature*, (434) :612–618, 2005.
- [18] D. Bartolo, I. Derényi, and A. Ajdari. Dynamic response of adhesion complexes : beyond the single-path picture. *Phys Rev E*, 65(5 Pt 1) :051910, May 2002.
- [19] J. Bednar, R.A. Horowitz, J. Dubochet, and C.L. Woodcock. Chromatin conformation and salt-induced compaction : three-dimensional structural information from cryoelectron microscopy. *J Cell Biol*, 131(6 Pt 1) :1365–76, Dec 1995.
- [20] J. Bednar, R.A. Horowitz, S.A. Grigoryev, L.M. Carruthers, J.C. Hansen, A.J. Koster, and C.L. Woodcock. Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(24) :14173–8, Nov 1998.
- [21] M.L. Bennink, S.H. Leuba, G.H. Leno, J. Zlatanova, B.G. de Grooth, and J. Greve. Unfolding individual nucleosomes by stretching single chromatin fibers with optical tweezers. *Nat Struct Biol*, 8(7) :606–10, Jul 2001.
- [22] A. Bertin, A. Leforestier, D. Durand, and F. Livolant. Role of histone tails in the conformation and interactions of nucleosome core particles. *Biochemistry*, 43(16) :4773–80, Apr 2004.
- [23] M.M.S. Bharath, N.R. Chandra, and M.R.S. Rao. Molecular modeling of the chromatosome particle. *Nucleic Acids Res*, 31(14) :4264–74, Jul 2003.
- [24] U. Bockelmann, P. Thomen, B. Essevaz-Roulet, V. Viasnoff, and F. Heslot. Unzipping DNA with optical tweezers : high sequence sensitivity and force flips. *Biophys J*, 82(3) :1537–53, Mar 2002.
- [25] C. Bouchiat, M.D. Wang, J.F. Allemand, T. Strick, S.M. Block, and V. Croquette. Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements. *Biophys J*, 76(1 Pt 1) :409–13, Jan 1999.

- [26] B. Brower-Toland, D.A. Wacker, R.M. Fulbright, J.T. Lis, W.L. Kraus, and M.D. Wang. Specific contributions of histone tails and their acetylation to the mechanical stability of nucleosomes. *J Mol Biol*, 346(1) :135–46, Feb 2005.
- [27] B.D. Brower-Toland, C.L. Smith, R.C. Yeh, J.T. Lis, C.L. Peterson, and M.D. Wang. Mechanical disruption of individual nucleosomes reveals a reversible multistage release of DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(4) :1960–5, Feb 2002.
- [28] R. Bruinsma. Electrostatic of DNA cationic lipid complexes : isoelectric instability. *Eur. Phys. J. B*, 4 :75, 1998.
- [29] Z. Bryant, M.D. Stone, J. Gore, S.B. Smith, N.R. Cozzarelli, and C. Bustamante. Structural transitions and elasticity from torque measurements on DNA. *Nature*, 424(6946) :338–41, Jul 2003.
- [30] R.B. Case, Y.P. Chang, S.B. Smith, J. Gore, N.R. Cozzarelli, and C. Bustamante. The bacterial condensin MukBEF compacts DNA into a repetitive, stable structure. *Science*, 305(5681) :222–7, Jul 2004.
- [31] R.B. Case, Y.P. Chang, S.B. Smith, J. Gore, N.R. Cozzarelli, and C. Bustamante. Retraction. *Science*, 307(5714) :1409, Mar 2005.
- [32] M. De Castro, R. Fondecave, Clarke, Schmidt, and R. Stewart. *Nature Cell Biology*, 2 :274, 2000.
- [33] G. Charvin, D. Bensimon, and V. Croquette. Single-molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-II topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(17) :9820–5, Aug 2003.
- [34] W.L. Cheung, S.D. Briggs, and C.D. Allis. Acetylation and chromosomal functions. *Curr Opin Cell Biol*, 12(3) :326–33, Jun 2000.
- [35] C. Claudet, D. Angelov, P. Bouvet, S. Dimitrov, and J. Bednar. Histone octamer instability under single molecule experiment conditions. *J Biol Chem*, Mar 2005.
- [36] C. Claudet and J. Bednar. Magneto-optical tweezers built around an inverted microscope. *Appl Opt*, 44(17) :3454–7, Jun 2005.
- [37] H. Clausen-Schaumann, M. Rief, C. Tolksdorf, and H.E. Gaub. Mechanical stability of single DNA molecules. *Biophys J*, 78(4) :1997–2007, Apr 2000.
- [38] P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J.L. Viovy, D. Chatenay, and F. Caron. DNA : an extensible molecule. *Science*, 271(5250) :792–4, Feb 1996.
- [39] S. Cocco, J. Yan, J.F. Léger, D. Chatenay, and J.F. Marko. Overstretching and force-driven strand separation of double-helix DNA. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 70(1 Pt 1) :011910, Jul 2004.
- [40] C. Costanzi and J.R. Pehrson. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature*, 393(6685) :599–601, Jun 1998.

- [41] T. Cremer and C. Cremer. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet*, 2(4) :292–301, Apr 2001.
- [42] Y. Cui and C. Bustamante. Pulling a single chromatin fiber reveals the force that maintain its higher-order structure. *PNAS*, 97(1) :127–132, January 4 2000.
- [43] J.R. Daban and C.R. Cantor. Structural and kinetic study of the self-assembly of nucleosome core particles. *J Mol Biol*, 156(4) :749–69, Apr 1982.
- [44] C.A. Davey, D.F. Sargent, K. Luger, A.W. Maeder, and T.J. Richmond. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 a resolution. *J Mol Biol*, 319(5) :1097–113, Jun 2002.
- [45] I. Derényi, D. Bartolo, and A. Ajdari. Effects of intermediate bound states in dynamic force spectroscopy. *Biophys J*, 86(3) :1263–9, Mar 2004.
- [46] M.N. Dessinges, B. Maier, Y. Zhang, M. Peliti, D. Bensimon, and V. Croquette. Stretching single stranded DNA, a model polyelectrolyte. *Phys Rev Lett*, 89(24) :248102, Dec 2002.
- [47] F. Dong, J.C. Hansen, and K.E. van Holde. DNA and protein determinants of nucleosome positioning on sea urchin 5S rRNA gene sequences in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(15) :5724–8, Aug 1990.
- [48] B. Dorigo, T. Schalch, K. Bystricky, and T.J. Richmond. Chromatin fiber folding : requirement for the histone H4 N-terminal tail. *J Mol Biol*, 327(1) :85–96, Mar 2003.
- [49] B. Dorigo, T. Schalch, A. Kulangara, S. Duda, R.R. Schroeder, and T.J. Richmond. Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science*, 306(5701) :1571–3, Nov 2004.
- [50] J. Dover, J. Schneider, M.A. Tawiah-Boateng, A. Wood, K. Dean, M. Johnston, and A. Shilatifard. Methylation of histone H3 by Compass requires ubiquitination of histone H2B by Rad6. *J Biol Chem*, 277(32) :28368–71, Aug 2002.
- [51] B. Essevaz-Roulet, U. Bockelmann, and F. Heslot. Mechanical separation of the complementary strands of DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(22) :11935–40, Oct 1997.
- [52] E. Evans. Probing the relation between force–lifetime–and chemistry in single molecular bonds. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 30 :105–28, 2001.
- [53] Y. Fan, T. Nikitina, E.M. Morin-Kensicki, J. Zhao, T.R. Magnuson, C.L. Woodcock, and A.I. Skoultchi. H1 linker histones are essential for mouse development and affect nucleosome spacing in vivo. *Mol Cell Biol*, 23(13) :4559–72, Jul 2003.
- [54] H. Felgner, O. Müller, and M. Schliwa. Calibration of light forces in optical tweezers. *Applied optics*, 34(6) :977–982, 1995.
- [55] G. Felsenfeld and M. Groudine. Controlling the double helix. *Nature*, 421(6921) :448–53, Jan 2003.

- [56] J.T. Finch and A. Klug. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(6) :1897–901, Jun 1976.
- [57] J.T. Finch, L.C. Lutter, D. Rhodes, R.S. Brown, B. Rushton, M. Levitt, and A. Klug. Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature*, 269(5623) :29–36, Sep 1977.
- [58] E.L. Florin, V.T. Moy, and H.E. Gaub. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science*, 264(5157) :415–7, Apr 1994.
- [59] M.E.J. Friese, T.A. Nieminen, N.R. Heckenberg, and H. Rubinsztein Dunlop. Optical alignment and spinning of laser-trapped microscopic particles. *Nature*, 394 :348, 1998.
- [60] T. Gautier, D.W. Abbott, A. Molla, A. Verdel, J. Ausio, and S. Dimitrov. Histone variant H2ABbd confers lower stability to the nucleosome. *EMBO Rep*, 5(7) :715–20, Jul 2004.
- [61] G.J. Gemmen, R. Sim, K.A. Haushalter, P.C. Ke, J.T. Kadonaga, and D.E. Smith. Forced unraveling of nucleosomes assembled on heterogeneous DNA using core histones, NAP-1, and ACF. *J Mol Biol*, 351(1) :89–99, Aug 2005.
- [62] C. Gosse and V. Croquette. Magnetic tweezers : micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophys J*, 82(6) :3314–29, Jun 2002.
- [63] S.A. Grigoryev and C.L. Woodcock. Stage-specific expression and localization of MENT, a nuclear protein associated with chromatin condensation in terminally differentiating avian erythroid cells. *Exp Cell Res*, 206(2) :335–43, Jun 1993.
- [64] S. Harlepp, T. Marchal, J. Robert, J.F. Léger, A. Xayaphoummine, H. Isambert, and D. Chatenay. Probing complex RNA structures by mechanical force. *Eur Phys J E*, 12(4) :605–15, Dec 2003.
- [65] M.J. Hendzel, M.A. Lever, E. Crawford, and J.P. H Th'ng. The C-terminal domain is the primary determinant of histone H1 binding to chromatin in vivo. *J Biol Chem*, 279(19) :20028–34, May 2004.
- [66] R.A. Horowitz, D.A. Agard, J.W. Sedat, and C.L. Woodcock. The three-dimensional architecture of chromatin in situ : electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon. *J Cell Biol*, 125(1) :1–10, Apr 1994.
- [67] B. Houchmandzadeh and S. Dimitrov. Elasticity measurements show the existence of thin rigid cores inside mitotic chromosomes. *J Cell Biol*, 145(2) :215–23, Apr 1999.
- [68] B. Houchmandzadeh, J.F. Marko, D. Chatenay, and A. Libchaber. Elasticity and structure of eukaryote chromosomes studied by micromanipulation and micropipette aspiration. *J Cell Biol*, 139(1) :1–12, Oct 1997.

- [69] A. T. Van Huynh, P.J.J. Robinson, and D. Rhodes. A method for the in vitro reconstitution of a defined "30 nm" chromatin fibre containing stoichiometric amounts of the linker histone. *J Mol Biol*, 345(5) :957–68, Feb 2005.
- [70] T. Ito. Nucleosome assembly and remodeling. *Curr Top Microbiol Immunol*, 274 :1–22, 2003.
- [71] S.N. Khrapunov, A.I. Dragan, A.V. Sivolob, and A.M. Zagariya. Mechanisms of stabilizing nucleosome structure. Study of dissociation of histone octamer from DNA. *Biochim Biophys Acta*, 1351(1-2) :213–22, Mar 1997.
- [72] H. Kimura. Histone dynamics in living cells revealed by photobleaching. *DNA Repair (Amst)*, May 2005.
- [73] R.D. Kornberg. Chromatin structure : a repeating unit of histones and DNA. *Science*, 184(139) :868–71, May 1974.
- [74] N. Korolev, A.P. Lyubartsev, and A. Laaksonen. Electrostatic background of chromatin fiber stretching. *J Biomol Struct Dyn*, 22(2) :215–26, Oct 2004.
- [75] D.A. Koster, V.Croquette, C. Dekker, S. Shuman, and N.H. Dekker. Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase IB. *Nature*, 434(7033) :671–4, Mar 2005.
- [76] H.A. Kramers. Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. *Physica*, 7 :284–304, 1940.
- [77] I.M. Kulic and H. Schiessel. Nucleosome repositioning via loop formation. *Biophys J*, 84(5) :3197–211, May 2003.
- [78] I.M. Kulic and H. Schiessel. DNA spools under tension. *Phys Rev Lett*, 92(22) :228101, Jun 2004.
- [79] A. La-Porta and M.D. Wang. Optical torque wrench : angular trapping, rotation, and torque detection of quartz microparticles. *Phys Rev Lett*, 92(19) :190801, May 2004.
- [80] B. Ladoux, J.P. Quivy, P. Doyle, O. du Roure, G. Almouzni, and J.L. Viovy. Fast kinetics of chromatin assembly revealed by single-molecule videomicroscopy and scanning force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(26) :14251–6, Dec 2000.
- [81] R. Lavery and A. Lebrun. Modelling DNA stretching for physics and biology. *Genetica*, 106(1-2) :75–84, 1999.
- [82] A. Lebrun and R. Lavery. Modelling extreme stretching of DNA. *Nucleic Acids Res*, 24(12) :2260–7, Jun 1996.
- [83] P. Leder and M.W. Nirenberg. Rna codewords and protein synthesis, 3. on the nucleotide sequence of a cysteine and a leucine rna codeword. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 52 :1521–9, Dec 1964.

- [84] S.H. Leuba, M.A. Karymov, M. Tomschik, R. Ramjit, P. Smith, and J. Zlatanova. Assembly of single chromatin fibers depends on the tension in the DNA molecule : magnetic tweezers study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(2) :495–500, Jan 2003.
- [85] S.H. Leuba, G. Yang, C. Robert, B. Samori, K. van Holde, J. Zlatanova, and C. Bustamante. Three-dimensional structure of extended chromatin fibers as revealed by tapping-mode scanning force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(24) :11621–5, Nov 1994.
- [86] S.H. Leuba, J. Zlatanova, M.A. Karymov, R. Bash, Y.Z. Liu, D. Lohr, R.E. Harrington, and S.M. Lindsay. The mechanical properties of single chromatin fibers under tension. *Single Mol.*, 1 :185–192, 2000.
- [87] M.A. Lever, J.P. Th'ng, X. Sun, and M.J. Hendzel. Rapid exchange of histone H1.1 on chromatin in living human cells. *Nature*, 408(6814) :873–6, Dec 2000.
- [88] M. Levitt. How many base-pairs per turn does DNA have in solution and in chromatin? Some theoretical calculations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(2) :640–4, Feb 1978.
- [89] J.F. Léger, J. Robert, L. Bourdieu, D. Chatenay, and J.F. Marko. RecA binding to a single double-stranded DNA molecule : a possible role of DNA conformational fluctuations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(21) :12295–9, Oct 1998.
- [90] J.F. Léger, G. Romano, A. Sarkar, J. Robert, L. Bourdieu, D. Chatenay, and J.F. Marko. Structural transitions of a twisted and stretched DNA molecule. *PRL*, 83(5) :1066–1069, 2 august 1999 1999.
- [91] G. Li, M. Levitus, C. Bustamante, and J. Widom. Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA. *Nat Struct Mol Biol*, 12(1) :46–53, Jan 2005.
- [92] G. Li and J. Widom. Nucleosomes facilitate their own invasion. *Nat Struct Mol Biol*, 11(8) :763–9, Aug 2004.
- [93] D.M. Lilley, M.F. Jacobs, and M. Houghton. The nature of the interaction of nucleosomes with a eukaryotic RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res*, 7(2) :377–99, Sep 1979.
- [94] J. Liphardt, B. Onoa, S.B. Smith, I. Tinoco, and C. Bustamante. Reversible unfolding of single RNA molecules by mechanical force. *Science*, 292(5517) :733–7, Apr 2001.
- [95] H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, and J. Darnell. *Molecular Cell Biology*. 1995.
- [96] K. Luger, A.W. Mäder, R.K. Richmond, D.F. Sargent, and T.J. Richmond. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648) :251–60, Sep 1997.
- [97] K. Luger, T.J. Rechsteiner, and T.J. Richmond. Preparation of nucleosome core particle from recombinant histones. *Methods Enzymol*, 304 :3–19, 1999.

- [98] A. Lusser and J.T. Kadonaga. Strategies for the reconstitution of chromatin. *Nat Methods*, 1(1) :19–26, Oct 2004.
- [99] S. Mangenot, A. Leforestier, P. Vachette, D. Durand, and F. Livolant. Salt-induced conformation and interaction changes of nucleosome core particles. *Biophys J*, 82(1 Pt 1) :345–56, Jan 2002.
- [100] J.F. Marko and E.D. Siggia. Statistical mechanics of supercoiled DNA. *Phys. Rev. E*, 52(3) :2912–2938, Sep 1995.
- [101] J.F. Marko and E.D. Siggia. Driving proteins off DNA using applied tension. *Biophys J*, 73(4) :2173–8, Oct 1997.
- [102] D.P. Mascotti and T.M. Lohman. Thermodynamic extent of counterion release upon binding oligolysines to single-stranded nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(8) :3142–6, Apr 1990.
- [103] J.D. McGhee, J.M. Nickol, G. Felsenfeld, and D.C. Rau. Higher order structure of chromatin : orientation of nucleosomes within the 30 nm chromatin solenoid is independent of species and spacer length. *Cell*, 33(3) :831–41, Jul 1983.
- [104] R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, and E. Evans. Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature*, 397(6714) :50–3, Jan 1999.
- [105] T. Misteli, A.Gunjan, R. Hock, M. Bustin, and D.T. Brown. Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cell. *Nature*, 408 :877–881, 2000.
- [106] T. Nakagawa, M. Bulger, M. Muramatsu, and T. Ito. Multistep chromatin assembly on supercoiled plasmid DNA by nucleosome assembly protein-1 and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *J Biol Chem*, 276(29) :27384–91, Jul 2001.
- [107] K.E. Neely, A.H. Hassan, A.E. Wallberg, D.J. Steger, B.R. Cairns, A.P. Wright, and J.L. Workman. Activation domain-mediated targeting of the SWI/SNF complex to promoters stimulates transcription from nucleosome arrays. *Mol Cell*, 4(4) :649–55, Oct 1999.
- [108] M.W. Nirenberg and J.H. Matthaei. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 47 :1588–602, Oct 1961.
- [109] H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, and K. Kinosita. Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature*, 386(6622) :299–302, Mar 1997.
- [110] T. Odijk. Stiff chain and filament under tension. *Macromolecules*, 28 :7016, 1995.
- [111] A.L. Olins and D.E. Olins. Spheroid chromatin units (v bodies). *Science*, 183(122) :330–2, Jan 1974.

- [112] L. Paterson, M.P. MacDonald, J. Arlt, W. Sibbett, P.E. Bryant, and K. Dhoklakia. Controlled rotation of optically trapped microscopic particles. *Science*, 292(5518) :912–4, May 2001.
- [113] K.J. Polach and J. Widom. Mechanism of protein access to specific DNA sequences in chromatin : a dynamic equilibrium model for gene regulation. *J Mol Biol*, 254(2) :130–49, Nov 1995.
- [114] K.J. Polach and J. Widom. A model for the cooperative binding of eukaryotic regulatory proteins to nucleosomal target sites. *J Mol Biol*, 258(5) :800–12, May 1996.
- [115] L.H. Pope, M.L. Bennink, K.A. van Leijenhurst-Groener, D. Nikova, J. Greve, and J.F. Marko. Single chromatin fiber stretching reveals physically distinct populations of disassembly events. *Biophys J*, 88(5) :3572–83, May 2005.
- [116] D. Pruss, B. Bartholomew, J. Persinger, J. Hayes, G. Arents, E.N. Moudrianakis, and A.P. Wolffe. An asymmetric model for the nucleosome : a binding site for linker histones inside the DNA gyres. *Science*, 274(5287) :614–7, Oct 1996.
- [117] V. Ramakrishnan, J.T. Finch, V. Graziano, P.L. Lee, and R.M. Sweet. Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature*, 362(6417) :219–23, Mar 1993.
- [118] T.J. Richmond and C.A. Davey. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*, 423(6936) :145–50, May 2003.
- [119] M. Rief, H. Clausen-Schaumann, and H.E. Gaub. Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules. *Nat Struct Biol*, 6(4) :346–9, Apr 1999.
- [120] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J.M. Fernandez, and H.E. Gaub. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science*, 276(5315) :1109–12, May 1997.
- [121] Y. Rondelez, G. Tresset, T. Nakashima, Y. Kato-Yamada, H. Fujita, S. Takeuchi, and H. Noji. Highly coupled ATP synthesis by F1-ATPase single molecules. *Nature*, 433(7027) :773–7, Feb 2005.
- [122] I. Rouzina and V.A. Bloomfield. Force-induced melting of the DNA double helix 1. Thermodynamic analysis. *Biophys J*, 80(2) :882–93, Feb 2001.
- [123] I. Rouzina and V.A. Bloomfield. Force-induced melting of the DNA double helix. 2. Effect of solution conditions. *Biophys J*, 80(2) :894–900, Feb 2001.
- [124] L. Sacconi, G. Romano, R. Ballerini, M. Capitano, M. De Pas, M. Giuntini, D. Dunlap, L. Finzi, and F.S. Pavone. Three dimensionnal magneto-optic trap for micro-object manipulation. *Optics letters*, 26(17) :1359–1361, September 2001.
- [125] J. Samuel and S. Sinha. Molecular elasticity and the geometric phase. *Phys Rev Lett*, 90(9) :098305, Mar 2003.

- [126] A. Sarkar, J.F. Léger, D. Chatenay, and J.F. Marko. Structural transitions in DNA driven by external force and torque. *Phys Rev E*, 63(5 Pt 1) :051903, May 2001.
- [127] H. Schiessel. The physics of chromatin. *J. Phys. Cond. Matter*, 15 :699–774, 2003.
- [128] D. Scott. On optimal and data-based histograms. *Biometrika*, 66 :605–610, 1979.
- [129] P. Sens and J.F. Joanny. Counterion release and electrostatic adsorption. *Phys Rev Lett*, 84(21) :4862–5, May 2000.
- [130] Y. Shi, F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J.R. Whetstone, P.A. Cole, R.A. Casero, and Y. Shi. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, 119(7) :941–53, Dec 2004.
- [131] R.T. Simpson, F. Thoma, and J.M. Brubaker. Chromatin reconstituted from tandemly repeated cloned DNA fragments and core histones : a model system for study of higher order structure. *Cell*, 42(3) :799–808, Oct 1985.
- [132] S.B. Smith, Y. Cui, and C. Bustamante. Overstretching B-DNA : the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science*, 271(5250) :795–9, Feb 1996.
- [133] S.B. Smith, L. Finzi, and C. Bustamante. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science*, 258(5085) :1122–6, Nov 1992.
- [134] D.L. Spector. The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu Rev Biochem*, 72 :573–608, 2003.
- [135] C.G. Spilianakis, M.D. Lalioti, T. Town, G.R. Lee, and R.A. Flavell. Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature*, 435(7042) :637–45, Jun 2005.
- [136] A. Stein. DNA folding by histones : the kinetics of chromatin core particle reassembly and the interaction of nucleosomes with histones. *J Mol Biol*, 130(2) :103–34, May 1979.
- [137] B.D. Strahl and C.D. Allis. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765) :41–5, Jan 2000.
- [138] J.K. Strauss and L.J. Maher. DNA bending by asymmetric phosphate neutralization. *Science*, 266(5192) :1829–34, Dec 1994.
- [139] T.R. Strick, J.F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, and V. Croquette. The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science*, 271(5257) :1835–7, Mar 1996.
- [140] T. Strunz, K. Oroszlan, I. Schumakovitch, H. Güntherodt, and M. Hegner. Model energy landscapes and the force-induced dissociation of ligand-receptor bonds. *Biophys J*, 79(3) :1206–12, Sep 2000.

- [141] H.A. Sturges. The choice of a class interval. *Journal of the american statistical association*, 21 :65–66, 1929.
- [142] K. Svoboda and S.M. Block. Biological applications of optical forces. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 23 :247–85, 1994.
- [143] K. Svoboda, C.F. Schmidt, B.J. Schnapp, and S.M. Block. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature*, 365(6448) :721–7, Oct 1993.
- [144] F. Thoma, T. Koller, and A. Klug. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol*, 83(2 Pt 1) :403–27, Nov 1979.
- [145] J.O. Thomas. Histone H1 : location and role. *Curr Opin Cell Biol*, 11(3) :312–7, Jun 1999.
- [146] A. Thåström, J.M. Gottesfeld, K. Luger, and J. Widom. Histone-DNA binding free energy cannot be measured in dilution-driven dissociation experiments. *Biochemistry*, 43(3) :736–41, Jan 2004.
- [147] A Thåström, PT Lowary, and J Widom. Measurement of histone-DNA interaction free energy in nucleosomes. *Methods*, 33(1) :33–44, May 2004.
- [148] M. Tomschik, H. Zheng, K. van Holde, J. Zlatanova, and S.H. Leuba. Fast, long-range, reversible conformational fluctuations in nucleosomes revealed by single-pair fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(9) :3278–83, Mar 2005.
- [149] Y. Tsuda, H. Yasutake, A. Ishijima, and T. Yanagida. Torsional rigidity of single actin filaments and actin-actin bond breaking force under torsion measured directly by in vitro micromanipulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(23) :12937–42, Nov 1996.
- [150] K.F. Tóth, T.A. Knoch, M. Wachsmuth, M. Frank-Stöhr, M. Stöhr, C.P. Bacher, G. Müller, and K. Rippe. Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin. *J Cell Sci*, 117(Pt 18) :4277–87, Aug 2004.
- [151] B.M. Turner. Histone acetylation and control of gene expression. *J Cell Sci*, 99 (Pt 1) :13–20, May 1991.
- [152] J.K. Tyler. Chromatin assembly. Cooperation between histone chaperones and ATP-dependent nucleosome remodeling machines. *Eur J Biochem*, 269(9) :2268–74, May 2002.
- [153] K.E. Van-Holde. *Chromatin*. Springer series in molecular biology. Springer-Verlag, 1988.
- [154] K. Visscher and S.M. Block. Versatile optical traps with feedback control. *Methods Enzymol*, 298 :460–89, 1998.

- [155] G. Wagner, A. Bancaud, J.P. Quivy, C. Clapier, G. Almouzni, and J.L. Viovy. Compaction kinetics on single DNAs : purified nucleosome reconstitution systems versus crude extract. *Biophys J*, Aug 2005.
- [156] M.D. Wang, M.J. Schnitzer, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S.M. Block. Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase. *Science*, 282(5390) :902–7, Oct 1998.
- [157] M.D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S.M. Block. Stretching DNA with optical tweezers. *Biophys J*, 72(3) :1335–46, Mar 1997.
- [158] J.D. Watson and F.H. Crick. Molecular structure of nucleic acids ; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356) :737–8, Apr 1953.
- [159] J.R. Wenner, M.C. Williams, I. Rouzina, and V.A. Bloomfield. Salt dependence of the elasticity and overstretching transition of single DNA molecules. *Biophys J*, 82(6) :3160–9, Jun 2002.
- [160] H.R. Widlund, H. Cao, S. Simonsson, E. Magnusson, T. Simonsson, P.E. Nielsen, J.D. Kahn, D.M. Crothers, and M. Kubista. Identification and characterization of genomic nucleosome-positioning sequences. *J Mol Biol*, 267(4) :807–17, Apr 1997.
- [161] J. Widom. Chromatin structure : linking structure to function with histone H1. *Curr Biol*, 8(22) :R788–91, Nov 1998.
- [162] J. Widom and A. Klug. Structure of the 300A chromatin filament : X-ray diffraction from oriented samples. *Cell*, 43(1) :207–13, Nov 1985.
- [163] M.C. Williams, I. Rouzina, and V.A. Bloomfield. Thermodynamics of DNA interactions from single molecule stretching experiments. *Acc Chem Res*, 35(3) :159–66, Mar 2002.
- [164] M.C. Williams, J.R. Wenner, I. Rouzina, and V.A. Bloomfield. Effect of pH on the overstretching transition of double-stranded DNA : evidence of force-induced DNA melting. *Biophys J*, 80(2) :874–81, Feb 2001.
- [165] M.C. Williams, J.R. Wenner, I. Rouzina, and V.A. Bloomfield. Entropy and heat capacity of DNA melting from temperature dependence of single molecule stretching. *Biophys J*, 80(4) :1932–9, Apr 2001.
- [166] S.P. Williams, B.D. Athey, L.J. Muglia, R.S. Schappe, A.H. Gough, and J.P. Langmore. Chromatin fibers are left-handed double helices with diameter and mass per unit length that depend on linker length. *Biophys J*, 49(1) :233–48, Jan 1986.
- [167] A.P. Wolffe. Histone H1. *Int J Biochem Cell Biol*, 29(12) :1463–6, Dec 1997.
- [168] A.P. Wolffe, S. Khochbin, and S. Dimitrov. What do linker histones do in chromatin? *Bioessays*, 19(3) :249–55, Mar 1997.
- [169] A.P. Wolffe, J. Wong, and D. Pruss. Activators and repressors : making use of chromatin to regulate transcription. *Genes Cells*, 2(5) :291–302, May 1997.

- [170] C.L. Woodcock and S. Dimitrov. Higher-order structure of chromatin and chromosomes. *Curr Opin Genet Dev*, 11(2) :130–5, Apr 2001.
- [171] C.L. Woodcock, L.L. Frado, and J.B. Rattner. The higher-order structure of chromatin : evidence for a helical ribbon arrangement. *J Cell Biol*, 99(1 Pt 1) :42–52, Jul 1984.
- [172] W.H. Wright, G.J. Sonek, and M.W. Berns. Radiation trapping forces on microspheres with optical tweezers. *Appl. Phys. Lett.*, 63(6) :715–717, 1993.
- [173] G.J. Wuite, R.J. Davenport, A. Rappaport, and C. Bustamante. An integrated laser trap/flow control video microscope for the study of single biomolecules. *Biophys J*, 79(2) :1155–67, Aug 2000.
- [174] T.D. Yager, C.T. McMurray, and K.E. van Holde. Salt-induced release of DNA from nucleosome core particles. *Biochemistry*, 28(5) :2271–81, Mar 1989.
- [175] J. Yan, D. Skoko, and J.F. Marko. Near-field-magnetic-tweezer manipulation of single DNA molecules. *Phys Rev E*, 70(1 Pt 1) :011905, Jul 2004.
- [176] H. Yin, M.D. Wang, K. Svoboda, R. Landick, S.M. Block, and J. Gelles. Transcription against an applied force. *Science*, 270(5242) :1653–7, Dec 1995.
- [177] J. Zlatanova and S.H. Leuba. Stretching and imaging single DNA molecules and chromatin. *J Muscle Res Cell Motil*, 23(5-6) :377–95, 2002.
- [178] J. Zlatanova and S.H. Leuba. Chromatin fibers, one-at-a-time. *J Mol Biol*, 331(1) :1–19, Aug 2003.
- [179] J. Zlatanova, S.M. Lindsay, and S.H. Leuba. Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope. *Prog Biophys Mol Biol*, 74(1-2) :37–61, 2000.

Résumé/Summary

Cette thèse s'inscrit dans la recherche des propriétés mécaniques de la fibre de chromatine et de leur rôle. Après un rappel de connaissances sur la chromatine, nous introduisons les techniques de manipulations de molécules uniques en biophysique. Nous exposons ensuite le dispositif de pince optique que nous avons mis en IJuvre ainsi que les développements plus récents de manipulations à l'aide d'un champ magnétique rotatif.

Nous discutons alors des résultats obtenus sur la transition B-S de l'ADN et tentons de les interpréter en invoquant une différence de comportement sous étirement selon que la séquence est riche en A-T ou en G-C.

Les résultats des étirements sur trois principaux types de chromatine sont ensuite présentés : force nécessaire à la rupture d'un nucléosome et longueur d'ADN libérée. En faisant varier les conditions d'étirements (essentiellement concentrations salines et concentrations en chromatine exogène), en modifiant la composition de la fibre de chromatine, nous montrons que le nucléosome n'est pas une entité stable dans les conditions diluées classique des expériences sur molécules uniques. Nous confirmons par ailleurs ce résultats avec des expériences de dilution suivit d'analyse sur gel d'électrophorèse.

Les résultats établis après stabilisation nous invitent à poursuivre la discussion du déroulement du nucléosome sous tension à partir d'un modèle existant. Sur la base de ces résultats, nous tentons alors de donner une interprétation du déroulement du nucléosome que nous recadrons dans le contexte de la régulation génétique à l'échelle du nucléofilament.

This thesis is registered in the research context of the mechanical properties of the chromatin fibre and their role. After recalling the main knowledge on chromatin, we introduce the principal techniques for the manipulation of single molecule in the field of biophysics. We then expose our experimental setup we have developed and although the additional technique we have built more recently which enable the micro-manipulation with a rotative magnetic field.

Then we discuss our results on the DNA B-S transition : we suppose different behaviours of the DNA under tension according to the composition in base pair of a part of the DNA sequence (rich in C-G or not).

We present the results of the stretching on three main type of chromatin : force to disrupt a nucleosome and length of DNA released. We demonstrate that the nucleosome is not stable under the classical conditions of single molecule experiment : when the sample is too diluted. We have confirmed these results with dilution experiments followed up of gel electrophoresis analysis.

To understand our results established on stable chromatin fibres, we develop an already existing model. We try to gain information on the unwinding nucleosome under stretching for a better comprehension of the genetic regulation at the scale of the nucleofilament.