



HAL
open science

Etude du mécanisme d'action des facteurs de remodelage de la chromatine, à l'échelle de la molécule unique.

Elise Praly

► To cite this version:

Elise Praly. Etude du mécanisme d'action des facteurs de remodelage de la chromatine, à l'échelle de la molécule unique.. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2009. Français. NNT: . tel-00397683

HAL Id: tel-00397683

<https://theses.hal.science/tel-00397683>

Submitted on 22 Jun 2009

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.



UNIVERSITE PARIS.DIDEROT
(Paris 7)



ECOLE NORMALE SUPERIEURE
DEPARTEMENT DE PHYSIQUE
Laboratoire de physique statistique

ECOLE DOCTORALE : Constituants élémentaires ↔ Systèmes complexes

DOCTORAT : Interfaces Physique - Biologie

Elise PRALY

Etude du mécanisme d'action des facteurs de remodelage de la chromatine, à l'échelle de la molécule unique

Thèse dirigée par David BENSIMON

A soutenir publiquement le vendredi 19 juin 2009.

JURY

M.	David	BENSIMON	Directeur de thèse
Mme	Cendrine	FAIVRE-MOSKALENKO	Rapporteur
Mme	Sylvie	HENON	Examineur
M.	Marcelo	NOLLMANN	Examineur
M.	Tom	OWEN-HUGHES	Invité
M.	Jean-Marc	VICTOR	Rapporteur

Remerciements

Un manuscrit de 250 pages, voilà ce que j'ai proposé aux deux rapporteurs de ce travail de thèse, Cendrine Faivre-Moskalenko et Jean-Marc Victor, à la fin du mois d'avril 2009. Malgré la longueur du texte, ils en ont tous deux fait une lecture consciencieuse, soulignant quelques coquilles ou références oubliées, suggérant quelques ajouts, me questionnant sur certains résultats, rédigeant un rapport détaillé de ce travail et le tout, en un temps record ! Merci à vous pour cet investissement, merci également aux autres chercheurs qui ont accepté d'évaluer mon travail de recherche - Sylvie Hénon, Marcelo Nollmann et Tom Owen-Hughes - et j'espère que nous pourrons poursuivre ces discussions lors de la soutenance.

Ce manuscrit de thèse est l'aboutissement de près de quatre années de recherche effectuées au sein de l'équipe de physique des biomolécules à l'ENS Paris. Le travail expérimental effectué a été ponctué par de nombreux moments de frustration inhérents aux expériences (pour les connaisseurs : *perte de LA bonne molécule, capillaire collant, bugs de XVin,...*) ainsi que d'autres riches en émotion quand, par exemple, une activité enzymatique est enfin observée après plusieurs heures d'attente ! Il m'aurait été difficile de réaliser ceci sans la présence et la participation de l'ensemble des membres de cette équipe agréable et dynamique. Vous avez été pour moi, une véritable famille d'adoption ! Je voulais en profiter pour faire quelques remerciements plus particuliers : d'abord, un grand merci à mon directeur de thèse, David Bensimon, dont l'optimisme a été une véritable aide dans les moments les plus difficiles de ma thèse ; un grand merci également à Vincent Croquette qui a toujours été très disponible et a contribué au succès des expériences grâce à ses talents d'expérimentateur (*qu'il s'agisse de mécanique, d'électronique, de programmation,...* *il est imbattable et restera pour moi un modèle !*). Merci à JF pour ses encouragements permanents, ses conseils avisés, son côté pragmatique qui m'a permis de gagner un temps précieux dans mon travail, merci également pour m'avoir encouragé à postuler pour un poste de Caïman (*c'est vraiment une expérience enrichissante, et c'est grâce à toi !*) et m'avoir fait découvrir Rollinger et sa cuisine d'exception ! Je garderai également un excellent souvenir de Keir Neuman au contact duquel j'ai beaucoup appris au début de ma thèse, de Giuseppe Lia qui m'a initié à la manipulation des facteurs de remodelage (*et dont le Risotto à l'encre de sèche et le Tiramisu sont à tomber !*), de Pierre Neveu (*le meilleur biologiste parmi les physiiciens*), et de tous les autres : Adrien Méglia (*et son goût pour les excellents crus !*), Thomas Julou (*merci pour ton accueil chaleureux dans l'Ouest !*), Etienne Cavatore (*ne perd pas la recette de cake aux fruits confits de ta mère, c'est un régal !*), Maria Manosas (*qui fait le meilleur des gâteaux au chocolat-crème à la menthe !*), Nicolas Desprat (*qui incarne pour moi l'"esprit chercheur" : une grande ouverture d'esprit et une curiosité scientifique sans borne !*), Fangyuan Ding (*qui va, entre autres, prendre la suite de mon travail : bonne chance pour la suite !*), Timothée Lionet (*qui a banni Dalida du labo,...* *ouf !*), Francesco Mosconi (*Bon voyage en Amérique latine !*) et enfin Bertrand Ducos (*qui a su remettre de l'ordre en biologie et que j'espère avoir l'occasion d'entendre à la fête de la musique !*).

En plus des membres de cette équipe, je souhaitais remercier également les secrétaires du laboratoire, Annie, Marie et Nora qui ont été d'une efficacité redoutable et d'une disponibilité incomparable. Annie et Marie ont, sans relâche, géré les différents financements de l'équipe, traqué les bons de livraison de nos

commandes, sont venues nous taper sur les doigts lorsqu'on en égarait un, mais surtout elles ont su trouver des solutions à chacun de nos problèmes (*ordre de mission demandé tardivement, impression de thèse de dernière minute...*) et ce, toujours avec le sourire. Merci mille fois, vous faites un travail incroyable! Je souhaitais également remercier les personnes avec lesquelles j'ai directement collaboré et qui m'ont beaucoup apporté au cours de ce travail : merci à Anne et Olivier pour le travail qu'ils ont fait sur yISW1a en microscopie, merci à Christophe pour son aide pour les reconstitutions de chromatine et pour leur caractérisation en microscopie, merci à Jean-Pierre Quivy pour m'avoir fourni des histones recombinantes (*même si les premiers tests n'ont pas été décisifs, j'espère que l'on pourra bientôt s'en servir*), merci à Tom qui m'a fourni au cours de ces quatre années des enzymes de qualité, et enfin un grand merci à Pierre Recouvreur, en thèse à l'Institut Curie, qui a su me donner de bons conseils pour mes expériences et qui m'a aidé à plusieurs reprises, je te souhaite bon courage pour ta fin de thèse!

Ces quatre années passées à l'ENS ont été également l'occasion de nombreuses rencontres et de nouvelles amitiés qui ont agrémenté mes journées passées au laboratoire. Je remercie la petite promo du DEA IPB et plus particulièrement ceux qui sont restés fidèles aux *apéro-repas IPB* (Benoit, Aurélie, Marion, Mimi, Fabien, Adrien) : c'était très stimulant de vous savoir aussi en thèse sur des sujets similaires, partageant les mêmes soucis mais aussi les mêmes joies! Merci également à Alice qui m'a fait rencontrer pleins de gens adorables à l'ENS : notamment Olivier, Sukhdeep, Grainne, Julien, Michael R. grâce auxquels j'ai découvert les joies (mais aussi les souffrances!) de la course à pied. A quand le prochain semi-marathon? Un merci tout particulier à Michael R. pour sa patience au badminton, les bières en fin d'entraînement, les petits repas qu'il nous a régulièrement préparé, et pour l'atelier de peinture qu'il a organisé (*désolée pour les traces qui persistent encore sur tes murs...*). Merci également aux fidèles des cours de salsa de Nadège : Sylvain, Laura, Thomas, Matthieu, Guillaume, Alex! Enfin, je tenais à remercier également tous ceux avec lesquels j'ai pris plaisir à enseigner à la préparation à l'agrégation de Physique à Montrouge : merci, entre autres, à Jean-Marc, Pierre, Seb, Michael B., Kenneth, Clément, FX, Agnès H., Pierre-François, Tristan, JF, Corinne, Anne, Augustine, André, Nasser, Eric... Et enfin, un grand merci à trois amies très sympathiques, rencontrées au détour d'une école d'été sur la chromatine : Ana (*Muchas gracias por los cursos de espanol y por las tapas en Madrid!*), Claire (*courage pour ta rédaction!*) et Emilie.

Enfin, des connaissances de plus longues dates ou nouées en marge de mon travail de recherche m'ont indirectement soutenues tout au long de ce travail et je souhaitais les en remercier. D'abord, merci aux anciens de l'ENS Lyon qui sont, comme moi, venus à Paris faire leur thèse : Alice, Hélène, Cyril, Jean, Michael B., Samuel, Thomas, Pierre B., Sébastien (merci également pour ta patience et ta gentillesse au quotidien! C'était un plaisir de t'avoir comme colloq!). Un merci tout particulier à Lucas à qui je dois énormément et sans lequel je n'aurais jamais fait cette thèse : il m'a, entre autres, convaincu de venir à Paris et m'a passionné pour la biologie, merci! Merci aux amis de prépa et plus particulièrement à Ad (*désolée, j'ai l'impression de t'avoir déçue quand régulièrement tu me demandais : "alors, t'as trouvé quelque chose?" et que, invariablement, je répondais par la négative... Merci pour ton amitié!*), Ben (*merci pour m'avoir remonté le moral quand je l'avais dans les chaussettes, j'espère qu'on ne se perdra pas de vue!*), Sergio (*je n'oublie pas ta proposition d'association si je me lasse de l'enseignement!*), Riri (*le meilleur compagnon de voyage possible, et la personne grâce à laquelle la construction des ponts vietnamiens et des tunnels boliviens n'a plus de secrets pour moi! Vivement une prochaine balade en moto!*), Pops (*merci pour les vendanges, on remet ça quand tu veux!*) et Mitch (*bon courage pour tes choix concernant l'année prochaine. D'expérience, je sais que ce n'est pas simple!*). Merci aux amis qui, malgré la distance, m'ont accompagnés : Sylvie, Cécile, Delphine, Anne-Laure, Julien, Jérémy, Olivier, Eddy... Merci à ceux que j'ai découvert ou redécouvert en arrivant sur Paris : les centraliens : 20syl, Carb, Nicouille,... l'équipe des bouchons de Vincennes et Kiki, leur super coach (*l'équipe de Rugby Féminin la plus sympathique de la région parisienne! mon seul regret : ne pas les avoir rejoins plus tôt!!*) et enfin le groupe Anatole & Co. avec,

entre autres, Jez et Florine, Simon, Garga, Tab, Seraph (*c'est l'avantage d'avoir plusieurs surnoms, on te remercie pleins de fois !!*), Euz, Rufus, Manue, Anatole, Flo, Scoubi, Guizmo, Pierre G... Un merci tout particulier à Euz pour ta patience et ta pédagogie (*déformation professionnelle ?*) qu'il soit par exemple question de montagne (*j'espère que tu auras encore le courage d'emmener un p'tit boulet en ski de rando !*) ou de rugby (*grâce à toi, je sais ce qu'est une mornifle ou une chifarnasse !*). Merci pour ton soutien au cours de ces derniers mois pendant lesquels je n'ai pas toujours été très disponible, tu m'as vraiment beaucoup aidé et je suis ravie de venir l'année prochaine au pays de la moutarde !

Je voulais conclure ces remerciements par une pensée pour ma famille, notamment mes parents qui, malgré l'éloignement, ont toujours su être présents au bon moment et me donner confiance, mes soeurs Chris (*courage pour ton concours et merci pour tes encouragements au cours de ces derniers mois, c'était super motivant !*) et Flo (*je pense bien à toi et je croise les doigts pour juin !*), ainsi que mon frère Lolo, Caro et le p'tit boutchou à venir (*et que j'attends avec impatience*) !

Table des matières

Remerciements	2
Introduction	10
I La structure de la chromatine et sa régulation dans le noyau des cellules eucaryotes	12
1 De l'ADN à la chromatine	13
1.1 L'ADN, support de l'information génétique	13
1.1.1 Définitions	13
1.1.2 Caractéristiques structurales de la double hélice d'ADN	15
1.2 Ingrédients essentiels à la formation de la chromatine : les histones	16
1.2.1 Présentation des histones conventionnelles	16
1.2.2 Les histones de coeur	16
1.2.2.1 Caractéristiques structurales	16
1.2.2.2 Agencement des histones de coeur en solution en l'absence d'ADN	17
1.2.2.3 Les variants des histones de coeur et certaines de leurs spécificités	17
1.2.3 Les histones de liaison	18
1.2.4 Les autres protéines composant la chromatine	18
1.3 Hiérarchisation de la structure de la chromatine	19
1.3.1 Premier niveau de compaction de l'ADN : le nucléosome	19
1.3.1.1 Définitions	19
1.3.1.2 Structure cristallographique de <i>la particule de coeur</i>	19
1.3.1.3 Existence de séquences d'ADN privilégiées favorisant le positionnement du nucléosome	21
1.3.1.4 Assemblage <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> de la particule de coeur	22
1.3.1.5 Les faibles énergies mises en jeu pour la stabilisation d'une particule de coeur rendent sa structure dynamique	23
1.3.1.6 Incorporation de l'histone H1	24
1.3.2 Les niveaux supérieurs de compaction de la chromatine	24
1.3.2.1 Le chapelet de nucléosomes	24
1.3.2.2 La fibre de 30 nm	25
1.3.2.3 Niveaux supérieurs de compaction de la chromatine	27
2 Régulation de la structure de la chromatine	29
2.1 Trois stratégies se complètent pour assurer le remodelage de la chromatine	29
2.2 Les modifications covalentes des histones	30

2.2.1	Les <i>MPT</i> n'entraînent pas une modification profonde de la structure interne du nucléosome	31
2.2.2	Un code des histones	31
2.2.3	Ces modifications sont étroitement liées à des activités biologiques spécifiques	31
2.2.3.1	L'acétylation de lysines est catalysée par l'intermédiaire de deux enzymes ayant des rôles antagonistes	31
2.2.3.2	L'acétylation de lysines particulières, positionnées sur les queues N-terminales des histones de coeur, joue un rôle fondamental dans la régulation de la transcription.	32
2.2.3.3	Un codage des histones très spécifique	32
2.2.3.4	Les modifications post-traductionnelles sont essentielles	33
2.3	Insertion de variants d'histones	33
2.3.1	Le variant H2A.X	34
2.3.2	Le variant macroH2A	35
2.3.3	Le variant CENP-A (<i>Centromeric Protein A</i>)	36
2.4	Les facteurs de remodelage de la chromatine	36
3	Les facteurs de remodelage de la chromatine	37
3.1	Classification des différents facteurs de remodelage de la chromatine	38
3.1.1	Les facteurs de remodelage parmi les membres de la super-famille SF2	38
3.1.2	Les quatre principaux types de facteurs de remodelage de la chromatine	39
3.2	La famille Swi2/Snf2	41
3.2.1	Les complexes associés aux membres de la famille Swi2/Snf2 chez <i>S. Cerevisiae</i> , <i>H. sapiens</i> , et <i>D. Melanogaster</i>	41
3.2.2	Le complexe SWI/SNF de <i>S. Cerevisiae</i>	42
3.2.2.1	Identification du complexe SWI/SNF	42
3.2.2.2	Structure du complexe SWI/SNF	42
3.2.2.3	Rôle de SWI/SNF dans la régulation de la transcription	42
3.2.2.4	SWI/SNF et les cancers	43
3.2.3	Le complexe RSC de <i>S. Cerevisiae</i>	43
3.2.3.1	Structure tridimensionnelle du complexe RSC	44
3.2.3.2	RSC joue un rôle essentiel dans le contrôle de la transcription et son activité est corrélée à des modifications de la structure de la chromatine.	44
3.2.3.3	Autres rôles identifiés <i>in vivo</i>	45
3.3	La famille Iswi	45
3.3.1	Les différents membres de la famille Iswi	45
3.3.2	Les complexes de la famille Iswi	46
3.3.2.1	Présentation des différents complexes	46
3.3.2.2	Sous-unités identiques partagées par différents complexes	47
3.3.3	Rôles <i>in vivo</i> de ces complexes ISWI	47
3.3.3.1	Rôle des complexes ISWI dans la régulation de la transcription	47
3.3.3.2	Rôle des complexes ISWI au cours du développement	47
3.3.3.3	Rôle des complexes ISWI dans l'assemblage de la chromatine et la régulation de l'espacement entre nucléosomes	48
3.4	La famille Nurd/Mi-2/Chd	48
3.4.1	Présentation des membres de cette famille	48
3.4.2	Rôles <i>in vivo</i>	49
3.4.2.1	Rôle de régulateur de la transcription	49

3.4.2.2	Implication de ces complexes dans le développement et la différenciation cellulaire	49
3.4.2.3	Implication de ces complexes dans certaines maladies humaines	50
3.5	La famille Ino80/Swr1	50
3.5.1	Les complexes associés aux membres de la famille Ino80/Swr1	50
3.5.2	Rôles <i>in vivo</i> de ces complexes	51
3.6	Activité de remodelage de la chromatine de ces complexes	51
3.6.1	Remodelage d'un mononucléosome	51
3.6.1.1	Principe des expériences permettant de tester l'activité de remodelage d'un FaRC sur un mononucléosome	52
3.6.1.2	Remodelage d'un mononucléosome par les complexes de type Swi2/Snf2	53
3.6.1.3	Remodelage du mononucléosome par les complexes ISWI	55
3.6.2	Remodelage d'une fibre de chromatine	57
3.6.2.1	Assemblage de la chromatine en présence de NAP-1 : dépôt d'octamères sur un fragment d'ADN	58
3.6.2.2	Glissement des nucléosomes sur l'ADN	58
3.6.2.3	Régularisation/Désorganisation d'un chapelet de nucléosomes	59
3.6.3	Les facteurs de remodelage sont des translocases	60
3.6.3.1	Stimulation de l'activité ATPase des FaRC en fonction du substrat	60
3.6.3.2	Expériences en faveur de la translocation des FaRC	61
3.6.3.3	La translocation serait polarisée et se ferait le long d'un des deux brins de la molécule d'ADN	62
3.6.4	Changements conformationnels lors de l'activité de remodelage	62
3.6.4.1	Test d'extrusion d'une structure cruciforme	62
3.6.4.2	Altération de la topologie d'un chapelet circulaire de nucléosomes	63
3.7	Mécanismes proposés pour l'action de ces facteurs	63
3.7.1	Diffusion d'une boucle d'ADN à la surface de l'octamère ou <i>Bulging model</i>	64
3.7.2	Diffusion de torsion à la surface de l'octamère ou <i>Twisting model</i>	64
3.8	Atouts et limites de ces approches biochimiques	65
3.8.1	Limites des approches biochimiques	65
3.8.2	Observation ou manipulation d'une molécule à la fois	66

II A l'échelle de la molécule unique 68

4	Différents dispositifs pour visualiser et/ou manipuler une molécule à la fois	69
4.1	Visualisation de molécules uniques	69
4.1.1	Deux exemples de visualisation par fluorescence	69
4.1.1.1	Visualisation de molécules d'ADN uniques immobilisées sur une surface	69
4.1.1.2	Etude de la dynamique d'un mono-nucléosome par une technique de FRET	70
4.1.2	La microscopie électronique en transmission	71
4.1.3	La microscopie à force atomique ou AFM	72
4.2	Manipulation de molécules uniques	72
4.2.1	Tirer et tordre une molécule	72
4.2.2	Ordres de grandeur des paramètres d'intérêt à l'échelle de la molécule unique	73
4.2.2.1	Energies	73
4.2.2.2	Distances	73
4.2.2.3	Durées	74

4.2.2.4	Forces	74
4.2.3	Les différents montages permettant la manipulation de molécules uniques	75
4.2.3.1	Microfibre optique	76
4.2.3.2	Pincés optiques	76
4.2.3.3	Pincés magnétiques	76
4.2.4	Comparaison de ces différentes techniques	77
4.2.4.1	Comparaison qualitative	77
4.2.4.2	Performances comparées des différents systèmes	77
5	Principe des pincés magnétiques et comportement mécanique d'une molécule d'ADN unique	79
5.1	Le principe des pincés magnétiques	80
5.1.1	Préparation et ancrage d'une molécule d'ADN unique	80
5.1.1.1	Préparation de molécules d'ADN fonctionnalisées aux extrémités	80
5.1.1.2	Ancrage des molécules d'ADN fonctionnalisées	81
5.1.2	Description globale du dispositif	81
5.1.2.1	Vue d'ensemble du dispositif	81
5.1.2.2	Suivi vidéo et mesure de la position 3D d'une bille magnétique	82
5.1.2.3	Génération de torsion dans une molécule d'ADN ancrée entre une bille magnétique et la surface de la microchambre	84
5.1.2.4	Mesure de la force exercée, par les aimants, sur la bille magnétique	85
5.1.3	Les améliorations apportées par la nouvelle version de pincés magnétiques	88
5.2	Comportement mécanique d'une molécule d'ADN double brin	89
5.2.1	Comportement élastique de l'ADN	89
5.2.2	Comportement de l'ADN sous torsion à différentes forces	90
5.2.2.1	Motivations biologiques	90
5.2.2.2	Quelques éléments de topologie	91
5.2.2.3	Comportement en torsion d'une molécule d'ADN	93
5.3	Les pincés magnétiques, outils de choix pour l'étude d'interactions ADN-protéine	96
5.3.1	Principe de l'étude de l'activité d'une enzyme sur l'ADN, en pincés magnétiques	96
5.3.2	Les pincés magnétiques offrent la résolution nécessaire pour suivre, en temps réel, les cycles enzymatiques d'une Topo II unique	97
6	Une série de résultats très informative sur la chromatine et les FaRC, obtenue à l'échelle de la molécule unique	100
6.1	Réponse mécanique d'une fibre de nucléosomes	100
6.1.1	Réponse élastique d'une fibre de chromatine native	101
6.1.2	Réponse élastique d'une fibre de chromatine reconstituée <i>in vitro</i> à partir d'extraits cellulaires de <i>Xenopus</i>	102
6.1.3	Réponse élastique d'une répétition régulière de nucléosomes	103
6.1.4	Réponse en torsion d'une répétition régulière de nucléosomes	104
6.1.5	Vers un système plus simple : le mononucléosome	106
6.2	Premières expériences faites sur des facteurs de remodelage de la chromatine, à l'échelle de la molécule unique	107
6.2.1	Activité des facteurs de remodelage de la chromatine, sondée par des techniques d'AFM conventionnelles	107
6.2.1.1	Perturbations de la structure interne du nucléosome en présence de variants d'histones	107

6.2.1.2	Activité de remodelage de SWI/SNF	108
6.2.2	L'AFM en liquide permet de suivre l'activité de remodelage sur une même molécule	109
6.2.3	Un suivi en temps réel s'impose comme la meilleure alternative pour suivre la dynamique de l'activité de remodelage de ces facteurs	110
6.2.3.1	Le facteur de remodelage RSC forme des boucles d'ADN sur un substrat d'ADN nu	110
6.2.3.2	Les complexes RSC et SWI/SNF forment de larges boucles d'ADN sur un substrat nucléosomal	112
6.2.3.3	Le complexe SWI/SNF ne modifie pas la structure globale d'un nucléosome et repositionne celui-ci sur l'ADN, avec un déplacement typique de 28 pb	113
7	Les motivations de ce travail de thèse	116
7.1	Elargissement du champ d'investigation des études en molécules uniques	116
7.2	Préparation contrôlée d'un substrat mono-nucléosomal	116
III	Etude comparée de l'activité de divers facteurs de remodelage de la chromatine sur l'ADN nu, en pinces magnétiques	119
8	Action du facteur de remodelage de la chromatine yISW1a sur l'ADN nu	120
8.1	Réalisation d'une expérience typique	121
8.2	En l'absence d'ATP, le complexe yISW1a se lie à l'ADN de manière coopérative	121
8.2.1	La réduction de longueur des molécules d'ADN est le résultat de l'accrochage de plusieurs complexes yISW1a	122
8.2.2	L'accrochage des complexes yISW1a sur l'ADN est réversible	122
8.2.3	L'accrochage des complexes yISW1a est coopératif	123
8.2.3.1	Coopérativité de l'accrochage de yISW1a, en pinces magnétiques	123
8.2.3.2	Confirmation de ce comportement coopératif, en microscopie électronique	123
8.3	La coopérativité de l'accrochage de yISW1a peut être modulée par différents paramètres expérimentaux	124
8.3.1	Influence de la force de traction sur la coopérativité de l'accrochage de yISW1a	124
8.3.2	La coopérativité dépend drastiquement des conditions ioniques	125
8.3.3	L'accrochage de yISW1a peut être déplacé par ajout d'ADN compétiteur	126
8.4	Caractérisation d'évènements d'accrochage uniques	127
8.4.1	L'accrochage d'un unique complexe yISW1a sur l'ADN provoque le raccourcissement de celui-ci de ~ 30 nm	127
8.4.2	Gamme de forces pour laquelle on détecte des événements isolés	129
8.4.3	Energie associée à l'accrochage d'un complexe yISW1a sur un ADN double brin	130
8.5	L'accrochage du complexe yISW1a est sensible à la présence de plectonèmes	132
8.5.1	Accrochage préférentiel de yISW1a en présence de plectonèmes positifs	132
8.5.2	Affinité de l'accrochage de yISW1a en présence de plectonèmes négatifs	134
8.6	Les complexes yISW1a sont capables de ponter deux molécules d'ADN double brin	135
8.6.1	Comportement, en rotation, de deux molécules d'ADN double brin attachées entre une même bille et la surface	135
8.6.2	Les complexes yISW1a sont capables de <i>ponter</i> deux molécules d'ADN	136
8.6.3	Activité de yISW1a en présence d'ATP	137
	Résumé des principaux résultats obtenus avec yISW1a sur l'ADN nu	140

9	Action du facteur de remodelage de la chromatine CHD1 sur l'ADN nu	141
9.1	Action du complexe CHD1 sur une molécule d'ADN insensible à la torsion	142
9.1.1	En l'absence d'ATP, le complexe CHD1 se lie à l'ADN et induit une diminution de son extension bout-à-bout de l'ordre de 55 nm.	142
9.1.2	Confrontation avec les résultats obtenus en microscopie électronique	143
9.1.2.1	Contrôle de l'homogénéité de taille des fragments d'ADN de 357 pb utilisés pour l'étude de l'accrochage de CHD1	143
9.1.2.2	Accrochage de CHD1 sur de courts fragments d'ADN double brin	144
9.1.3	CHD1 consomme de l'ATP lors d'un processus qui n'implique pas de déformation détectable de la molécule d'ADN	146
9.1.3.1	Une étude en volume indique que l'activité ATPase de CHD1 est stimulée par la présence d'ADN nu	146
9.1.3.2	La présence d'ATP ne modifie pas les signaux observés précédemment, à savoir une réduction transitoire de l'extension d'une molécule d'ADN insensible à la torsion	147
9.2	Action du complexe CHD1 sur des molécules sensibles à la torsion	149
9.2.1	L'utilisation de molécules sensibles à la torsion peut nous permettre de préciser la nature de l'interaction entre l'ADN et le complexe CHD1	149
9.2.2	Accrochage de CHD1, en l'absence d'ATP, sur une molécule d'ADN surenroulable, à $\sigma=0$	149
9.2.2.1	Difficultés de l'interprétation de ces mesures	150
9.2.2.2	Ces mesures restent néanmoins compatibles avec les résultats précédemment montrés	152
9.2.3	L'étape d'accrochage de CHD1 sur l'ADN, en l'absence d'ATP, se fait sans génération de torsion détectable.	153
9.2.4	Les études menées en présence d'ATP, sur des molécules d'ADN sensibles à la torsion n'ont pas été très concluantes.	155
	Résumé des principaux résultats obtenus avec CHD1 sur l'ADN nu	156
10	Confrontations des résultats obtenus sur l'ADN nu avec RSC, yISW1a et CHD1. Conclusions et perspectives.	157
IV	Construction et caractérisation d'un mononucléosome	159
11	Familiarisation avec la manipulation de fibres de chromatine	160
11.1	Préparation de deux types de fibres de chromatine	161
11.1.1	Fibre de chromatine de 3,8 μm avec ~ 20 nucléosomes disposés aléatoirement	161
11.1.1.1	Préparation du substrat	161
11.1.1.2	Atouts et limites de ce substrat pour l'étude du comportement d'une fibre de chromatine	161
11.1.2	Fibre de chromatine de 1,2 μm avec ~ 10 nucléosomes disposés aléatoirement	161
11.1.2.1	Préparation de ce substrat et contrôle de sa qualité en microscopie électronique	161
11.1.2.2	Atouts et limites de ce substrat	162
11.2	Comportement en traction de fibres de chromatine contenant plusieurs nucléosomes non positionnés	162
11.2.1	Conditions expérimentales	163

11.2.2	L'extension des fibres de chromatine peut présenter des sauts discontinus sous l'application d'une force constante suffisante	163
11.2.3	Distribution de taille de ces sauts d'extension	164
11.2.3.1	Enregistrement de l'extension d'une fibre de chromatine en fonction du temps sur des paliers, à force constante, de plusieurs minutes	164
11.2.3.2	Ces sauts présentent deux tailles caractéristiques	165
11.2.3.3	Confrontation de nos résultats avec les données déjà publiées	165
11.2.3.4	Réversibilité des sauts observés	167
11.2.3.5	Distribution de la taille des sauts en fonction de la force de traction	168
11.3	Comportement en torsion d'une fibre de chromatine ayant plusieurs nucléosomes positionnés de manière aléatoire	168
11.3.1	La présence de sels rend la fibre de chromatine <i>collante</i>	169
11.3.2	Réponse en torsion d'une fibre de chromatine	170
11.3.3	Les courbes <i>en chapeau</i> de fibres de chromatine présentent un comportement hystérique	172
11.3.3.1	Observation de l'hystérésis	172
11.3.3.2	Estimation du nombre de nucléosomes individualisés par fibre	172
11.3.4	Borne inférieure au couple à appliquer, à la fibre de chromatine, pour induire la transition chirale des nucléosomes	173
11.3.5	Borne supérieure au couple, à appliquer à la fibre, pour permettre la transition chirale des nucléosomes	176
11.3.5.1	Présentation de l'expérience	176
11.3.5.2	Interprétation	177
11.4	Motivation de la préparation d'un mononucléosome	178
11.4.1	Les tests sur des fibres de chromatine ont été encourageants...	178
11.4.2	... mais des difficultés persistent	178
11.4.3	Vers un substrat mono-nucléosomal	179
12	Construction d'un mono-nucléosome	180
12.1	Première tentative : préparation, par PCR, d'un ADN modifié aux extrémités, puis positionnement ultérieur d'un nucléosome.	181
12.1.1	Préparation du fragment d'ADN	181
12.1.2	Positionnement du nucléosome sur ce fragment	181
12.2	Une technique de préparation du substrat plus longue mais qui a fait ses preuves	183
12.2.1	Positionnement d'un unique nucléosome sur une séquence 601, insérée dans un fragment d'ADN de 308 pb	183
12.2.1.1	Contrôle de la reconstitution sur gel d'acrylamide 4 %	184
12.2.1.2	Contrôle de la reconstitution en microscopie électronique	185
12.2.2	Construction envisagée et impératifs imposés par celle-ci	186
12.2.3	Production des cinq fragments d'ADN	187
12.2.3.1	Phase d'amplification des cinq fragments d'ADN	187
12.2.3.2	Digestion des fragments précédents	188
12.2.4	Optimisation de la ligation sur l'exemple du couple de fragments 1 et 2	188
12.2.4.1	Un protocole classique de ligation produit des multimères non désirés	189
12.2.4.2	La séquence des sites de restriction introduits dans les primers est mal contrôlée	190
12.2.4.3	La méthode de purification des fragments après amplification n'est peut être pas suffisante	190

12.2.4.4	Problèmes éventuels lors de l'étape de digestion	191
12.2.4.5	Test de la spécificité de l'étape de ligation	192
12.2.5	Méthodologie adoptée pour la ligation du fragment final	195
12.2.5.1	Production des fragments 2+3 et 4+5	195
12.2.5.2	Production de la construction finale	195
12.2.6	Validation de la méthode de reconstitution : image EM	196
13	Identification et caractérisation des artéfacts potentiels lors de la recherche de la signature d'un nucléosome en pinces magnétiques	198
13.1	Le dispositif des pinces magnétiques limite certaines approches envisageables pour la détection d'un unique nucléosome.	199
13.1.1	On ne peut pas espérer détecter sans ambiguïté la présence d'un mononucléosome par un seul allongement irréversible de l'extension de la molécule.	199
13.1.2	On ne peut pas détecter sans ambiguïté la présence d'un unique nucléosome par l'observation de l'hystérésis apparaissant pour des valeurs de rotation positives.	200
13.2	Contraintes expérimentales à satisfaire pour observer la respiration de l'ADN nucléosomal à la surface de l'octamère d'histones.	200
13.3	Quelques subtilités dans la réponse en torsion de molécules d'ADN nues	201
13.3.1	Bulles de dénaturation ou formation de structures cruciformes dans le domaine des valeurs de rotation négatives	201
13.3.2	Déstabilisation de l'extension de la molécule d'ADN pour des valeurs de rotation positives	202
13.3.2.1	Pour des valeurs de rotation positives et à haute force, l'extension de l'ADN se déstabilise du fait de l'apparition de bulles d'ADN de phase P.	202
13.3.2.2	Effet de la force ionique sur la transition de l'ADN vers la phase P	204
13.3.2.3	Définition des zones de travail accessibles pour l'étude du nucléosome	207
14	Comportement mécanique d'un mono-nucléosome	209
14.1	Identification des substrats mononucléosomaux	210
14.1.1	Deux populations de substrats coexistent	210
14.1.2	Des nucléosomes sont perdus lors des phases d'incubation et de rinçage dans la microchambre	211
14.2	Caractéristiques des allongements réversibles observés	212
14.2.1	Les allongements réversibles $\delta\ell_F$ de l'extension des substrats mononucléosomaux sont de tailles variées et se manifestent sur une large gamme de forces	212
14.2.2	Les signaux d'allongement de l'extension ℓ_F peuvent prendre des formes variées	214
14.2.2.1	A force constante, on observe des allongements successifs ou imbriqués, de différentes tailles	214
14.2.2.2	A force constante, la dynamique des transitions entre différentes valeurs de ℓ_F est très variable	215
14.3	Confrontation avec les expériences déjà publiées	216
14.4	Conclusions et perspectives	217
	Conclusions générales	218
	A Préparation de la chambre microfluidique du dispositif de pinces magnétiques	220
	B Etude de l'activité de RSC sur l'ADN nu	221

C	Protocoles spécifiques à la chromatine	231
C.1	Les plasmides pGEM3Z et pGEM3Z-mod	231
C.2	Longs primers utilisés pour produire, en une étape, un fragment d'ADN avec la séquence 601 en son centre et des extrémités modifiées, pour sa manipulation ultérieure en pinces magnétiques.	232
C.2.1	Séquences des primers utilisés	232
C.2.2	Protocole de l'amplification et construction d'ADN attendue	233
C.3	Protocoles de reconstitution de fibres de chromatine	234
C.3.1	Protocole de reconstitution de fibres de chromatine par dialyses successives à partir d'histones purifiées	234
C.3.2	Protocole de reconstitution de fibres de chromatine par dilutions successives à partir de particules de coeur	234
C.4	Construction du mononucléosome	235
C.4.1	Premier jeu de primers utilisés pour produire les cinq fragments d'ADN composant la construction mononucléosomale	235
C.4.2	Protocole de PCR utilisé pour produire les cinq fragments d'ADN	236
C.4.3	Protocole de digestion utilisé pour les cinq fragments d'ADN	237
C.5	Nouveau jeu de primers maximisant le nombre de mésappariements entre eux	237

Introduction

Les cellules eucaryotes contiennent entre 10 millions et 100 milliards de paires de bases d'ADN contenues dans un noyau cellulaire dont la taille typique est de quelques microns (Elgin and Workman (2000)). Les molécules d'ADN constituant le génome humain s'étendraient sur près de deux mètres si on les mettait bout à bout. Cette longue et très fine molécule, portant le code génétique essentiel au bon fonctionnement de tout organisme, s'emmêlerait et serait endommagée pendant la division cellulaire si aucune organisation contrôlée de sa structure n'était adoptée. Cette incroyable quantité d'ADN est en fait condensée afin de pouvoir être stockée dans le noyau des cellules, cette condensation étant réalisée par les repliements successifs et hiérarchisés de l'ADN au sein d'une structure nucléo-protéique appelée *chromatine*. Cette compaction peut atteindre un facteur 10 000 pour l'état le plus dense. Cette structure dense est alors composée d'unités fondamentales appelées *nucléosomes*, résultant de l'interaction entre des proportions voisines d'ADN et de protéines (appelées *histones*), et qui sont au moins responsables des deux premiers niveaux d'organisation de l'ADN dans le noyau des cellules.

Cette structure condensée de l'ADN peut constituer un obstacle physique à des processus qui nécessitent d'avoir directement accès à l'ADN, tels que la transcription, la réplication ou la réparation de l'ADN. En réalité, cette structure dense est très dynamique grâce, entre autres, à l'action conjointe de deux types de complexes : des complexes qui modifient la composition chimique des nucléosomes (insertions de variants d'histones, de modifications post-traductionnelles) et d'autres, appelés *facteurs de remodelage de la chromatine*, qui utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour restructurer localement la chromatine (déplacement, éjection des histones...), afin de réguler l'accès à l'ADN. Des études de biochimie *in vivo* et *in vitro* ont permis de pointer un certain nombre de processus cellulaires essentiels au cours desquels les facteurs de remodelage de la chromatine interviennent et ont précisé les formes que peuvent prendre les produits issus de l'action de ces facteurs (fibres de chromatine désorganisées, déplacement ou éjection d'histones...). Cependant, les mécanismes permettant cette activité de remodelage restent encore méconnus. C'est cette constatation qui a motivé mon travail de recherche : j'ai, dans ce but, souhaité étudier l'activité de différents facteurs de remodelage de la chromatine, à l'échelle de la molécule unique.

La description de l'organisation de mon manuscrit de thèse va me permettre de revenir sur la démarche adoptée au cours de mon travail de recherche. Le texte est divisé en quatre grandes parties :

La première partie a pour objectif de donner une vue d'ensemble de l'état des connaissances concernant la structure de la chromatine et la façon dont celle-ci est régulée chez les eucaryotes. Nous présentons d'abord la structure de la chromatine : nous commençons par une description rapide de la molécule d'ADN, puis des histones, pour nous concentrer ensuite sur les deux premiers niveaux d'organisation de la chromatine, à savoir le nucléosome et la fibre de chromatine compacte (souvent appelée *fibre de 30 nm*). Après une rapide présentation des différentes stratégies adoptées par les eucaryotes pour rendre la structure de la chromatine dynamique, nous nous focalisons sur l'une d'entre elles : l'action des facteurs de remodelage de la chromatine. Nous présentons les différentes familles identifiées, leurs rôles *in vivo* et *in vitro* et revenons

sur les mécanismes généralement proposés pour justifier de leurs actions. Cela nous permet de faire le point sur ce qui est compris concernant leurs mécanismes mais surtout, sur ce qu'il reste encore à comprendre. Pour préciser ces mécanismes, un type de dispositifs nous semble plus adapté que les expériences classiques de biochimie, il s'agit des dispositifs qui permettent de visualiser et/ou de micromanipuler une molécule à la fois.

Dans la seconde partie nous présentons différents dispositifs de ce genre, et plus particulièrement celui dont on s'est servi au cours de ce travail de thèse, à savoir les pinces magnétiques. On rappelle ensuite les expériences marquantes qui ont permis d'avancer sur la connaissance que l'on a de la structure de la chromatine et de sa régulation, à l'échelle de la molécule unique. Encore une fois, des avancées ont été faites mais beaucoup de questions restent encore en suspens.

Les deux dernières parties correspondent à la présentation des résultats que j'ai obtenu au cours de ce travail de thèse : étudier directement, en pinces magnétiques, l'activité des facteurs de remodelage de la chromatine (notés *FaRC*) sur leur substrat naturel - la chromatine - est une entreprise trop difficile à mener d'emblée. En effet, on ne dispose que d'une unique observable - la variation d'extension du substrat que l'on piège - pour donner un sens à des interactions qui peuvent être de différentes natures (interactions ADN-FaRC, FaRC-nucléosomes, nucléosomes-nucléosomes...). Si l'on veut être capable de comprendre les signaux enregistrés, on se doit de progresser pas à pas, en partant d'un système le plus simple possible. On a dans ce but commencé par l'étude de l'activité des facteurs de remodelage de la chromatine sur l'ADN nu : on en a étudié trois, appartenant à des familles différentes (*yRSC*, *yISW1a* et *yCHD1*), et on a mis en évidence des comportements variés (c'est l'objet de la troisième partie). On a souhaité compléter cette étude en développant un substrat nucléosomal fiable sur lequel faire agir les facteurs de remodelage de la chromatine. On a dans ce but mis au point un protocole pour disposer de mono-nucléosomes très bien caractérisés (ceci constitue la quatrième partie de ce manuscrit de thèse). La suite logique de ce travail sera de mettre à profit ce nouveau substrat pour tester l'activité des facteurs de remodelage de la chromatine.

Première partie

La structure de la chromatine et sa régulation dans le noyau des cellules eucaryotes

Chapitre 1

De l'ADN à la chromatine

Sommaire

1.1 L'ADN, support de l'information génétique	13
1.1.1 Définitions	13
1.1.2 Caractéristiques structurales de la double hélice d'ADN	15
1.2 Ingrédients essentiels à la formation de la chromatine : les histones	16
1.2.1 Présentation des histones conventionnelles	16
1.2.2 Les histones de coeur	16
1.2.3 Les histones de liaison	18
1.2.4 Les autres protéines composant la chromatine	18
1.3 Hiérarchisation de la structure de la chromatine	19
1.3.1 Premier niveau de compaction de l'ADN : le nucléosome	19
1.3.2 Les niveaux supérieurs de compaction de la chromatine	24

La chromatine est composée d'ADN et de protéines. Parmi ces dernières, une catégorie prédomine : les histones. Celles-ci interagissent étroitement avec l'ADN afin d'organiser spatialement la structure chromatinienne. Le but de ce chapitre est de présenter les deux ingrédients essentiels entrant dans la composition de la chromatine : l'ADN et les histones.

1.1 L'ADN, support de l'information génétique

1.1.1 Définitions

L'ADN ou acide désoxyribonucléique est une macromolécule constituée de deux brins complémentaires arrangés de façon anti-parallèle et s'enroulant l'un autour de l'autre en hélice droite (Figure 1.2). Chaque brin est un polymère organique composé d'un squelette sucro-phosphate (chargé négativement) sur lequel se succèdent des bases azotées. Les bases azotées fixées sur le squelette se déclinent sous quatre formes différentes : l'adénine (A), la guanine (G), la thymine (T) et la cytosine (C). Leur structure chimique est indiquée sur la figure 1.1(a). C'est la séquence linéaire précise de ces différentes bases le long du squelette sucro-phosphate qui code l'information génétique (Lia (2005)), (Wagner (2006)).

Un nucléoside est constitué d'un désoxyribose (sucre) et de la base azotée qui lui est associée. On parle de nucléotide lorsqu'on associe au nucléoside un groupement phosphate (Figure 1.1(b)). Deux nucléotides successifs sont reliés par une liaison phosphodiester entre le phosphate de l'un et le sucre de l'autre. Un

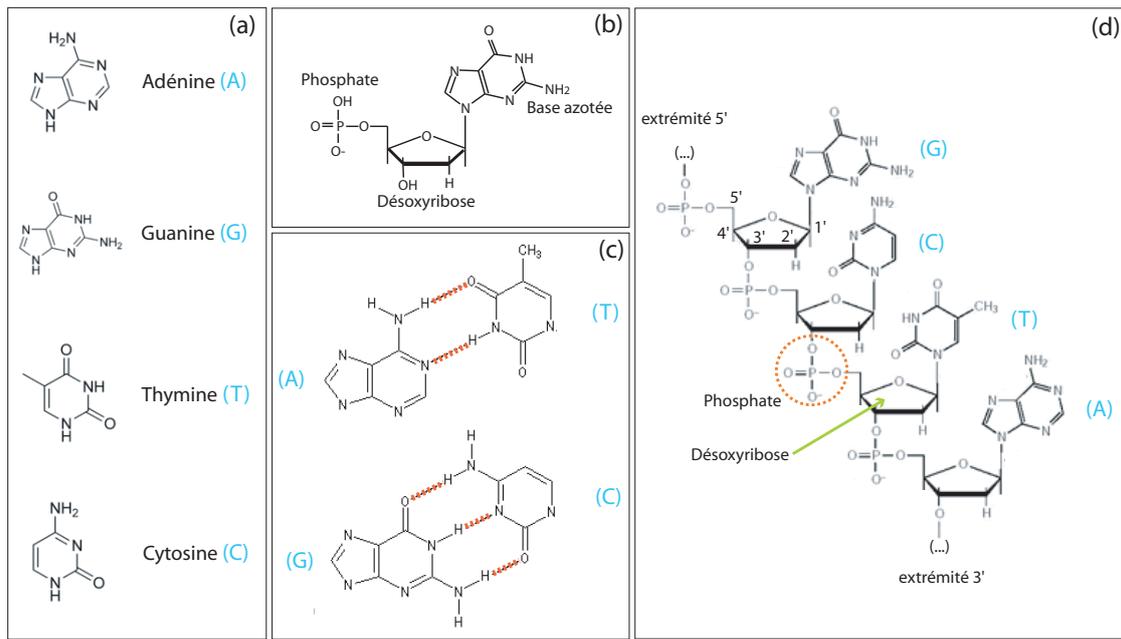


FIGURE 1.1 – (a) Structure chimique des quatre bases azotées greffées sur le squelette sucro-phosphate de l'ADN. (b) Représentation d'un nucléotide : ensemble d'une base azotée (ici la guanine), d'un désoxyribose et d'un groupement phosphate. (c) Liaisons hydrogène stabilisant les paires de bases A-T et C-G. (d) Représentation du brin d'ADN de séquence 5'-GCTA-3', l'orientation 5'-3' de celui-ci est précisée.

brin d'ADN correspond donc à une succession de nucléotides (Figure 1.1(d)). La position des phosphates sur les sucres formant cette séquence répétée de nucléotides, en position 3' ou 5', donne une orientation au brin. Par convention, la séquence d'ADN, c'est-à-dire l'enchaînement des bases portées par l'ADN, s'écrit de 5' vers 3'.

Les deux brins de l'ADN interagissent par l'intermédiaire de ces bases, situées à l'intérieur de l'hélice. Celles-ci peuvent en effet s'apparier en couples A-T et C-G via des liaisons hydrogène (Figure 1.1(c) et 1.2(a)) : les bases C et G peuvent former trois liaisons tandis que A et T n'en forment que deux. Les bases A et T (resp. C et G) sont dites complémentaires et forment des paires de bases (expression souvent notée *pb* par la suite). L'enchaînement des bases d'un brin détermine donc celui de l'autre brin puisqu'il doit lui être complémentaire.

L'hélice droite résultant de l'appariement de deux brins d'ADN complémentaires est très stable. Cette stabilité est assurée d'une part par les liaisons hydrogène qui se forment entre les deux brins d'ADN grâce aux couples de bases complémentaires qui se font face, mais aussi par des interactions hydrophobes, dites d'empilement (due à la nature hydrophobe des bases azotées), entre les paires de bases successivement empilées à l'intérieur de la double hélice.

1.1.2 Caractéristiques structurales de la double hélice d'ADN

Les caractéristiques structurales de la double hélice, à savoir son diamètre, son pas hélical, la direction de son axe, dépendent d'un grand nombre de paramètres environnementaux tels que le solvant, la température ou la force ionique (Saenger (1988)). La forme majoritaire de l'ADN, dans les conditions ioniques physiologiques, est appelée ADN-B. Cette molécule en hélice droite a un diamètre de 24 Å et un pas hélical de 3.6 nm (Figure 1.2). Chaque tour d'hélice contient environ 10.5 paires de bases. De plus, l'ADN est un polyanion dont la densité linéique de charge est de deux charges élémentaires pour 3.4 Å (celles-ci sont portées par les groupements phosphates).

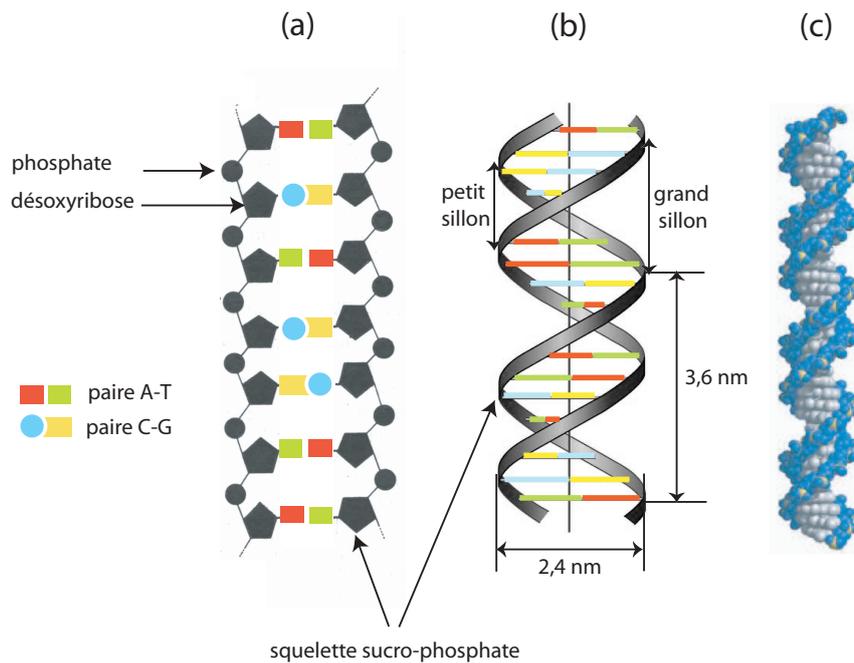


FIGURE 1.2 – Structure de la forme B de l'ADN : (a) Représentation de l'interaction entre deux simples brins complémentaires. (b) Représentation équivalente pour laquelle la forme du squelette sucro-phosphate est simplifiée et qui montre la structure en hélice droite adoptée par l'ADN-B. (c) Structure atomique de la double hélice d'ADN-B.

L'ADN-B a une forte rigidité locale : on peut la quantifier en mesurant sa longueur de persistance de courbure, c'est-à-dire la distance sur laquelle l'orientation de l'axe de la double hélice reste corrélée en dépit de l'agitation thermique. Dans le cas de l'ADN-B, la longueur de persistance ξ vaut 50 nm (soit 150 paires de bases) (Allemand (1997)). Ceci est à comparer aux longueurs de persistance que l'on peut associer à certains polyélectrolytes synthétiques, leur longueur de persistance est bien plus faible : elle est de 9.2 Å pour le polystyrène (Bulet et al. (1996)), ou encore à celle de l'ARN ($\xi_{ARN} \sim 1.5$ nm (Mangeol et al. (2006))). Il est à noter que la valeur de ξ dépend fortement des conditions ioniques : elle diminue si la concentration en cations monovalents augmente (Baumann et al. (1997)).

1.2 Ingrédients essentiels à la formation de la chromatine : les histones

1.2.1 Présentation des histones conventionnelles

Les histones sont de petites protéines basiques extrêmement bien conservées au cours de l'évolution. Il en existe principalement cinq types : H1, H2A, H2B, H3 et H4. On a reporté dans le tableau ci-dessous leur masse moléculaire respective, le nombre d'acides aminés qui les constituent ainsi que le ratio entre leurs résidus basiques et ceux acides. Ces protéines sont fortement chargées positivement, elles vont donc pouvoir interagir électrostatiquement avec l'ADN pour favoriser son repliement.

Histone	Masse Moléculaire (kDa)	Acides aminés ($\frac{\text{basiques}}{\text{acides}}$)
H1	21,13	223 (5,4)
H2A	13,96	129 (1,4)
H2B	13,77	125 (1,7)
H3	15,27	135 (1,8)
H4	11,24	102 (2,5)

Le premier niveau de repliement de l'ADN consiste en l'enroulement de ~ 200 pb d'ADN autour d'un coeur protéique composé de huit histones : deux copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4. Pour cette raison, ces histones sont appelées *histones de coeur*. L'histone H1 est, quant à elle, nommée *histone de liaison*. Quelque soit l'organisme eucaryote considéré, les histones de coeur ont la même stoechiométrie, tandis que l'on retrouve deux fois moins d'histones H1 que d'histones de coeur.

1.2.2 Les histones de coeur

1.2.2.1 Caractéristiques structurales

La structure des histones de coeur est particulière : on identifie trois principales régions (Figure 1.3) (Elgin and Workman (2000)), (Arents et al. (1991)) :

- *Au centre, un domaine histone-fold*

Au centre de chacune des séquences protéiques des histones de coeur se trouve une région protéique de 70 acides aminés environ, appelée *histone-fold* et qui comprend, dans l'ordre, 3 à 4 tours en hélice α ($\alpha 1$), une boucle de 7-8 acides aminés (L1), 8 tours en hélice α ($\alpha 2$), une boucle de 6 acides aminés et, pour finir, 2 à 3 tours en hélice α .

- *Les extensions du domaine histone-fold*

Des éléments structuraux bien moins uniformes que les précédents, appelés extensions au domaine *histone-fold*, se rajoutent à l'extrémité N-terminale par rapport au domaine *histone-fold* de l'histone H3 (αN) et de H2A, et à l'extrémité C-terminale en ce qui concerne les histones H2A et H2B (αC). Chacun de ces éléments est localisé à proximité des régions structurées des domaines *histone-fold*.

- *Les queues N-terminales des histones*

Enfin, les domaines N-terminaux des histones de coeur sont des éléments flexibles, très peu structurés (au moins dans le contexte de nucléosomes isolés) et qui contiennent la majorité des résidus chargés positivement des histones (résidus lysine et arginine). Ils comptent de 16 (H2A) à 44 (H3) acides aminés et sont appelés *queues d'histones*. H2A a également une queue C-terminale de 10 acides aminés (et qui peut être encore plus longue chez certains variants de H2A). Les queues des histones sont la cible de nombreuses

modifications post-traductionnelles dont nous verrons plus loin l'importance pour la chromatine.

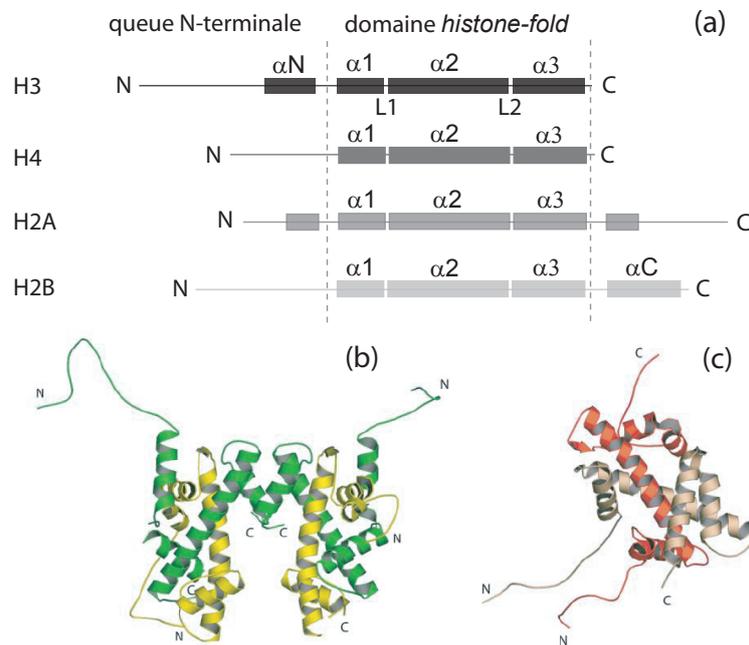


FIGURE 1.3 – (a) Les histones de coeur se structurent en différents domaines : un domaine central constitué de la succession de trois hélices α , quelques extensions à ces domaines (αN et αC) et des queues N-terminales très peu structurées. (b) Structure d'un tétramère de H3 (vert) et H4 (jaune). (c) Structure d'un dimère de H2A (rouge) et H2B (rose).

1.2.2.2 Agencement des histones de coeur en solution en l'absence d'ADN

En solution, ces histones de coeur ne restent pas isolées : leurs domaines *histone-fold* leur permettent d'interagir entre eux grâce à un arrangement en *poignée de main* donnant naissance à des hétérodimères (H2A-H2B) et (H3-H4) (Arents et al. (1991)). Des études biochimiques ont montré qu'en solution, pour des concentrations en sels modérées et en l'absence d'ADN, le complexe (H3-H4) forme un tétramère alors que (H2A-H2B) reste sous la forme d'un dimère stable (Figure 1.3(b) et (c)) (Khorasanizadeh (2004)).

A forte concentration saline (2 M NaCl), un octamère d'histones, constitué d'un tétramère (H3-H4)₂ et de deux dimères (H2A-H2B), se forme spontanément *in vitro* (Eickbush and Moudrianakis (1978)).

1.2.2.3 Les variants des histones de coeur et certaines de leurs spécificités

En plus des cinq histones *conventionnelles* (ou *canoniques*) présentées ci-dessus, un certain nombre de variants ont été identifiés (Bernstein and Hake (2006)). Ces variants d'histones peuvent être très semblables aux histones conventionnelles (par exemple, un seul acide aminé diffère entre H3.1 et H3.2), ou alors être très différents changeant ainsi drastiquement la nature de l'histone et vraisemblablement le polymère de chromatine (par exemple, macroH2A est un variant de l'histone H2A et correspond à la fusion d'une protéine de type H2A avec un macro-domaine protéique qui n'est pas de type histone). On remarque également une différence notable entre histones canoniques et variants d'histones : les histones conventionnelles sont codées par de multiples gènes (17 gènes pour H2B) alors que les variants d'histones sont souvent codés par

un unique gène.

Les variants d’histone identifiés sont relativement nombreux. Nous les présenterons de façon plus détaillée au Chapitre 2 de cette partie, traitant des stratégies mises en place par les eucaryotes pour réguler la structure de la chromatine.

1.2.3 Les histones de liaison

L’histone de liaison canonique H1 ne présente pas d’homologie structurale avec les histones de coeur. Il a un poids moléculaire plus important que les histones de coeur (21,13 kDa). Sa structure présente trois domaines : deux extrémités N et C terminales peu structurées (d’environ 20 et 100 acides aminés respectivement) et riches en lysines et sérines, et une partie centrale, globulaire et conservée, d’environ 80 acides-aminés. La queue C-terminale est très chargée positivement et est sujette à plusieurs modifications post-traductionnelles (Godde and Ura (2008)). La structure tridimensionnelle du domaine globulaire de l’histone H5 (un variant de l’histone H1 que l’on trouve chez le poulet) montre que celui-ci possède un domaine en hélice *winged-helix*. La figure 1.4 montre la structure de l’histone H5 ; la séquence en acides aminés de l’histone H1 de l’Homme est également représentée (Ramakrishnan et al. (1993)).

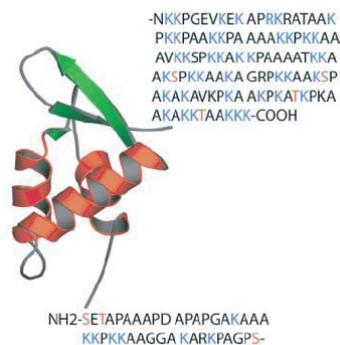


FIGURE 1.4 – Structure de l’histone H5. Séquence en acides aminés de l’histone H1 de l’Homme.

1.2.4 Les autres protéines composant la chromatine

Les histones sont les protéines majoritaires au sein de la chromatine. Néanmoins, il existe beaucoup d’autres protéines interagissant avec la chromatine et dont le rôle est un peu moins connu. Les protéines HMG (*High Mobility Group*) sont les deuxièmes protéines chromosomiques les plus importantes après les histones ; on pense qu’elles jouent un rôle important dans le remodelage de la chromatine et dans la régulation de la transcription génique chez les eucaryotes en tordant, courbant ou modifiant la structure de l’ADN lié aux histones ou aux facteurs de transcription (Bustin and Reeves (1996)), (Zhang and Wang (2008)). Les protéines HMG ont une taille inférieure à 30 kDa. Toutes ces protéines se lient à la chromatine de manière dynamique et réversible et rendent sa structure plus flexible permettant une régulation positive ou négative fine de la transcription des gènes. Bien que ces protéines aient été moins étudiées que les histones, on a pu identifier qu’elles avaient un rôle essentiel dans une variété de processus cellulaires incluant le développement de cancers (Fusco and Fedele (2007)), la réparation de l’ADN (Reeves and Adair (2005)) ou des désordres inflammatoires ou infectieux (Mantell et al. (2006)). Toutes les protéines HMG, comme les histones,

sont sujets à des modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation de résidus lysine, la méthylation de résidus arginine ou lysine ou la phosphorylation de sérines ou de thréonines. Ces modifications modulent leurs interactions avec l'ADN ou avec d'autres protéines (Bianchi and Agresti (2005)).

1.3 Hiérarchisation de la structure de la chromatine

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN ne peut rester isolé sous la forme d'une double-hélice nue, il est nécessaire de lui associer des partenaires favorisant son repliement et son arrangement ordonné dans le noyau cellulaire. Très tôt s'est donc posée la question de la nature de ces partenaires : en 1973, Hewish et Burgoyne ont proposé une expérience donnant la preuve de l'existence d'une sous-structure régulière de la chromatine et un moyen efficace d'isoler la sous-unité répétée (Hewish and Burgoyne (1973)). Cette sous-unité, obtenue par digestion ménagée de la chromatine par une nucléase et isolée par sédimentation dans un gradient de sucrose, contient environ 200 paires de bases d'ADN et des histones. Kornberg proposa en 1974 que l'unité de base de la chromatine, appelée le *nucléosome*, soit composée d'un octamère d'histones et de 200 paires de base d'ADN (Kornberg (1974)). Depuis, les études menées sur les nucléosomes ont permis de préciser leur structure et de décrire l'agencement des différents nucléosomes entre eux pour former les niveaux supérieurs de structuration de la chromatine. Nous allons revenir sur ces différents niveaux d'organisation.

1.3.1 Premier niveau de compaction de l'ADN : le nucléosome

1.3.1.1 Définitions

La plus petite unité répétitive de la chromatine est ce que l'on nomme *la particule de coeur du nucléosome*. Celle-ci est constituée de 147 pb d'ADN et d'un octamère d'histones comprenant deux copies de chacune des histones de coeur (H2A, H2B, H3 et H4). L'ADN inclus dans la particule de coeur est appelé *ADN nucléosomal*. L'*ADN de liaison* est l'ADN qui lie les particules de coeur les unes aux autres. Celui-ci est de longueur variable selon le type cellulaire et l'espèce considérée, les particules de coeur se répètent tous les 200 ± 40 pb dans les différents génomes eucaryotes. La particule de coeur du nucléosome associée à l'histone H1 forme le *chromatosome*. Ce dernier, flanqué de l'ADN de liaison, forme ce que l'on appelle *le nucléosome*^a.

1.3.1.2 Structure cristallographique de la particule de coeur

La structure cristallographique de la particule de coeur du nucléosome a été déterminée pour plusieurs espèces à des résolutions allant jusqu'à 1,9 Å (Luger et al. (1997a)), (Richmond and Davey (2003)).

Organisation de la particule de coeur. Dans la particule de coeur, deux copies de chacune des histones de coeur s'associent par l'intermédiaire de leur domaine *histone-fold* pour former un octamère. Deux dimères (H3-H4) interagissent en formant une *poignée de main* formant ainsi un tétramère au centre de l'octamère d'histones. Ce tétramère est ensuite flanqué de chaque côté par un hétérodimère (H2A-H2B) (Figure 1.5). L'octamère d'histones sur lequel s'enroule l'ADN peut être vu schématiquement comme un cylindre de 11 nm de haut et de 13 nm de diamètre et dont la surface présente des sillons constituant un chemin pour l'ADN (Arents and Moudrianakis (1993)). 147 paires de bases d'ADN s'enroulent ainsi autour de

a. Dans la quatrième partie de ce manuscrit, on parlera de *nucléosome* même en l'absence de l'histone de liaison H1. Ce que l'on appellera *nucléosome* sera l'association de l'ADN nucléosomal, de l'ADN de liaison et de l'octamère d'histones. Dans le cas d'un mononucléosome ne possédant pas d'histone H1, on confondra *nucléosome* et *particule de coeur*.

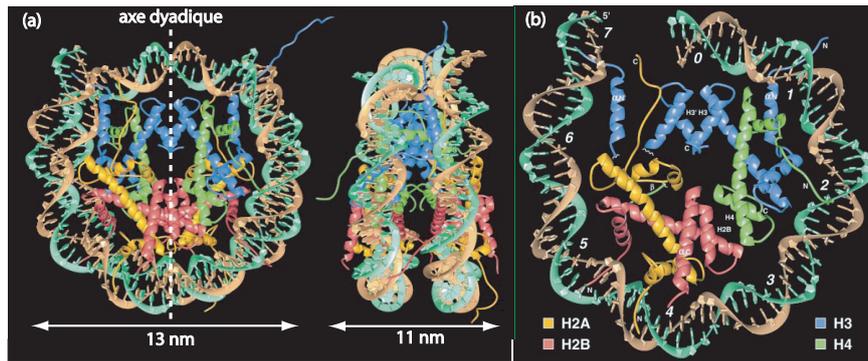


FIGURE 1.5 – (a) Images cristallographiques à 2,8 Å de résolution de la particule de coeur du nucléosome, de face puis de profil. (b) Positions des SHL (*Super Helix Locations*) sur l'ADN nucléosomal pour le premier tour d'ADN enroulé autour de la particule de coeur.

l'octamère protéique en faisant 1,67 tours en hélice gauche. L'ADN a alors un pas hélical de 25,9 Å et un rayon de courbure moyen de 41,9 Å (Richmond and Davey (2003)).

La particule de coeur comporte un axe de symétrie binaire, appelé *axe dyadique* par rapport auquel les brins d'ADN entrant et sortant sont symétriques (cet axe est représenté sur la figure 1.5(a)).

Les queues N-terminales des histones sont peu structurées et sortent de la particule de coeur. Celles des histones H3 et H2B s'intercalent entre les tours d'ADN qui s'enroulent autour de l'octamère d'histones. Une partie de la queue amino-terminale de l'histone H2A interagit avec l'ADN à l'extérieur de l'hélice au niveau du petit sillon. Par ailleurs, plusieurs résidus basiques des queues d'histones H4 interagissent avec une région très acide de l'hétérodimère (H2A-H2B) (Luger and Richmond (1998b)). Il est à noter que les queues N-terminales n'apparaissent quasiment pas sur les images de cristallographie du fait de leur manque de structure, si ce n'est la queue d'histone H4 qui se trouve être relativement bien stabilisée par son interaction avec le dimère (H2A-H2B) d'un nucléosome voisin. Leur positionnement précis n'est donc pas bien déterminé, d'autant plus qu'il doit fortement dépendre des conditions ioniques et de la proximité des nucléosomes voisins.

Sous cette forme, l'ADN est compacté de près d'un facteur cinq par rapport à l'hélice nue (Oudet et al. (1975)).

Stabilité de la particule de coeur. L'organisation particulière de l'octamère d'histones permet à 14 acides aminés très chargés positivement, des arginines, de s'insérer au niveau du petit sillon de l'ADN afin de stabiliser la structure (Luger and Richmond (1998a)), (Wagner (2006)). Ces points d'ancrage, résultant d'interactions électrostatiques et hydrogène entre les arginines et le squelette sucro-phosphate, sont disposés quasi-périodiquement le long de l'ADN. Par ailleurs, de nombreux autres acides aminés interagissent par liaisons hydrogène, électrostatiques et hydrophobes avec l'ADN nucléosomal.

Les points où le petit sillon de l'ADN est tourné vers l'extérieur sont repérés par des nombres entiers appelés SHL (*Super Helix Location*), ces points apparaissent sur la Figure 1.5 (b) (Luger et al. (1997a)). Le point SHL=0 est situé sur l'axe dyadique à l'interface H3-H3. Les sites d'interaction histones/petit sillon correspondent aux points où le grand sillon est tourné vers l'extérieur, donc à des SHL demi-entiers.

Périodicité de l'ADN au sein de la particule de coeur. L'ADN enroulé autour de l'octamère d'histones n'a pas la même périodicité qu'en solution. En effet, celle-ci va être déterminée par l'espacement entre les différents points d'ancrage et peut donc être distordue par les interactions ADN/histones. Le pas est de 10.2 pb/tour dans le cristal à 2.8 Å (Luger et al. (1997a)) et de 10.3 pb/tour dans celui à 1.9 Å (Richmond and Davey (2003)). Ces valeurs sont à comparer à celle de l'ADN en solution (10.5 pb/tour), l'ADN nucléosomal est donc étiré et fortement courbé au sein de la particule de coeur. Ces valeurs sont en fait des valeurs moyennes car la périodicité de l'ADN varie le long de la surface de l'octamère (elle est plus élevée au centre de l'octamère, plus faible aux extrémités de l'ADN nucléosomal). Cette différence entre les deux cristaux montre que la périodicité de l'enroulement de l'ADN dépend aussi de la séquence (on y reviendra ultérieurement). Les structures cristallographiques obtenues reflètent ainsi l'organisation d'une particule de coeur ayant une séquence d'ADN donnée et obtenue dans des conditions particulières (ici, très peu physiologiques : 40 mM d'ions monovalents et d'ions divalents). Cela ne donne donc qu'une indication sur l'architecture pouvant exister *in vivo*.

L'orientation de l'ADN nucléosomal a des conséquences majeures sur son accessibilité. L'orientation des sillons majeur et mineur par rapport à la surface de l'octamère d'histones est un point critique en ce qui concerne l'accessibilité de l'ADN. En effet, le site de fixation d'une protéine peut être inaccessible s'il est tourné vers l'intérieur du nucléosome. Par exemple, la TATA Binding Protéine (TBP) se fixe sur la boîte TATA dans le sillon mineur de l'ADN. Si le sillon mineur de la boîte TATA est orienté vers l'intérieur du nucléosome, la capacité de la TBP à se fixer à la boîte TATA est diminuée (Imbalzano et al. (1994)), (Godde et al. (1995)). Les nucléosomes et leur positionnement sur la séquence d'ADN régulent donc l'accessibilité de l'ADN aux protéines qui s'y fixent.

1.3.1.3 Existence de séquences d'ADN privilégiées favorisant le positionnement du nucléosome

Certaines séquences d'ADN ont été identifiées pour avoir une plus grande affinité pour se lier à l'octamère d'histones, permettant la formation de nucléosomes avec une stabilité accrue. Si les octamères d'histones sont libres d'explorer différentes positions durant leur assemblage sur l'ADN, alors n'importe quelle séquence d'ADN présentant une plus forte affinité pour l'octamère attirera vers elle les octamères et positionnera ainsi les nucléosomes. Ces séquences d'ADN sont appelées *séquences positionnantes*. L'assemblage d'un nucléosome sur une telle séquence est favorisé énergétiquement ($\Delta E \approx 3,4$ à $5 k_B T$) par rapport à une séquence quelconque (Kepert et al. (2003)).

Des séquences naturelles ayant un rôle positionnant ont d'abord été identifiées : c'est le cas du gène de l'ARN ribosomique 5S qui a une séquence qui lui confère une courbure intrinsèque et qui pourrait faciliter son incorporation au sein d'un nucléosome dans lequel l'ADN est courbé (Hayes et al. (1990)). Puis, à partir des années 90, les premières séquences positionnantes complètement synthétiques ont été produites (Lowary and Widom (1997)). De nos jours, la séquence synthétique la plus couramment utilisée est la séquence 601 de Widom et coll. (Lowary and Widom (1998)), (Thastrom et al. (1999)), conçue par sélections successives sur un ensemble de séquences aléatoires. La méthode de sélection utilisée, dénommée SELEX, est une méthode itérative qui permet de sélectionner, à chaque passage, les 10% de séquences dont l'affinité pour le nucléosome est la plus forte.

Ces séquences présentent quelques traits particuliers concernant leur séquence nucléotidique. On trouve notamment des motifs particuliers apparaissant avec une périodicité proche de celle du pas hélical

de l'ADN nucléosomal et qui sont connus pour faciliter une forte courbure de l'ADN lui permettant de s'enrouler autour de l'octamère d'histones. C'est le cas de répétition tous les 10 pb environ de dinucléotides AA/TT/TA en phase les uns par rapport aux autres, ou en opposition de phase avec une répétition périodique de dinucléotides GC (Lowary and Widom (1998)), (Segal et al. (2006)) (voir figure 1.6). On retrouve ceci à la fois pour des séquences positionnantes naturelles ou synthétiques.

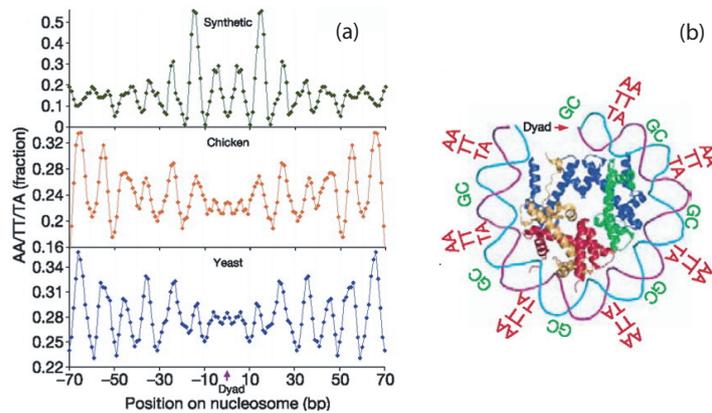


FIGURE 1.6 – (a) Fraction de dinucléotides AA/TT/AT que l'on retrouve à chaque position des alignements, centrés sur le dyad, des séquences d'ADN nucléosomal de la levure, du poulet et synthétique (moyenne faite sur 3 paires de bases). On retrouve la périodicité de 10 pb environ de ces dinucléotides. (b) Les dinucléotides clés mis en évidence lors des alignements précédents sont représentés sur la structure tridimensionnelle de la particule de coeur, seule une moitié de la particule de coeur (correspondant environ à un tour d'ADN) y est représentée. *Extrait de (Segal et al. (2006)).*

On retrouve ces séquences préférentielles dans les génomes des eucaryotes : en effet, les régions codantes des génomes possèdent plus de séquences positionnantes que ce que prédit une simple distribution de type Boltzmann de ces séquences. Reste à comprendre si les génomes utilisent ces séquences pour contrôler la distribution des nucléosomes *in vivo*, modulant ainsi l'accès de protéines à des sites particuliers de l'ADN^b.

In vitro, ces séquences positionnantes sont d'un très grand secours : elles permettent de préparer un substrat de chromatine pour lequel la position des nucléosomes est contrôlée via l'introduction de ces séquences particulières en des lieux choisis de la molécule d'ADN. On reviendra ultérieurement sur ce point.

1.3.1.4 Assemblage *in vivo* et *in vitro* de la particule de coeur

Des études biochimiques ont suggéré que l'assemblage de la particule de coeur est séquentielle (Kaufman (1996)) : cet assemblage procède par une étape de dépôt d'un tétramère (H3-H4)₂ sur l'ADN (Figure 1.7(a)) suivie par une étape de dépôt des dimères (H2A-H2B) (Figure 1.7(b)). Ces processus impliquent des pro-

b. La façon dont est contrôlé le positionnement des nucléosomes *in vivo* fait l'objet de recherches actives : il semblerait que seulement 15 % des nucléosomes soient positionnés grâce à la présence de séquences positionnantes ayant une courbure intrinsèque facilitant leur interaction avec un octamère d'histones. L'équipe de A. Arnéodo propose que le génome contienne des régions nucléiques sur lesquelles le positionnement des nucléosomes serait très défavorable. Ces régions constitueraient des barrières énergétiques au niveau desquelles aucun nucléosome ne se positionnerait. Par contre, le confinement entropique forcerait les nucléosomes, présents entre deux barrières énergétiques successives, à s'agencer de manière périodique (Vaillant et al. (2007)).

téines appelées chaperonnes qui prennent en charge les dimères d’histones. En particulier, le dépôt des dimères (H2A-H2B) fait intervenir la chaperonne NAP-1 (*Nucleosome Assembly Protein-1*) sans laquelle l’assemblage ne peut avoir lieu (Nakagawa et al. (2001)). L’insertion de variants d’histones implique d’autres chaperonnes spécifiques.

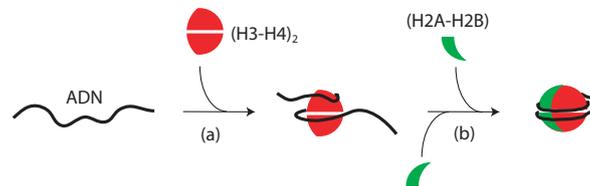


FIGURE 1.7 – Assemblage séquentiel d’une particule de coeur de nucléosome. (a) le tétramère (H3-H4)₂ interagit avec l’ADN; (b) deux dimères (H2A-H2B) viennent successivement s’ajouter pour former la particule de coeur. Ces étapes sont accomplies grâce à l’action de facteurs d’assemblage qui prennent en charge les différents dimères et tétramères devant être assemblés.

Remarquons que cet assemblage est modulable : les deux dimères (H2A-H2B) peuvent être retirés sans que l’interaction de l’ADN et du tétramère (H3-H4)₂ ne soit rompue.

Il est possible de reconstituer *in vitro* des particules de coeur sans avoir à faire intervenir les facteurs d’assemblage indispensables *in vivo*. Si on mélange sans précaution de l’ADN et des histones, celles-ci vont venir s’agréger sur l’ADN par des interactions électrostatiques non spécifiques. Pour obtenir des particules de coeur de manière contrôlée, l’idée est d’écranter les interactions électrostatiques dans un premier temps, en mélangeant l’ADN et les histones de coeur à haute concentration saline (2 M NaCl) puis de réaliser une dialyse lente contre des solutions de concentrations en NaCl décroissantes, puis finir avec une dialyse contre une solution de TE (Luger et al. (1997b)), (Luger et al. (1999)).

1.3.1.5 Les faibles énergies mises en jeu pour la stabilisation d’une particule de coeur rendent sa structure dynamique

L’énergie moyenne des 14 contacts qui assurent la stabilité de la particule de coeur a été estimée, par des mesures de résistance de l’ADN à la digestion par des nucléases, à $\sim 1.75 k_B T$ par site d’interaction, soit $\sim 24.5 k_B T$ pour les 14 sites (Polach and Widom (1995)). Cette énergie d’interaction par site d’ancrage est relativement faible et d’ordre de grandeur comparable à l’énergie thermique. Ainsi, on comprend que l’ADN pourra se détacher au moins transitoirement de l’octamère d’histones, rendant la structure extrêmement dynamique. Ceci a été confirmé par des expériences de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfert*) qui montrent que le nucléosome subit des changements conformationnels spontanés, l’ADN nucléosomal se détachant, de manière transitoire, de la surface de l’octamère d’histones (Li et al. (2005)). Ceci sera d’autant plus vrai que la concentration ionique croît : on écranter ainsi de plus en plus les interactions ADN-histones, facilitant la rupture des contacts et la respiration de l’ADN autour de l’octamère d’histones.

1.3.1.6 Incorporation de l'histone H1

L'histone H1 a un comportement très différent des histones de coeur. Il existe une seule copie de l'histone de liaison par particule de coeur de nucléosome. Celle-ci vient interagir avec les fragments d'ADN entrant et sortant de la particule de coeur, protégeant ainsi 165 paires de bases d'ADN (au lieu de 147 pb dans le cas de la particule de coeur seule) lorsque l'on soumet la chromatine à une digestion par la nucléase micrococcalle. La particule de coeur assortie de l'histone de liaison H1 est appelée *chromatosome*. H1 stabilise la structure nucléosomale et favorise la formation de structures d'ordre supérieur comme nous le verrons ultérieurement (Kornberg and Lorch (1999)).

1.3.2 Les niveaux supérieurs de compaction de la chromatine

La répétition de nucléosomes, espacés régulièrement ou non, conduit à la formation d'un chapelet de nucléosomes appelé communément *fibre de 11 nm* . Cette fibre peut, à son tour, être compactée pour former des niveaux d'organisation supérieurs. Entre la structure finale de la chromatine dans le chromosome mitotique et le chapelet nucléosomal, il a été postulé un certain nombre de niveaux intermédiaires d'organisation. Le premier niveau est nommé *fibre de chromatine de 30 nm* . Néanmoins, la généralité et l'organisation interne de ce type de fibre est depuis, largement sujet à débat et plusieurs modèles contradictoires ont été proposés. Nous allons revenir sur les différents degrés de compaction identifiés et sur les modèles proposés jusqu'ici.

1.3.2.1 Le chapelet de nucléosomes

A faible force ionique, en l'absence de l'histone de liaison. Les nucléosomes que l'on vient de décrire largement sont reliés les uns aux autres par de l'ADN de liaison dont la taille varie quelque peu (entre 10 et 80 pb). A faible force ionique (de 0 à 5 mM NaCl environ) et en l'absence de l'histone de liaison H1, la structure obtenue ressemble à un *collier de perle* : il s'agit d'une longue fibre sur laquelle se succèdent de petites particules globulaires, les nucléosomes (voir Figure 1.8).

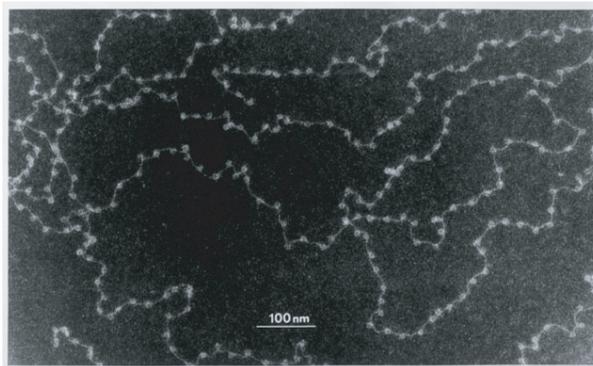


FIGURE 1.8 – Cliché de microscopie électronique sur fond sombre. Chapelets de nucléosomes (sans histone de liaison) reconstitués *in vitro* et imagés à faible force ionique. Clichés pris par A. L. Olins et D. E. Olins.

A faible force ionique, en présence de l'histone de liaison. Si l'on incorpore l'histone de liaison au chapelet de nucléosomes, celui-ci adopte une structure en zig-zag irrégulière ayant un diamètre proche

de 30 nm (Bednar et al. (1998)).

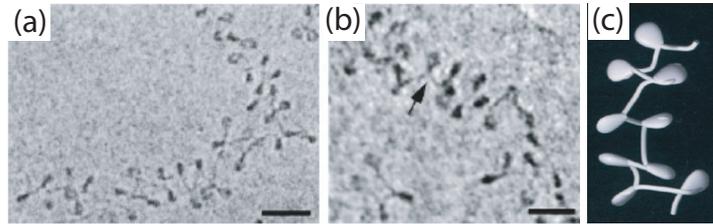


FIGURE 1.9 – (a) et (b) Clichés de cryomicroscopie de fibres de chromatine extraites des noyaux des érythrocytes de poulet dans 5 mM en sels monovalents. On indique d'une flèche la structure en *tête d'épingle* qu'adopte la particule de coeur en présence de l'histone de liaison. La barre correspond à 30 nm. (c) Modèle 3D d'un segment de chromatine contenant 9 nucléosomes. La structure en forme de *tête d'épingle* des nucléosomes est représentée par un solide légèrement allongé. *Extrait de (Bednar et al. (1998)).*

Les clichés de la figure 1.9(a) et (b) sont des images de cryomicroscopie électronique de fibres de chromatine natives extraites des érythrocytes de poulet et imagées dans un tampon à faible force ionique (5 mM en ions monovalents), ces clichés sont extraits de (Bednar et al. (1998)). Les nucléosomes considérés séparément n'apparaissent plus comme de simples disques comme en l'absence de H5 mais sous une forme plus allongée où les ADN d'entrée et de sortie de la particule de coeur semblent rapprochés formant une structure locale en *tête d'épingle*. Il a été proposé que le rôle majeur de l'histone de liaison est de maintenir l'angle entre l'entrée et la sortie des ADN sortant de la particule de coeur (Zlatanova et al. (1998)). Il permet ainsi l'adoption de la structure en zig-zag du chapelet de nucléosome, premier pas vers une organisation supérieure. Le rapprochement des brins entrant et sortant, à bas sel, nécessite d'écranter leur répulsion mutuelle, ceci est très certainement induit par les queues C-terminales des histones de liaison riches en résidus basiques. Une contribution additionnelle de la queue N-terminale de l'histone H3 est très possible (Zlatanova et al. (1998)).

1.3.2.2 La fibre de 30 nm

A force ionique plus importante. Si l'on augmente la concentration en ions monovalents (de 15 à 150 mM), la compaction de la chromatine augmente continûment (voir Figure 1.10(a)) (Zlatanova et al. (1998)).

Ceci peut se comprendre par les interactions électrostatiques existant entre l'ADN, les histones et les ions libres du tampon. Ces interactions se font essentiellement au niveau des domaines N-terminaux des histones de coeur (qui contiennent environ 50 % des acides aminés basiques de l'octamère) et des domaines C-terminaux des histones de liaison (qui rassemblent 60 % des charges positives de ces molécules) (Bednar et al. (1998)). L'étude de ces structures très denses est délicate en microscopie, puisqu'il devient difficile de suivre l'arrangement des nucléosomes. On peut néanmoins remarquer que l'augmentation de la force ionique induit la formation de structures plus ou moins cylindriques relativement irrégulières ayant un diamètre de l'ordre de 30 nm (voir Figure 1.10(b)).

On appelle *fibres de 30 nm*, les formes compactes de ce réseau de nucléosomes. Dans ces structures très denses, l'ADN se trouve être compacté d'un facteur presque 40 par rapport à la situation de la double

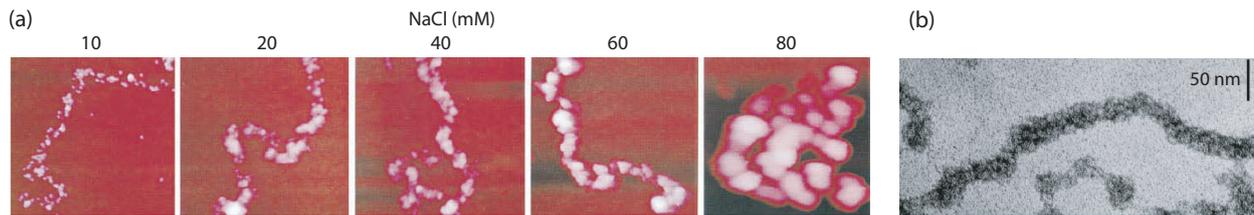


FIGURE 1.10 – (a) Compaction de fibres de chromatine induite par la présence d’ions monovalents. Des fibres de chromatine extraites d’érythrocytes de poulet sont visualisées par microscopie à force atomique pour différentes concentrations en NaCl. La compaction des fibres augmente avec la concentration en NaCl. Extrait de (Zlatanova et al. (1998)). (b) Cliché de microscopie électronique de fibres de chromatine étalées à force ionique modérée afin de maintenir l’organisation de la fibre de 30 nm. Extrait de (Olins and Olins (2003)).

hélice nue (Luger et al. (1997a)). Ces structures se forment en conditions physiologiques, on suppose donc que ces fibres reflètent l’organisation chromatinienne *in vivo* mais ceci, de même que l’existence même de cette structure *in vivo*, reste encore aujourd’hui une question ouverte.

Modèles proposés pour l’arrangement de la fibre de 30 nm. Plusieurs modèles ont été proposés pour décrire la structure de la fibre de 30 nm : les deux principaux s’accordent sur le fait qu’il s’agit d’une structure hélicoïdale de 30 nm de diamètre environ. L’équipe de Klug (Finch and Klug (1976)) a été la première à proposer le *modèle du solénoïde* dans lequel des nucléosomes consécutifs sur le chapelet de nucléosomes, restent côte à côte dans la fibre de 30 nm, celle-ci s’enroulant en une simple hélice (Dorigo et al. (2004)). Les nucléosomes voisins seraient liés les uns aux autres par l’intermédiaire de l’ADN de liaison courbé (Figure 1.11(a)). Dans le second modèle, les nucléosomes sont arrangés en zig-zag de manière à ce que deux colonnes de nucléosomes soient constituées, l’ADN de liaison reste droit et croise entre ces deux piles de nucléosomes. Dans ce modèle dit *en zig-zag*, un nucléosome interagit non pas avec son voisin direct sur le chapelet de nucléosomes mais avec son second voisin. Ceci produit une structure en double hélice (Figure 1.11(b)).

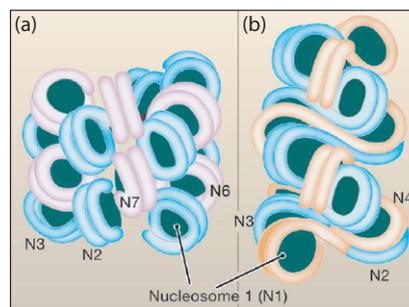


FIGURE 1.11 – (a) Modèle du solénoïde (b) Modèle en zig-zag (Tremethick (2007)).

Un grand nombre d’expériences ont d’abord encouragé le modèle en zig-zag : des expériences *in vitro* de

sédimentation et d'imagerie ont suggéré que les ADN de liaison restaient droits lorsque la concentration en sel augmentait et que la fibre gardait l'allure d'un zig-zag irrégulier (Leuba et al. (1994)), (Bednar et al. (1998)). Des données obtenues *in vivo* ont conforté également l'idée que les ADN de liaison étaient droits (Pehrson (1995)). L'équipe de Richmond a, quant à elle, apporté plusieurs arguments toujours en faveur du modèle en zig-zag. Ce groupe a notamment réalisé l'expérience suivante : des fibres contenant 12 nucléosomes en solution, sont compactées, des ponts disulfures sont établis entre les nucléosomes qui se côtoient dans la structure compacte. Ce produit est ensuite digéré par une enzyme de restriction dans des conditions non réductrices, ce qui a pour effet de couper les ADN de liaison. L'analyse des produits issus de ce processus a suggéré l'obtention de deux colonnes de 6 nucléosomes plutôt que d'un unique empilement de 12 (Dorigo et al. (2004)). Enfin, la résolution à 9 Å de la structure cristalline d'un assemblage de quatre nucléosomes a révélé également l'existence de deux colonnes de deux nucléosomes avec les trois ADN de liaison zigzagant de l'une à l'autre, confortant à nouveau le modèle en *zig-zag* (Schalch et al. (2005)). Depuis, de nouvelles études ont remis en cause ce modèle en zig-zag (Robinson et al. (2006)) : les modélisations tridimensionnelles des fibres de chromatine, étudiées dans ces expériences, ont permis de proposer des modèles *tout-atome* qui rendent compte de la compaction de la fibre de 30 nm, en considérant notamment que l'ADN de liaison est courbé (Wong et al. (2007)).

1.3.2.3 Niveaux supérieurs de compaction de la chromatine

Nous n'avons présenté jusqu'ici que les deux premiers niveaux de condensation de la chromatine : le premier niveau, le nucléosome, permet de compacter, d'un facteur 5, l'ADN par rapport à sa structure en double hélice, le second niveau, la fibre de 30 nm réalise quant à elle une compaction d'un facteur 40 environ. Néanmoins, on est encore loin de la structure très dense de la chromatine dans le noyau des cellules. Cette compaction considérable constitue un obstacle direct pour l'observation des degrés supérieurs de l'organisation de la chromatine. Les mécanismes de repliement en structures d'ordre supérieur, ainsi que leur régulation, sont encore à l'étude. De manière générale, les modèles proposés suggèrent que la fibre de 30 nm forme des boucles d'environ 300 nm, elles-mêmes se structurant à un niveau supérieur (voir Figure 1.12).

Gardons principalement en mémoire que la chromatine dans le noyau est une structure multi-échelle, dont le premier niveau de compaction est le nucléosome. A l'échelle d'un chromosome entier, la chromatine se répartit entre des zones très condensées (*hétérochromatine*) et des zones moins denses (*euchromatine*) qui regroupent presque tous les gènes transcrits de façon active. Bien que moins dense, la structure de l'euchromatine va devoir être régulée de façon active pour permettre l'accès aux gènes. On va présenter, dans le chapitre suivant, les différentes stratégies qui permettent de réguler efficacement cette structure.

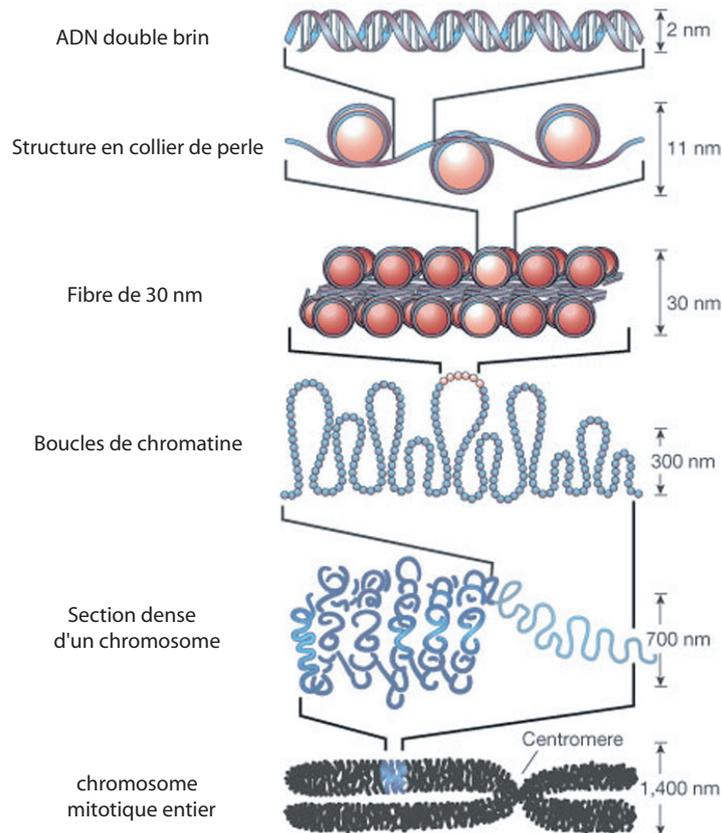


FIGURE 1.12 – Organisation de l'ADN à l'intérieur de la chromatine. Le niveau d'organisation le plus faible est le nucléosome. Ces nucléosomes sont liés entre eux par l'ADN de liaison dont la taille est variable et forme une structure en *collier de perle*. Au delà, les nucléosomes interagissent entre eux pour former la fibre de 30 nm de diamètre, ces fibres pouvant elles-mêmes s'organiser pour former des boucles et des structures d'ordre supérieur. Dès que l'on considère des niveaux de compaction au delà du nucléosome, les détails des repliements sont incertains. *Figure issue de (Felsenfeld and Groudine (2003)).*

Chapitre 2

Régulation de la structure de la chromatine

Sommaire

2.1	Trois stratégies se complètent pour assurer le remodelage de la chromatine .	29
2.2	Les modifications covalentes des histones	30
2.2.1	Les <i>MPT</i> n'entraînent pas une modification profonde de la structure interne du nucléosome	31
2.2.2	Un code des histones	31
2.2.3	Ces modifications sont étroitement liées à des activités biologiques spécifiques . . .	31
2.3	Insertion de variants d'histones	33
2.3.1	Le variant H2A.X	34
2.3.2	Le variant macroH2A	35
2.3.3	Le variant CENP-A (<i>Centromeric Protein A</i>)	36
2.4	Les facteurs de remodelage de la chromatine	36

2.1 Trois stratégies se complètent pour assurer le remodelage de la chromatine

Lorsqu'un gène doit être transcrit dans une cellule eucaryote, le substrat naturel que rencontre l'ARN polymérase est la chromatine, et non pas l'ADN directement. Cette chromatine, sous sa forme la plus dense, constitue une barrière topologique pour cette enzyme qui souhaite interagir avec l'ADN. Il va donc être nécessaire de réorganiser et décondenser au moins localement cette structure pour rendre l'ADN plus accessible. La plus ou moins grande facilité avec laquelle on accède à un gène donné est directement corrélée à son état de transcription : ainsi, il a été montré que des gènes actifs, imbriqués dans la structure chromatinienne, étaient plus facilement accessibles aux nucléases que ne le sont les gènes inactifs (Weintraub and Groudine (1976)), ceci est consistant avec l'idée que l'activation des gènes doit passer par un remodelage sélectif de la structure de la chromatine.

Les altérations que doit subir la chromatine pour rendre les gènes actifs accessibles apparaissent probablement à différents niveaux d'organisation, mais les recherches ont principalement porté sur celles impliquant directement le nucléosome. Trois stratégies ont ainsi été identifiées chez les eucaryotes pour altérer la structure de la chromatine au niveau du nucléosome (Felsenfeld and Groudine (2003)) : (i) introduction de modifications covalentes des histones à l'intérieur d'un nucléosome, (ii) insertion de variants d'histones venant remplacer une ou plusieurs histones conventionnelles, ou encore (iii) recrutement de complexes spécifiques, appelés *facteurs de remodelage de la chromatine*, qui vont utiliser l'énergie issue de l'hydrolyse de

l'ATP pour modifier la structure de la chromatine. Les deux premières stratégies ne font qu'introduire des modifications chimiques particulières au niveau du nucléosome, celles-ci seront reconnues ultérieurement par des protéines structurales ou de régulation. La troisième agit directement sur l'agencement de l'ADN nucléosomal au sein de la particule de coeur. Ces trois stratégies, schématisées sur la figure 2.1, vont être détaillées dans les paragraphes qui suivent.

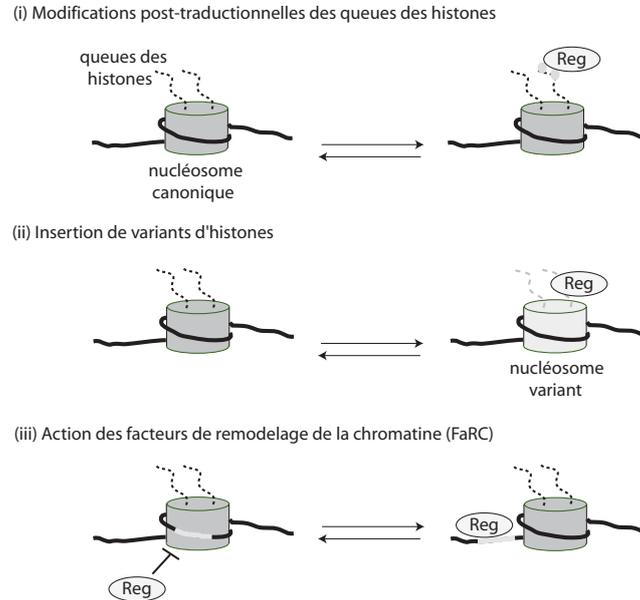


FIGURE 2.1 – Propriétés dynamiques du nucléosome. (i) Des modifications post-traductionnelles (disques grisés) au niveau des queues des histones permettent de recruter spécifiquement un facteur de régulation (Reg) ayant un domaine spécialisé qui reconnaît une modification en particulier. (ii) Un ou plusieurs variants d'histones s'insère(nt) dans le nucléosome, celui-ci a alors des queues N-terminales différentes qui peuvent éventuellement être reconnues par une protéine régulatrice spécifique (Reg). (iii) L'action d'un facteur de remodelage de la chromatine peut induire le repositionnement du nucléosome sur l'ADN libérant ainsi un site de l'ADN (segment d'ADN grisé) spécifiquement reconnu par un facteur de régulation (Reg) qui peut alors se lier à lui. Les facteurs de remodelage sont nécessaires pour permettre un accès rapide à l'ADN nucléosomal, ceci peut se faire soit en faisant glisser l'octamère d'histones le long de l'ADN, soit en éjectant le nucléosome ou en créant une boucle d'ADN sur la surface de l'octamère, rendant l'ADN accessible de manière transitoire (ces deux dernières possibilités ne sont pas représentées ici). *D'après (Saha et al. (2006)).*

2.2 Les modifications covalentes des histones

Nous avons décrit précédemment la structure particulière adoptée par le nucléosome : il s'agit d'une structure quasi-cylindrique de laquelle dépassent les queues d'histones très peu structurées et surtout fortement chargées. On avait évoqué le fait que ces queues peuvent être modifiées de manière covalente : à l'heure actuelle, plus de 70 sites ont été identifiés sur les histones comme étant la cible de ces modifications post-traductionnelles (*MPT*) et huit différents types de *MPT* ont été reportés (incluant entre autre méthylation, acétylation et phosphorylation) (Bernstein and Hake (2006)), (Taverna et al. (2007)).

2.2.1 Les *MPT* n'entraînent pas une modification profonde de la structure interne du nucléosome

Plusieurs structures cristallographiques de la particule de coeur du nucléosome ont été obtenues : deux structures, à 2.8 Å (Luger et al. (1997a)) et à 1.9 Å (Richmond and Davey (2003)), ont été obtenues à partir d'histones recombinantes de *Xenopus Laevis* exprimées chez *E. Coli*. Dans ce cas, les histones ne subissent aucune modification post-traductionnelle. Une structure à 2.5 Å a été obtenue à partir d'histones purifiées à partir des noyaux d'érythrocytes de poulet (Harp et al. (2000)). Ces histones ont, cette fois, subi de nombreuses modifications post-traductionnelles : l'analyse de l'histone H3 montre que les lysines 4, 9, 14, 36 et 79 sont méthylées alors que les lysines 18 et 23 sont acétylées. Néanmoins, la structure de la particule de coeur contenant les histones modifiées présente une structure quasi identique à celle obtenue avec des histones recombinantes. Ceci montre que les modifications n'exercent pas leur fonction biologique en modifiant profondément la structure interne du nucléosome (Khorasanizadeh (2004)).

2.2.2 Un code des histones

On a proposé un code des histones pour expliquer les motifs variés de ces modifications post-traductionnelles et leurs conséquences biologiques, cette proposition fait encore l'objet de sérieuses investigations (Strahl and Allis (2000)), (Jenuwein and Allis (2001)). De manière générale, cette théorie propose que les modifications post-traductionnelles agissent selon deux mécanismes qui ne sont pas exclusifs : (i) ces modifications pourraient changer la structure de la chromatine en modifiant les contacts entre nucléosomes via les queues d'histone modifiées, régulant ainsi l'accès des facteurs de transcription à l'ADN par exemple. Si l'on envisage le repliement de la chromatine comme essentiellement dû à des interactions électrostatiques, l'acétylation d'un résidu d'une queue d'histone de coeur (neutralisant une charge positive) ou la phosphorylation d'un résidu (ajoutant une charge négative) induirait sans doute une décondensation de la fibre (Strahl and Allis (2000)) ; (ii) ces modifications pourraient servir de marqueurs reconnus par des molécules effectrices qui, en retour, initieraient des processus biologiques particuliers.

2.2.3 Ces modifications sont étroitement liées à des activités biologiques spécifiques

Nous allons ici développer quelques exemples montrant la façon dont ces modifications post-traductionnelles sont étroitement liées à des fonctions biologiques spécifiques. Nous ne nous en tiendrons qu'à quelques exemples et tirerons quelques conséquences plus générales.

2.2.3.1 L'acétylation de lysines est catalysée par l'intermédiaire de deux enzymes ayant des rôles antagonistes

En 1964, l'acétylation, première modification post-traductionnelle observée sur les histones, a été identifiée comme ayant potentiellement un rôle dans la régulation de la synthèse de l'ARN (Alfrey et al. (1964)). En 1996, il a été mis en évidence que l'équilibre entre la forme canonique et la forme acétylée d'une histone était le résultat de l'action conjointe de deux enzymes ayant des activités opposées (l'acétyltransférase *Gcn5p* et la déacétylase *Rpd3p*) et dont on connaissait déjà le rôle de régulateur de la transcription, confirmant ainsi le lien entre l'acétylation des histones et la transcription (Taunton et al. (1996)).

2.2.3.2 L'acétylation de lysines particulières, positionnées sur les queues N-terminales des histones de coeur, joue un rôle fondamental dans la régulation de la transcription.

L'acétylation de lysines particulières est connue pour perturber les interactions entre nucléosomes : c'est notamment le cas de la lysine 16 de l'histone H4 qui, lorsqu'elle est acétylée, empêche un chapelet de nucléosomes portant cette modification de se compacter sous la forme d'une fibre de 30 nm (Shogren-Knaak et al. (2006)). Ceci confère donc à la chromatine une structure *ouverte* et donc favorable *a priori* à une activité de transcription.

Une autre façon d'envisager le rôle de ces modifications est de les interpréter comme des marqueurs pour d'autres protéines effectrices. Dans le cas de l'acétylation d'une lysine, celle-ci peut être reconnue par une protéine effectrice comportant un bromodomaine (voir Figure 2.2 (a)) (Dhalluin et al. (1999)). Les bromodomains sont des modules protéiques que l'on retrouve chez certaines protéines associées à la chromatine, plus particulièrement chez les acétyltransférases comme *Gcn5p* ou dans certaines sous-unités composant les facteurs de remodelage de la chromatine. Toujours dans le cas de l'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 (notée H4K16), des données de RMN ont permis d'établir la structure de l'association entre *Gcn5p* issu de *S. Cerevisiae* et la lysine H4K16 (voir Figure 2.2 (b)) (Owen et al. (2000)) : on a une interaction très étroite entre ces deux entités, la lysine acétylée plongeant profondément dans une poche formée à l'extrémité d'une des hélices α composant le bromodomaine. Rappelons que *Gcn5p* a une activité acétyltransférase, sa fixation au niveau d'une lysine acétylée pourrait faciliter son action d'acétylation sur une lysine voisine, suggérant ainsi un mécanisme par lequel des marqueurs acétylation *se propageraient* sur la chromatine (Kuo et al. (1996)).

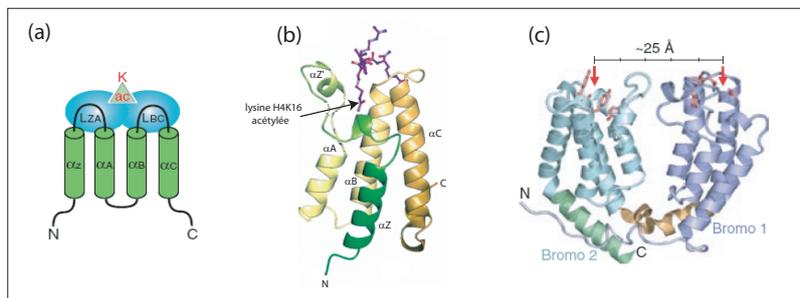


FIGURE 2.2 – (a) Représentation schématique de la structure d'un bromodomaine : il s'agit de la succession de 4 hélices α notées Z, A, B et C. (b) Structure globale de *Gcn5p* interagissant avec les résidus 15 à 29 de l'histone H4. La structure de *Gcn5p* est colorée de vert (extrémité N-terminale) à jaune (extrémité C-terminale). La lysine acétylée H4K16 est liée à *Gcn5p* à l'intérieur d'une poche formée par les structures en hélice (Owen et al. (2000)). (c) Présence de deux bromodomains dans la structure de la protéine TAF1 humaine, les sites de reconnaissance des lysines acétylées sont espacés de 25 Å (Taverna et al. (2007)).

2.2.3.3 Un codage des histones très spécifique

Dans l'exemple précédent, seul un résidu modifié est reconnu par la protéine effectrice (en l'occurrence *Gcn5p*). Bien souvent, plusieurs résidus doivent être contactés simultanément pour qu'une protéine effectrice se fixe sur la chromatine. C'est le cas par exemple de la protéine TAF1 humaine impliquée dans l'initiation de l'assemblage de la machinerie de transcription. Celle-ci est composée de deux bromodomains

successifs et dont les sites de fixation aux lysines acétylées sont distants de 25 Å environ (Figure 2.2 (c)). La queue N-terminale de l'histone H4 possède des résidus lysine aux positions 5, 8, 12 et 16. Une distance de 25 Å entre les deux bromodomains suggère un pontage entre deux lysines distantes de 7 résidus. Il a été montré que TAF1 pouvait se lier aux lysines acétylées 5 et 12 avec une constante d'association de $K_d=1,4 \mu M$. Cet exemple montre la richesse potentielle d'un tel code d'histones : des complexes qui possèderaient une variété de modules (bromodomains pour la reconnaissance d'une acétylation, chromodomains pour une méthylation...) pourraient reconnaître des ensembles de modifications très particuliers ce qui aurait pour effet de recruter de manière spécifique tel ou tel effecteur et ce, avec une grande affinité.

2.2.3.4 Les modifications post-traductionnelles sont essentielles

Remarquons que ces modifications post-traductionnelles sont essentielles au bon fonctionnement des organismes puisqu'elles interviennent dans les processus de régulation de l'expression des gènes. Ainsi, il a été montré que la perte totale de l'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 ainsi que de la triméthylation de la lysine 20 de H4 était liée au développement de cancer du sein et du foie (Fraga et al. (2005)), (Fraga and Esteller (2005)).

2.3 Insertion de variants d'histones

Nous avons détaillé précédemment la composition des histones canoniques et leur arrangement au sein du nucléosome. Nous avons alors évoqué l'existence de variants de ces histones qui pouvaient s'avérer similaires (H3.1 ou H3.2) ou au contraire très différents des histones canoniques (macroH2A). Ces variants d'histones jouent un rôle majeur dans la régulation de la structure de la chromatine et ont des implications dans de nombreuses fonctions cellulaires. En effet, ils permettent d'une part de faire varier la composition des nucléosomes individuels en venant remplacer localement une ou plusieurs histones canoniques assemblées dans un nucléosome. Ceci modifie les caractéristiques du nucléosome en induisant des changements structuraux et/ou des différences de charges relatives (provenant soit de la séquence en acides aminés, différente de celle de l'histone conventionnelle, soit de l'effet de modifications post-traductionnelles particulières). Ils vont, d'autre part, enrichir encore davantage le code des histones en proposant de nouvelles combinaisons de modifications post-traductionnelles au niveau de leurs propres queues (qui diffèrent de celles des histones canoniques).

Les variants d'histones sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires allant de l'activation de la transcription ou de la répression de gènes, à l'identification de dommages sur l'ADN ou l'établissement des centromères.

On ne cherchera pas ici à en faire une liste exhaustive. Le tableau ci-dessous (Bernstein and Hake (2006)) reprend un certain nombre de variants identifiés chez les mammifères. Nous présenterons le cas de trois d'entre eux : deux variants de l'histone H2A : H2A.X et macroH2A et un variant de l'histone H3 : CENP-A.

2.3. INSERTION DE VARIANTS D'HISTONES

Histones	Localisation	Fonctions spécialisées
H2A (15)	TG	ND (histone de coeur)
H2A.X (1)	TG ^a	réparation de l'ADN, maintien de l'intégrité génomique
H2A.Z (1)	TG ^b	activation, répression de gènes, ségrégation des chromosomes
H2A.Bbd (1)	exclu de Xi	activation de gènes ?
MacroH2A1.1 (1)	Xi	inactivation du chromosome X, répression de gènes ?
MacroH2A1.2 (1)	Xi	inactivation du chromosome X, répression de gènes ?
MacroH2A2 (1)	Xi	inactivation du chromosome X, répression de gènes ?
H2B (17)	TG	ND (histone de coeur)
spH2B (ND) (TS)	télomères	ND
H2BFWT (1) (TS)	télomères ?	ND
hTSH2B (1) (TS)	ND	ND
H3.1 (10)	ND	ND
H3.2 (1)	ND	ND
H3.3 (2)	euchromatine	activation de gènes
H3.1t (1) (TS)	ND	ND
CENP-A (1)	centromères	ségrégation des chromosomes
H4(14)	TG	ND (histone de coeur)

Notes :

Les nombres suivant le nom des histones indiquent le nombre de gènes correspondant identifiés chez l'Homme.

TS : spécifique d'un tissu.

TG : localisation dans tout le génome (*throughout genome*).

ND : non déterminé.

Xi : chromosome X inactif.

? : fonction hypothétique qui n'a pas encore été confirmée expérimentalement.

^a : la forme de H2AX phosphorylée du fait d'un dommage de l'ADN se trouve spécifiquement au niveau des cassures double-brin.

^b : chez *S. Cerevisiae*, H2A.Z se localise au niveau des extrémités de la chromatine, on pense qu'elle empêche la progression de l'hétérochromatine dans l'euchromatine. Chez les mammifères, elle est exclue du chromosome X réprimé (noté Xi).

2.3.1 Le variant H2A.X

On le retrouve dans tous les organismes eucaryotes analysés jusqu'à présent. Il joue un rôle fondamental dans la détection des dommages causés à l'ADN. En fait, H2A.X est même la forme prédominante de l'histone H2A chez *S. Cerevisiae*. Chez les mammifères, H2A.X est très similaire à l'histone canonique, il contient cependant un motif SQ unique au niveau de sa queue C-terminale et dont la séquence et la position par rapport à l'extrémité C-terminale est invariante parmi les espèces (voir Figure 2.3). Lors d'un dommage causé à l'ADN ou de l'induction d'une cassure double brin de l'ADN, des variants H2A.X, incorporés à proximité de ces dommages, vont subir des modifications : la sérine de leur motif SQ est phosphorylée (S139 chez les mammifères), signalant ainsi les dommages à d'éventuelles protéines effectrices. La forme phosphorylée de H2A.X est appelée γ -H2A.X car elle avait été identifiée à l'origine chez des cellules de mammifères irradiées aux rayons γ . La forme canonique de H2A chez les mammifères ne contient pas de sérine en position 139 donc seule H2A.X peut être phosphorylée à ce site. Ensuite, la protéine MDC1

(*mediator of DNA damage checkpoint 1*) va reconnaître spécifiquement S139 et est responsable de l'accumulation de protéines intervenant dans la réponse à un dommage de l'ADN au niveau de la chromatine endommagée (Stucki et al. (2005)). H2A.X semble jouer un rôle de gardien de l'intégrité génomique, il semble également jouer un rôle important en limitant le développement tumoral (Celeste et al. (2003)).

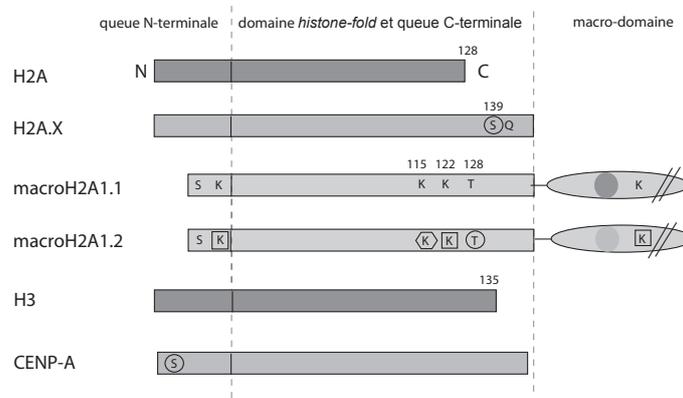


FIGURE 2.3 – Représentation schématique des queues N-terminales et du domaine *histone-fold* de quelques variants des histones H2A et H3 de mammifères. Quand les séquences des protéines divergent significativement, les domaines des histones apparaissent dans des teintes de gris différentes. Quelques acides aminés spécifiques sont précisés lorsqu'ils sont sujets à des modifications post-traductionnelles particulières (comme la phosphorylation de la sérine 139 de H2A.X). Les modifications post-traductionnelles subies sont légendées comme suit : un cercle pour une phosphorylation, un carré pour une méthylation, un polygone pour une ubiquitination. Les macro-domaines de macroH2A1.1 et macroH2A1.2 ne sont pas représentés à l'échelle et sont représentés sous forme d'un ovale pour les distinguer des domaines type histones. MacroH2A1.1 et macroH2A1.2 sont deux variants qui diffèrent simplement l'un de l'autre par un épissage différent (exon 6 du macro-domaine, représenté par un disque de teinte différente dans les deux variants).

2.3.2 Le variant macroH2A

Durant les premiers stades de développement des mammifères, l'un des deux chromosomes X des femelles est réprimé. Il a été montré que le variant macroH2A est un ingrédient essentiel dans l'établissement puis le maintien de cet état réprimé : ce variant s'associe à la forme condensée du chromosome X réprimé, ce qui suggère qu'il joue un rôle clef dans la répression de la transcription de la chromatine (Costanzi and Pehrson (1998)).

MacroH2A est un variant spécifique des vertébrés et, comme son nom l'indique, il s'agit d'un variant de grande taille qui contient une région de type H2A (65 % d'identité avec H2A) à l'extrémité N-terminale et un large domaine du côté C-terminal et qui compte pour les 2/3 de la protéine (voir Figure 2.3).

On pense que macroH2A exerce son activité de répression en inhibant à la fois le remodelage de la chromatine (Angelov et al. (2003)) et la transcription (Doyen et al. (2006)). L'inhibition de l'activité de remodelage est attribuée au domaine histone tandis que la répression de la transcription serait principalement due au macro-domaine de macroH2A.

2.3.3 Le variant CENP-A (*Centromeric Protein A*)

C'est l'un des variants de l'histone H3 le plus spécialisé. Il diffère énormément de l'histone conventionnelle au niveau de sa queue N-terminale. CENP-A, que l'on retrouve chez tous les organismes eucaryotes jusqu'alors étudiés, est un déterminant critique de la chromatine centromérique et son positionnement sur le chromosome détermine sans doute l'identité du centromère (Sullivan et al. (2001)). Ce variant se retrouve invariablement au niveau du kinétochore actif et son expression est maximale en fin de phase S/G2. Il a été montré que ce variant joue un rôle important dans les premières étapes du développement embryonnaire de la souris : les embryons déficients en CENP-A présentaient, entre autre, des problèmes sévères au cours de la mitose, des fragmentations de la chromatine ou son hypercondensation.

Au niveau des centromères, l'histone CENP-A remplace la forme majoritaire de H3 (Smith and Peterson (2004)). Alors que des preuves montrent que H3 est remplacée, les autres histones conventionnelles sont maintenues. Les centromères sont connus pour être des régions riches en hétérochromatine et dont la structure est plus compacte qu'en moyenne. CENP-A pourrait jouer un rôle majeur dans le maintien de ce haut niveau de compaction. Des expériences réalisées sur des mouches, des vers et sur la levure, en supprimant l'expression de CENP-A, ont montré que CENP-A est important pour assurer une formation correcte de nouveaux centromères (Smith (2002)).

2.4 Les facteurs de remodelage de la chromatine

En plus des deux processus décrits précédemment (modifications post-traductionnelles des histones et introduction de variants d'histones) qui modifient de manière covalente la structure du nucléosome, il existe un autre moyen mis en oeuvre chez les eucaryotes pour rendre la structure de la chromatine dynamique et qui marche de concert avec les processus précédents : il s'agit de l'action de complexes qui sont capables, en utilisant l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP, de modifier l'organisation des nucléosomes le long de l'ADN : ils peuvent ainsi éjecter ou déplacer un nucléosome le long de l'ADN, altérer le positionnement de l'ADN nucléosomal sur la surface de l'octamère d'histones, ils peuvent également modifier l'agencement des nucléosomes les uns par rapport aux autres en régularisant par exemple leur position le long de la fibre. Ces complexes sont appelés *facteurs de remodelage de la chromatine*.

L'objet de ce travail de thèse a été de mieux caractériser l'action de certains de ces facteurs de remodelage de la chromatine. Ces complexes étant au centre de ce travail de recherche, nous allons les décrire précisément dans le chapitre qui suit. Cela nous donnera l'occasion de présenter les différentes familles dans lesquelles ils ont été regroupés, de revenir sur leurs rôles *in vivo* et *in vitro* et de présenter les modèles habituellement proposés pour justifier leurs actions. Ce sera alors l'occasion de revenir sur ce qui reste méconnu quant à leur mode d'action et de motiver ce travail de thèse.

Chapitre 3

Les facteurs de remodelage de la chromatine

Sommaire

3.1	Classification des différents facteurs de remodelage de la chromatine	38
3.1.1	Les facteurs de remodelage parmi les membres de la super-famille SF2	38
3.1.2	Les quatre principaux types de facteurs de remodelage de la chromatine	39
3.2	La famille Swi2/Snf2	41
3.2.1	Les complexes associés aux membres de la famille Swi2/Snf2 chez <i>S. Cerevisiae</i> , <i>H. sapiens</i> , et <i>D. Melanogaster</i>	41
3.2.2	Le complexe SWI/SNF de <i>S. Cerevisiae</i>	42
3.2.3	Le complexe RSC de <i>S. Cerevisiae</i>	43
3.3	La famille Iswi	45
3.3.1	Les différents membres de la famille Iswi	45
3.3.2	Les complexes de la famille Iswi	46
3.3.3	Rôles <i>in vivo</i> de ces complexes ISWI	47
3.4	La famille Nurd/Mi-2/Chd	48
3.4.1	Présentation des membres de cette famille	48
3.4.2	Rôles <i>in vivo</i>	49
3.5	La famille Ino80/Swr1	50
3.5.1	Les complexes associés aux membres de la famille Ino80/Swr1	50
3.5.2	Rôles <i>in vivo</i> de ces complexes	51
3.6	Activité de remodelage de la chromatine de ces complexes	51
3.6.1	Remodelage d'un mononucléosome	51
3.6.2	Remodelage d'une fibre de chromatine	57
3.6.3	Les facteurs de remodelage sont des translocases	60
3.6.4	Changements conformationnels lors de l'activité de remodelage	62
3.7	Mécanismes proposés pour l'action de ces facteurs	63
3.7.1	Diffusion d'une boucle d'ADN à la surface de l'octamère ou <i>Bulging model</i>	64
3.7.2	Diffusion de torsion à la surface de l'octamère ou <i>Twisting model</i>	64
3.8	Atouts et limites de ces approches biochimiques	65
3.8.1	Limites des approches biochimiques	65
3.8.2	Observation ou manipulation d'une molécule à la fois	66

3.1 Classification des différents facteurs de remodelage de la chromatine

3.1.1 Les facteurs de remodelage parmi les membres de la super-famille SF2

Il y a environ 18 ans, Gorbalenya et Kooning ont identifié un large groupe de protéines partageant une série de courts motifs répétés. La majorité des membres de ce groupe, dont la fonction était connue, se sont révélés être des hélicases, enzymes qui catalysent, de manière processive, la séparation des deux brins de l'ADN (Gorbalenya et al. (1988)), (Gorbalenya and Koonin (1993)). Elles sont donc capables, d'une part, de se déplacer de manière processive le long d'une molécule d'ADN (on parle de *translocation* de la protéine le long de l'ADN) et, d'autre part, de séparer les deux brins lors de ce mouvement. Les motifs répétés ont été alors appelés *motifs hélicases* et numérotés de manière séquentielle (I, Ia, II, III, IV, V et VI). Les protéines contenant ces motifs hélicases ont alors été subdivisées, tout d'abord, en super-familles (SF1, SF2, ...) compte tenu de leurs plus ou moins grandes homologies de séquences. Des caractérisations de leurs structures ont révélé que les membres des super-familles SF1 et SF2 ont un coeur protéique qui ressemble de très près à deux domaines de type RecA (voir figure 3.1) (Singleton and Wigley (2002)), (Subramanya et al. (1996)). Au niveau du pont entre ces deux domaines, on retrouve chacun des motifs conservés et des études structurales et de mutagenèse dirigée ont montré que chacun de ceux-ci jouaient un rôle clef dans la transformation de l'énergie chimique issue de l'ATP, en travail mécanique. Ces enzymes sont capables de coupler l'hydrolyse de l'ATP à un changement relatif d'orientation des deux domaines de type RecA (Ye et al. (2004)). Ce processus enzymatique couplant énergie chimique et travail mécanique est vraisemblablement à la base de l'activité de ces protéines.

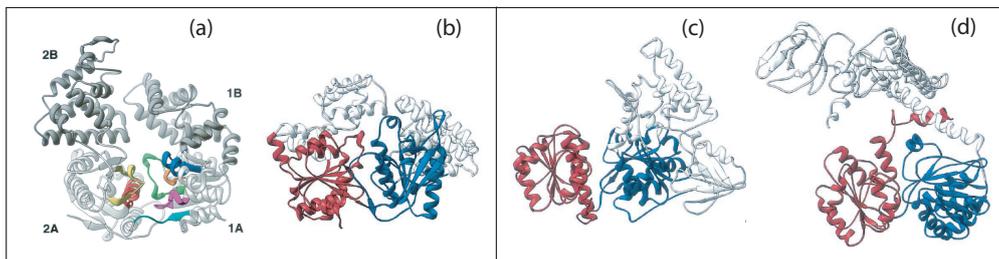


FIGURE 3.1 – Illustration de la conservation de la présence de deux domaines type RecA parmi les membres des super-familles SF1 et SF2 : ces deux domaines sont reliés par un pont composé des motifs *hélicases* conservés, c'est également à ce niveau que se trouve le site de fixation et d'hydrolyse de l'ATP. Cadre de gauche : deux membres de la famille SF1. Cadre de droite : deux membres de la famille SF2. (a) Représentation en ruban de la structure de l'hélicase de *Bacillus stearothermophilus* PcrA, les domaines de type RecA (1A et 2A) apparaissent en gris clair. Les couleurs des 7 motifs hélicases conservés sont les suivantes : motif I (magenta), motif Ia (bleu), motif II (orange), motif III (vert), motif IV (bleu cyan), motif V (jaune) et motif VI (rouge). (b) Hélicase Rep de *E. Coli*. (c) UvrB de *Thermus thermophilus*. (d) RecG de *Thermotoga maritima*. Pour les représentations (b), (c) et (d), les domaines de type RecA apparaissent en bleu (pour l'équivalent du domaine 1A de PcrA) et en rouge (pour l'équivalent du domaine 2A de PcrA).

Les super-familles (SF1, SF2...) peuvent, à leur tour, être subdivisées en familles (Snf2, DEAD box hélicases, RecG hélicases...) sur la base de similarités de séquences de leurs *motifs hélicases* (voir figure

3.1. CLASSIFICATION DES DIFFÉRENTS FACTEURS DE REMODELAGE DE LA CHROMATINE

3.2). Il est apparu que de nombreux membres de la famille Snf2 étaient en fait associés à d'autres sous-unités pour former des complexes multiprotéiques plus larges, provoquant des altérations de la structure de la chromatine. Ces complexes sont appelés *facteurs de remodelage de la chromatine* (parfois abrégés en *FaRC*). En dépit des similarités de séquences de leur domaine ATPase avec la sous-unité ATPase des vraies hélicases, aucun des facteurs de remodelage étudiés ne semble être capable de séparer les brins d'une molécule d'ADN (Flaus and Owen-Hughes (2001)). On reviendra ultérieurement sur le rôle que peut jouer, dans ce cas, le domaine ATPase de type Snf2 de ces complexes.

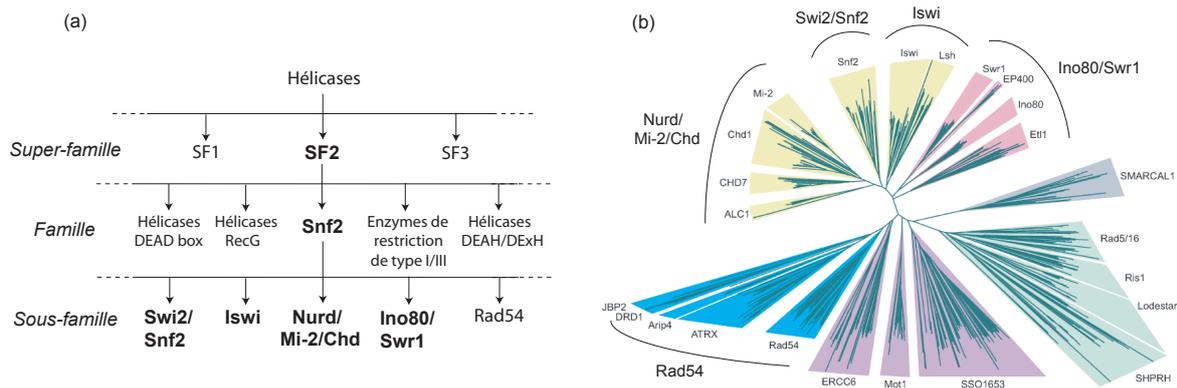


FIGURE 3.2 – (a) Diagramme schématisant la classification hiérarchique des super-familles, familles et sous-familles des protéines contenant des motifs hélicases. (b) Arbre phylogénétique radial, sans racine, construit à partir de l'alignement multiple des séquences de type hélicase pour 1306 protéines de la sous-famille Snf2 identifiées dans la base de données Uniref (certaines insertions dans les motifs I et Ia ont été exclues). *Extrait de (Flaus et al. (2006)).*

3.1.2 Les quatre principaux types de facteurs de remodelage de la chromatine

Des études biochimiques récentes et de nouveaux alignements de séquences ont suggéré que les membres de la famille Snf2 pouvaient se regrouper plus finement en sous-familles en fonction de la présence d'autres domaines caractéristiques (bromodomaines, chromodomaines...) (Eisen et al. (1995)), (Flaus et al. (2006)), (Hogan and Varga-Weisz (2007)). On a donné à ces sous-familles le nom de leurs membres les plus emblématiques : on identifie notamment les sous-familles Swi2/Snf2, Iswi, Nurd/Mi-2/Chd et Ino80/Swr1 (Figure 3.2). Dans le cas de la sous-famille Swi2/Snf2, ses membres contiennent un bromodomaine qui leur permet de se lier aux histones acétylées ; les membres de la sous-famille Iswi contiennent un domaine SANT, motif de liaison à l'ADN fréquemment trouvé dans des protéines liées à la chromatine (Aasland et al. (1996)) ; ceux de la sous-famille Nurd/Mi-2/Chd contiennent un chromodomaine qui leur permet de se lier aux histones méthylées ainsi qu'un site de fixation à l'ADN (*Myb-like DNA binding*) ; enfin, la sous-famille Ino80/Swr1 est caractérisée par la présence d'une séquence supplémentaire séparant le domaine ATPase en deux (voir la Figure 3.3).

L'appellation *facteurs de remodelage de la chromatine* pourrait être étendue à la protéine Rad54 qui est capable d'altérer la structure de la chromatine *in vitro* et qui est susceptible de repositionner les nucléosomes lors de la réparation de l'ADN (Jaskelioff et al. (2003)), (Alexeev et al. (2003)), mais il lui manque

3.1. CLASSIFICATION DES DIFFÉRENTS FACTEURS DE REMODELAGE DE LA CHROMATINE

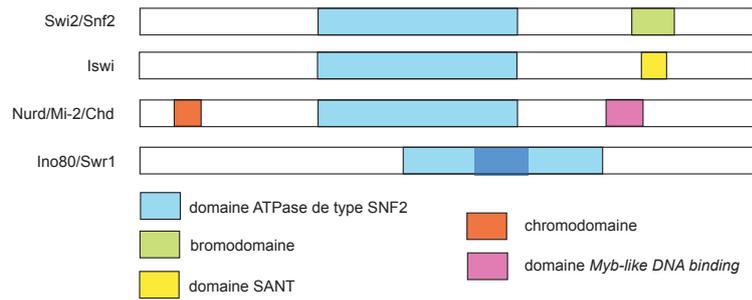


FIGURE 3.3 – Résumé des traits caractéristiques des sous-unités ATPases des différentes classes de facteurs de remodelage de la chromatine. Les membres de la sous-famille Swi2/Snf2 contiennent un bromodomaine qui leur permet de se lier aux histones acétylées : Swi2/Snf2 (du complexe γ SWI/SNF) et Sth1 (du complexe RSC) chez la levure, Brg1 et hBrm chez l’Homme et Brahma chez la Drosophile appartiennent à ce groupe. Les membres de la famille Iswi contiennent un domaine SANT et sont retrouvés dans les complexes NURF, ACF et CHRAC de la Drosophile. La sous-famille Nurd/Mi-2/Chd contient un chromodomaine ; Mi-2 est le membre prédominant de ce groupe et est la sous-unité centrale du complexe NURD. La sous-famille Ino80/Swr1 a une séquence supplémentaire séparant le domaine ATPase en deux, ses membres se retrouvent dans les complexes INO80 et SWR1. D’après (Hogan and Varga-Weisz (2007)).

apparemment des domaines interagissant de manière spécifique avec les nucléosomes (Cairns (2007)).

Nous allons à présent nous intéresser uniquement aux quatre sous-familles Swi2/Snf2, Iswi, Nurd/Mi-2/Chd et Ino80/Swr1 et plus particulièrement aux deux premières qui ont été les plus étudiées. 1 à 15 facteurs additionnels peuvent venir s’associer *in vivo* avec les membres de ces groupes pour former un complexe multi-protéique, le facteur de remodelage complet, capable d’altérer la structure de la chromatine *in vivo* et *in vitro* d’une manière ATP-dépendante. Remarquons que dans plusieurs cas, le membre de la famille Snf2 seul partage plusieurs propriétés *in vitro* avec l’enzyme complète (Saha et al. (2002)). L’association aux sous-unités additionnelles pourrait stimuler ou moduler l’activité du membre de Snf2 isolé et permettre également de cibler son activité via la présence de sites de reconnaissance spécifiques portés par les sous-unités additionnelles.

Nous allons revenir sur les différentes caractéristiques structurales de ces quatre grands groupes, puis nous présenterons leurs activités *in vivo* et *in vitro*.

Note : nous utiliserons, par la suite, les conventions d’écriture suivantes : les noms des gènes (ex : HSP70, FTZ...) et des complexes multiprotéiques (ex : NURF, CHRAC, ISW2...) seront donnés en majuscule et les noms des protéines (ex : Iswi, Acf1...) n’auront une majuscule qu’à la première lettre. De plus, pour simplifier l’énoncé, nous parlerons des familles Swi2/Snf2, Iswi, Nurd/Mi-2/Chd ou Ino80/Swr1 plutôt que d’utiliser le terme de sous-familles.

3.2 La famille Swi2/Snf2

3.2.1 Les complexes associés aux membres de la famille Swi2/Snf2 chez *S. Cerevisiae*, *H. sapiens*, et *D. Melanogaster*

On compte deux membres de la famille Swi2/Snf2 chez *S. Cerevisiae* : Swi2/Snf2, la sous-unité catalytique du complexe SWI/SNF (mating type SWIching / SUCrose NON Fermenting) et Sth1, celle du complexe RSC (Remodells the Structure of Chromatin) (voir figure 3.4 (a) et (b)). Ces complexes (SWI/SNF et RSC) ont tout deux 11 sous-unités ou plus, avec plusieurs sous-unités qui sont très similaires voire identiques (Cairns et al. (1994)), (Cairns et al. (1996)), (Peterson et al. (1994)) (Figure 3.4 (b)). RSC est dix fois plus abondant dans la cellule que SWI/SNF (Cairns et al. (1996)) et est essentiel à la mitose contrairement à SWI/SNF. Ces deux complexes ont des rôles distincts et non redondants.

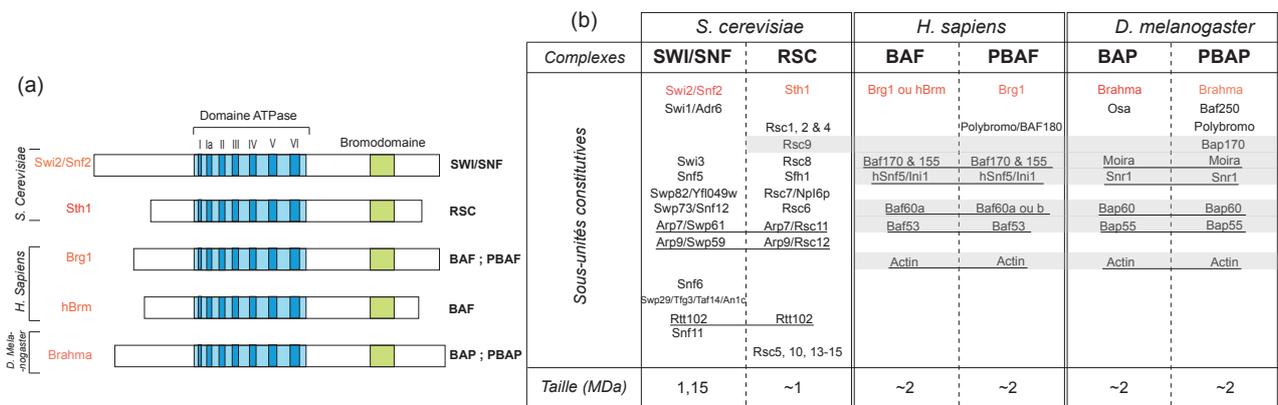


FIGURE 3.4 – (a) Schéma des sous-unités ATPases des complexes de la famille Swi2/Snf2. Les domaines conservés sont représentés. Le nom des protéines est indiqué en rouge à gauche ; le nom des complexes dans lesquels on retrouve ces protéines apparaît en gras à droite. D’après (Kingston and Narlikar (1999)). (b) Sous-unités composant les complexes associés aux membres de la famille Swi2/Snf2 chez *S. Cerevisiae*, *H. Sapiens* et *D. Melanogaster* : la sous-unité ATPase est en rouge, les sous-unités partagées par plusieurs complexes d’un même organisme sont soulignées, les sous-unités homologues dans les différents organismes sont grisées. Les tailles en MDa des complexes sont précisées au bas du tableau (Smith and Peterson (2004)). D’après (Gangaraju and Bartholomew (2007)).

Chez *Drosophila Melanogaster*, les deux formes du complexe SWI/SNF sont appelées BAP (Brahma Associated Proteins) et PBAP (Polybromo-associated BAP) et contiennent la même sous-unité catalytique (Brahma) mais se distinguent par le fait que BAP contient la sous-unité Osa alors que PBAP contient les sous-unités Polybromo, Bap250 et Bap170.

Le cas de l’Homme est un peu plus complexe : même si on peut dire que le complexe SWI/SNF se décline à nouveau sous deux formes : les facteurs associés à Brg1/hBrm (appelés BAF), et les PBAF (Polybromo-associated BAF), il y a beaucoup de complexes de type SWI/SNF qui s’associent à des sous-unités spécifiques (comme le facteur BRCA1, des composants de l’histone déacétylase Sin3, ou d’histone méthylases) (Gangaraju and Bartholomew (2007)).

Cette famille est la plus étudiée de toutes. Nous nous restreindrons à la présentation de RSC, protéine

que nous avons étudié au cours de cette thèse et de SWI/SNF, la plus étudiée. Nous allons présenter leurs rôles *in vivo*.

3.2.2 Le complexe SWI/SNF de *S. Cerevisiae*

3.2.2.1 Identification du complexe SWI/SNF

Le complexe SWI/SNF a été le premier facteur de remodelage mis en évidence chez *S. Cerevisiae*. Il a été mis en évidence de manière séquentielle : plusieurs sous-unités de ce complexe ont été identifiées par deux ensembles de mutants particuliers. Dans le premier groupe, des mutations induisaient une réduction de l'expression du gène SUC2. Ce gène code pour une invertase, c'est-à-dire une enzyme nécessaire aux levures afin d'utiliser soit le sucrose, soit le raffinose en tant que source de carbone. La transcription du gène SUC2 est réprimée en présence de hautes concentrations en glucose et est au contraire activée fortement en présence de très faibles concentrations de glucose. Ces mutations, qui entraînaient une baisse de l'expression du gène SUC2 à faible glucose ont été appelées SNF (pour *Sucrose Non-Fermenter*). Dans le second groupe, les mutations induisaient un défaut dans l'expression du gène HO, nécessaire pour le changement de type sexuel de la levure. Les mutations qui réduisaient l'expression du gène HO ont été appelées SWI (pour *SWIatching-defective*). On a montré que certains gènes concernés pour ces deux ensembles de mutations se recoupaient. Cela a permis de regrouper les gènes de type SNF et ceux de type SWI et de suggérer que ceux-ci codaient pour des protéines appartenant à un seul et même complexe. Des études biochimiques ultérieures ont confirmé ceci en purifiant, par des techniques standard, le complexe SWI/SNF de la levure (Cairns et al. (1994)), (Peterson et al. (1994)). On trouve de 100 à 200 complexes SWI/SNF par cellule (Cairns et al. (1996)).

3.2.2.2 Structure du complexe SWI/SNF

SWI/SNF est un complexe constitué de 11 sous-unités encodées par les gènes SWI1, SW2/SNF2, SWI3, SNF5, SNF6, SNF11, SWP82, SWP73, SWP29, ARP7 et ARP9 (Figure 3.5(a)).

La sous-unité catalytique Swi2 contient en particulier un bromodomaine, et une région *AT-hook* en plus de son domaine ATPase. Le bromodomaine permet vraisemblablement son interaction avec les queues des histones (au niveau de résidus acétylés) tandis que la région *AT-hook* est un site privilégié de fixation au niveau de régions de l'ADN riches en bases A et T. Ces domaines jouent certainement un rôle clef pour que le complexe cible son action au niveau de la chromatine (Aravind and Landsman (1998)), (Boyer et al. (2004)). Les autres sous-unités associées sont essentielles, notamment pour moduler l'activité catalytique de Swi2/Snf2 et cibler son action de remodelage (Elgin and Workman (2000)).

Une structure tridimensionnelle avec une résolution de 3 nm a été proposée par C. L. Smith et al (Smith et al. (2003)) sur la base de clichés de microscopie électronique (voir figure 3.5(b) et (c)) : le complexe formé de 11 sous-unités a une masse de 1,15 MDa et adopte la forme d'un ovoïde de 25 nm par 12 nm. Il présente plusieurs renflements proéminents. Ces renflements pourraient permettre des interactions privilégiées avec les nucléosomes, l'ADN ou d'autres partenaires protéiques.

3.2.2.3 Rôle de SWI/SNF dans la régulation de la transcription

Bien que SWI/SNF ne soit essentiel que pour la transcription de 1 à 6 % des gènes de *S. Cerevisiae* (Sudarsanam et al. (2000)), ce complexe joue un rôle décisif dans la régulation de la transcription de multiples

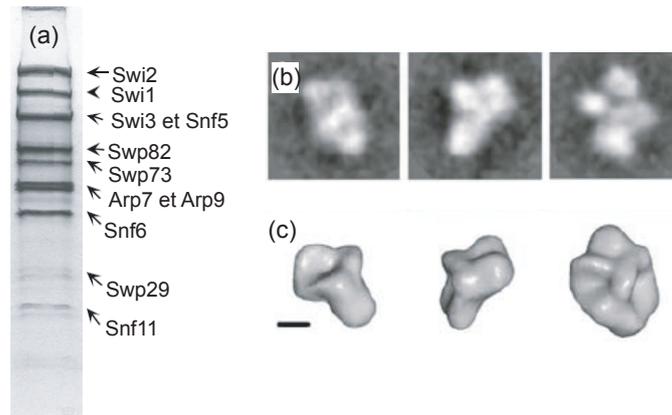


FIGURE 3.5 – (a) Gel SDA-PAGE à 10-20 % montrant la composition du complexe SWI/SNF purifié. (b) et (c) Structures tridimensionnelles du complexe SWI/SNF obtenues par des études de microscopie électronique : le complexe se présente sous une forme oblongue de 12 nm par 25 nm. La barre d'échelle correspond à 100 Å. On présente ici différentes vues moyennées de SWI/SNF (b), ainsi que le rendu tridimensionnel des complexes, avec une résolution de 3 nm (c). *Extrait de (Smith et al. (2003)).*

gènes inductibles : c'est le cas de gènes impliqués dans le métabolisme (HIS3, SUC2, INO1 et PHO8) et du gène contrôlant le changement de type sexuel (HO) (Smith and Peterson (2004)).

De même, l'expression des gènes en fin de mitose semble dépendre de manière globale de l'activité de SWI/SNF (Krebs et al. (2000)). Le fait que SWI/SNF soit requis lors de la mitose est cohérent avec l'idée que SWI/SNF pourrait réguler la structure de la chromatine à grande échelle (Horn and Peterson (2002)). Ajoutons que, chez l'Homme, les homologues du complexe SWI/SNF jouent un rôle majeur pour la différenciation cellulaire et dans les stades précoces du développement (Muller and Leutz (2001)). Par exemple, l'induction de la différenciation des cellules musculaires ou des adipocytes nécessite les homologues de la sous-unité Swi2/Snf2 (Brg1 et hBrm) (la Serna et al. (2001)), (Salma et al. (2004)).

3.2.2.4 SWI/SNF et les cancers

De nombreux liens ont été établis entre les complexes SWI/SNF humains (BAF et PBAF) et plusieurs formes de cancers. Des études suggèrent que les sous-unités ATPases homologues de Swi2/Snf2 (Brg1 et hBrm) peuvent agir en tant que suppresseurs de tumeurs (Huang et al. (2002)), (Neely and Workman (2002)). Des mutations des sous-unités Brg1 et hBrm ont été découvertes dans des cancers du poumon et de l'estomac (Reisman et al. (2003)), (Sentani et al. (2001)). Différentes mutations ont été découvertes dans le gène de Brg1 dans le cas de plusieurs autres cancers, incluant des cancers du sein, des poumons, de la prostate et du pancréas (Wong et al. (2000)).

3.2.3 Le complexe RSC de *S. Cerevisiae*

RSC peut être purifié à partir d'extraits de levure par des méthodes de chromatographie classiques (Cairns et al. (1996)), (Cairns et al. (1999)), (Wittmeyer et al. (2004)). Ce complexe peut exister sous deux formes différentes : l'une contenant la sous-unité Rsc1 tandis que l'autre contient Rsc2 (Lorch and Kornberg (2004)). L'isolation de la forme contenant Rsc2 est plus avantageuse dans la mesure où Rsc2 est plus abondante

que Rsc1 chez la levure.

3.2.3.1 Structure tridimensionnelle du complexe RSC

Des études de microscopie électronique ont permis d'obtenir une structure tridimensionnelle du complexe RSC avec une résolution de 25 Å (Asturias et al. (2002)). RSC semble être composé de quatre modules entourant une cavité (voir Figure 3.6(b)). La taille et la forme de la cavité pourrait être adaptée pour qu'un nucléosome vienne s'y loger et interagir avec le facteur de remodelage. Une étude plus récente précise cette structure et montre que RSC adopte deux conformations distinctes, l'une dans laquelle la cavité centrale est très accessible ce qui permet au nucléosome de venir s'y insérer, l'autre dans laquelle un bras du complexe bascule pour venir envelopper le nucléosome (Leschziner et al. (2007)). On compte de l'ordre de plusieurs milliers de complexes RSC par cellule.

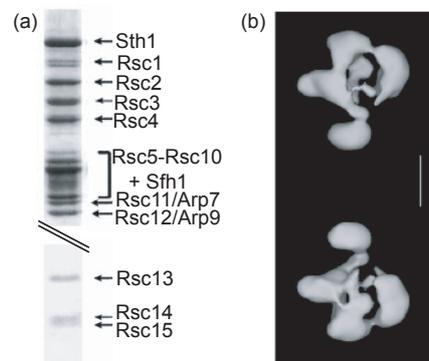


FIGURE 3.6 – (a) Gel SDA-PAGE montrant la composition du complexe RSC purifié. (b) Structure tridimensionnelle du complexe RSC obtenue par des études de microscopie électronique : quatre modules forment une cavité centrale. La barre d'échelle correspond à 100 Å.

Le fait que RSC soit un complexe essentiel à la viabilité des cellules rend très difficile l'analyse génétique de celui-ci et l'identification précise de ses rôles *in vivo*. Néanmoins, de nombreuses études suggèrent qu'il joue un rôle important en tant que régulateur de la transcription, il intervient également dans de nombreux autres processus cellulaires.

3.2.3.2 RSC joue un rôle essentiel dans le contrôle de la transcription et son activité est corrélée à des modifications de la structure de la chromatine.

Le complexe RSC joue un rôle essentiel dans le contrôle de la régulation de la transcription. RSC est par exemple nécessaire pour l'activation de l'expression des gènes lors de l'initiation de la méiose (Yukawa et al. (1999)). Le mutant *nps1-105* de RSC (mutant de la sous-unité ATPase Sth1) induit une décroissance notable et un délai de l'expression de plusieurs gènes (*IME2*, *SPO11* et *SPO13*) induits en début de méiose. Dans le cas du gène *CHA1* de *S. Cerevisiae*, Moreira et Holmberg ont montré que RSC est essentiel au maintien de la répression de la transcription de celui-ci (Moreira and Holmberg (1998)), (Moreira and Holmberg (1999)). Détaillons cet exemple : ce gène code pour une enzyme qui catalyse la déshydratation de la L-sérine (ou L-thréonine). La présence (respectivement l'absence) de sérine ou de thréonine dans le milieu active (respectivement inactive) la transcription de ce gène. Si on délète les sous-unités Rsc8 et Sth1p du

complexe RSC, l'expression du gène CHA1 dans les cellules non induites ((ie) en l'absence de sérine ou de thréonine) est comparable à celle des cellules induites. Ceci suggère que la répression de la transcription du gène n'a plus lieu.

Moreira et Holmberg montrent ainsi que RSC joue un rôle dans le maintien de l'état réprimé du gène ; ils montrent de plus que cet état correspond au maintien d'une structure chromatiniennne répressive au niveau du promoteur du gène CHA1 de *S. Cerevisiae*. Ceci confirme à nouveau le fait que **les changements transcriptionnels sont corrélés à des modifications de la structure de la chromatine**. Dans le cas présenté ci-dessus : des études d'accessibilité de la nucléase micrococcale et de la DNase I à l'ADN ont permis de déterminer *in vivo* la localisation des nucléosomes à la fois dans l'état induit et non induit (Moreira and Holmberg (1998)). En l'absence de sérine (thréonine), un réseau régulier de nucléosome est constitué en amont de la TATA box d'une part et sur le gène CHA1 d'autre part. Un autre nucléosome est positionné spécifiquement sur la TATA box. En présence de sérine (thréonine), la TATA box est libérée de tout nucléosome et le réseau de nucléosomes sur le gène CHA1 est complètement désorganisé. Lorsque l'on délète les cellules en Rsc8 et Sth1, on retrouve une organisation des nucléosomes semblable à celle de l'état induit. Cela montre que le remodelage du promoteur par RSC est requis pour qu'il y ait une transcription régulée : RSC maintient la structure répressive de la chromatine pour le gène CHA1 en l'absence de sérine ou de thréonine.

3.2.3.3 Autres rôles identifiés *in vivo*

RSC intervient dans des processus cellulaires majeurs :

L'analyse des mutants *rsc3* et *rsc30* a permis d'identifier plusieurs classes de gènes RSC-dépendant comprenant des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'intégrité de la paroi cellulaire ou d'autres intervenant dans la biogénèse des ribosomes (Angus-Hill et al. (2001)). RSC joue également un rôle majeur lors de la réparation de cassures double brin dans l'ADN au cours de la recombinaison homologue (Chai et al. (2005)), son rôle se distingue de celui de SWI/SNF, ces deux complexes n'étant pas recrutés au même stade de la recombinaison homologue.

RSC joue également un rôle essentiel dans des processus liés au cycle cellulaire :

Il intervient entre autre dans la cohésion des chromatides soeurs (Baetz et al. (2004)), (Huang et al. (2004)), et dans la ségrégation des chromosomes (Tsuchiya et al. (1998)), (Baetz et al. (2004)).

3.3 La famille Iswi

3.3.1 Les différents membres de la famille Iswi

Les premiers membres de cette famille ont été identifiés dans des embryons de *D. Melanogaster* (Gangaraju and Bartholomew (2007)). La sous-unité ATPase de ce groupe de facteurs de remodelage a été nommée Iswi (Imitation SWIch) du fait de sa similarité avec la sous-unité catalytique de la famille Swi2/Snf2. On a par la suite identifié d'autres complexes de la famille Iswi chez d'autres organismes, en particulier chez *S. Cerevisiae*, *H. Sapiens* et *M. Musculus*. Chez la levure, la sous-unité ATPase se décline sous deux formes : Isw1 et Isw2, formes homologues à la sous-unité Iswi de la Drosophile. La forme homologue retrouvée chez l'Homme est appelée hSnf2h, celle de la souris mSnf2h.

Les caractéristiques structurales de la sous-unité Iswi, hormis la présence du domaine catalytique,

est la présence d'un domaine SANT (*SWI3*, *ADA2*, *N-CoR* et *TFIIB*) et l'absence d'un Bromodomaine (contrairement au cas de la sous-unité Swi2/Snf2). En plus de ce domaine SANT, on trouve les domaines SLIDE (*SANT-like ISWI domain*), HAND et AID (*Acf1 Interaction Domain*) (voir Figure 3.7 (a)). Les domaines SANT et SLIDE sont connectés par un domaine en hélice fortement conservé. Les domaines SANT et SLIDE participent à la fixation de Iswi à l'ADN. La délétion soit du domaine SANT, soit du domaine SLIDE n'affecte pas la fixation de Iswi aux nucléosomes, par contre, la délétion des deux domaines affecte profondément cette fixation. La queue C-terminale de la sous-unité Iswi est vitale pour la reconnaissance des nucléosomes. La délétion de SLIDE empêche presque totalement l'activité ATPase de Iswi. Isw1 et Isw2 de *S. Cerevisiae* partagent la même organisation en domaines que Iswi mis à part le domaine AID qui est absent des complexes de la levure.

3.3.2 Les complexes de la famille Iswi

3.3.2.1 Présentation des différents complexes

Les complexes formés à partir des membres de la famille Iswi^a présentés précédemment sont relativement petits : entre 300 et 800 kDa et contiennent entre 2 et 4 sous-unités (voir Figure 3.7(b)).

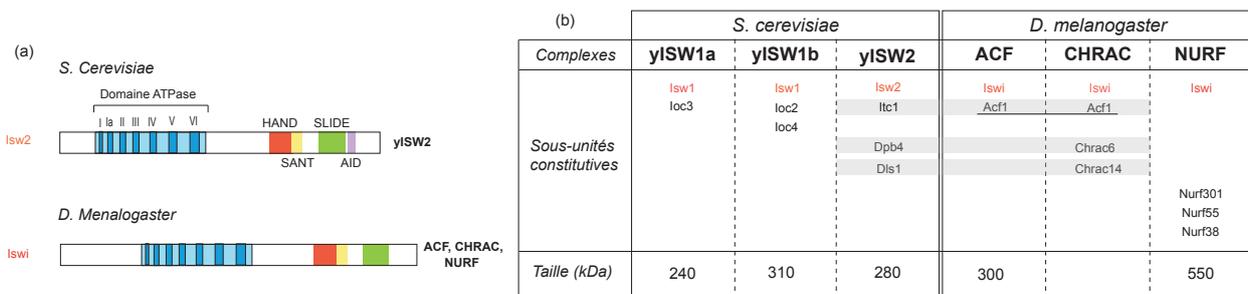


FIGURE 3.7 – (a) Organisation en domaines des sous-unités ATPase Isw2 (de *S. Cerevisiae*) et Iswi (de *D. Melanogaster*). (b) Sous-unités composant les complexes associés aux membres de la famille Iswi chez *S. Cerevisiae* et *D. Melanogaster* : la sous-unité ATPase est en rouge, les sous-unités partagées par plusieurs complexes d'un même organisme sont soulignées, les sous-unités homologues dans les différents organismes sont grisées. Les tailles en kDa des complexes sont précisées au bas du tableau (Smith and Peterson (2004)), (Tsukiyama et al. (1999)). D'après (Gangaraju and Bartholomew (2007)).

On en compte trois différents chez *D. Melanogaster* : il s'agit des complexes ACF (*ATP-utilizing Chromatin Factor*), CHRAC (*CHromatin Accessibility Complex*) et NURF (*NUcleosome Remodeling Factor*). Ils possèdent tous la même sous-unité ATPase Iswi mais diffèrent dans la nature des sous-unités associées à celle-ci. Chez *S. Cerevisiae*, trois différents complexes de type ISWI coexistent : deux sont liés à la sous-unité Isw1, il s'agit de yISW1a et yISW1b, un dernier s'assemble autour de la sous-unité ATPase Isw2, il se nomme ISW2^b. Chez l'Homme, les complexes de type ISWI sont encore plus variés, on compte, entre autres, RSF (*Remodeling and Spacing Factor*) et WCRF/hACF (*Williams syndrome transcription factor*

a. On les appellera souvent *complexes de type ISWI* ou plus simplement *complexes ISWI*.

b. On notera ce complexe soit ISW2 soit yISW2, le *y* faisant référence à *yeast*, l'organisme dont le complexe est issu. Cette notation sera parfois utilisée pour d'autres complexes : un *d* devant le nom du complexe fera référence à *Drosophila Melanogaster*, un *h* à *Homo Sapiens*.

Chromatin Remodeling Factor). Ils sont tous construits autour de la sous-unité hSnf2h, homologue à Iswi.

3.3.2.2 Sous-unités identiques partagées par différents complexes

Nous avons pu constater dans le paragraphe précédent qu'il pouvait exister, pour un même organisme, plusieurs complexes construits autour d'une même unité ATPase. C'est le cas des complexes NURF, ACF et CHRAC de la Drosophile. Certains partagent en plus d'autres sous-unités : la sous-unité Acf1 entre, par exemple, dans la composition de ACF et CHRAC (voir figure 3.7(b)). Il va donc y avoir compétition au sein de la cellule pour ces sous-unités afin de constituer les complexes correspondants.

Ces complexes, bien que partageant la même sous-unité catalytique, n'ont pas des activités redondantes : les sous-unités qui entourent le coeur catalytique vont avoir pour mission de moduler, de spécifier l'activité enzymatique de la sous-unité Iswi (Bouazoune and Brehm (2006)). C'est le cas de la sous-unité Acf1 des complexes ACF et CHRAC qui influence l'activité de la sous-unité Iswi seule : Acf1 semble se lier directement au substrat nucléosomal (Fyodorov and Kadonaga (2002)) et semble jouer un rôle actif en présentant ce substrat à la sous-unité Iswi ce qui a pour effet de stimuler son activité (Eberharter et al. (2004)).

3.3.3 Rôles *in vivo* de ces complexes ISWI

Les facteurs de remodelage contenant la sous-unité Iswi ont des rôles globaux ou, au contraire, très spécifiques, allant du maintien de la structure globale de chromosomes entiers ou de la création de larges régions chromatiniennes réprimées, à la régulation de la transcription d'un gène unique. Ils interviennent également lors de l'assemblage des octamères d'histones sur l'ADN et de la régulation de leur espacement.

3.3.3.1 Rôle des complexes ISWI dans la régulation de la transcription

Il a été montré que le complexe NURF de la Drosophile active la transcription en remodelant la chromatine au niveau des promoteurs des gènes HSP70 et FTZ (Okada and Hirose (1998)), (Tsukiyama et al. (1994)). Cette activité de remodelage fait plus particulièrement intervenir la sous-unité Nurf301. Les complexes ISWI peuvent également jouer un rôle de répression : ils répriment ainsi l'expression de gènes spécifiques au cours des premiers stades de développement larvaire de la Drosophile (Smith and Peterson (2004)).

Les sous-unités Isw2 et Itc1 du complexe yISW2 de la levure sont nécessaires à la répression de la transcription de gènes méiotiques (Goldmark et al. (2000)). Les complexes yISW1a et yISW1b jouent quant à eux un rôle important lors des phases d'élongation et de terminaison de la transcription d'un gène par la RNA polymérase II (*RNAPII*). Ces deux complexes peuvent s'associer à la RNAPII pendant la transcription. yISW1a s'associe à la RNAPII au niveau du promoteur avant l'activation du gène, maintenant la transcription du gène dans un état réprimé grâce à un réseau de nucléosomes positionné sur la région du promoteur. Lors de l'activation du gène, yISW1a se dissocie et yISW1b s'associe à son tour à la RNAPII (Morillon et al. (2003)). yISW1b coordonne l'élongation, la terminaison et la production d'ARNm.

3.3.3.2 Rôle des complexes ISWI au cours du développement

Des études ont montré que chez des Drosophiles déficientes en ces complexes, les larves de mouches mâles avaient un fort degré de décondensation de leur chromosome X, suggérant un rôle de ces complexes dans le maintien de la structure des chromosomes (Deuring et al. (2000)). Des analyses complémentaires

suggèrent que ce rôle de maintien est plus spécifiquement lié au complexe NURF (Badenhorst et al. (2002)). L'inactivation de la sous-unité Nurf301 du complexe NURF entraîne, soit l'arrêt du développement de la Drosophile au stade larvaire, soit l'échec de sa métamorphose, ou encore sa mort (Badenhorst et al. (2002)), (Badenhorst et al. (2005)). La sous-unité Acf1 des complexes ACF et CHRAC joue aussi un rôle important au cours du développement de la Drosophile : la majorité des Drosophiles ne possédant pas Acf1 meurent durant la transition du stade larvaire au stade pupal (Fyodorov et al. (2004)).

3.3.3.3 Rôle des complexes ISWI dans l'assemblage de la chromatine et la régulation de l'espacement entre nucléosomes

Des mutants de la Drosophile pour la sous-unité Acf1 présentent trois phénotypes qui sont reliés : (i) la chromatine extraite de ces mutants présente une structure sans périodicité et l'espacement entre les nucléosomes est réduit, (ii) les gènes contenus dans l'hétérochromatine ne sont plus réprimés, (iii) la durée de la phase S de la mitose est plus courte (Fyodorov et al. (2004)). Ces observations, complétées par le fait que Acf1 interagit avec la chaperonne NAP-1, ont permis de préciser le rôle *in vivo* des complexes contenant la sous-unité Acf1 : ils permettent l'assemblage régulier de chapelets de nucléosomes contribuant à la répression de la transcription ou de la réplication de l'ADN (Fyodorov et al. (2004)). Cette vision est renforcée par des résultats obtenus *in vitro* pour le complexe ACF qui permet l'assemblage régulier de nucléosomes (Lusser et al. (2005)) (nous y reviendrons par la suite).

3.4 La famille Nurd/Mi-2/Chd

Cette famille est la moins bien caractérisée de toutes et possède des protéines encore non caractérisées.

3.4.1 Présentation des membres de cette famille

Le premier membre de la famille Nurd/Mi-2/Chd a été découvert et caractérisé chez la souris en 1993, il s'agit de CHD1 (*Chromodomain-Hélicase DNA binding protein*). Le clonage et séquençage de ce complexe a permis de déterminer 3 domaines fonctionnels et structuraux qui indiquent clairement la possibilité d'interaction potentielle avec les nucléosomes et plus particulièrement un rôle dans le remodelage de la chromatine (Delmas et al. (1993)) : (i) présence d'un chromodomaine dans la partie N-terminale de la protéine, un domaine que l'on retrouve chez d'autres protéines associées à la chromatine comme Hp1, (ii) présence d'un domaine ATPase qui a une forte similarité avec les domaines de type Swi2/Snf2 et (iii) présence d'un domaine de fixation à l'ADN dans la partie C-terminale de la protéine (Stokes and Perry (1995)).

En 2007, 9 membres de cette famille avaient pu être identifiés chez une variété d'organismes eucaryotes incluant *C. Elegans*, *E. Coli*, *D. Melanogaster*, *M. Musculus* et *H. Sapiens* (Hall and Georgel (2007)) . En se basant à la fois sur des différences de séquences à l'extérieur des trois domaines précités et sur les différents partenaires fonctionnels avec lesquels ces membres s'associent, les protéines de type Nurd/Mi-2/Chd ont été regroupées en trois groupes : groupe I (contenant Chd1 et Chd2), groupe II (contenant Chd3 et Chd4) et groupe III (contenant Chd5, Chd6, Chd7, Chd8, Chd9, Kismet-L, T04D-14 et KIAA1416). Leur taille est comprise entre 223 kDa (pour Chd5) et 252,5 kDa (pour Chd7) (Hall and Georgel (2007)). Ces différentes protéines peuvent être associées à d'autres sous-unités pour former des complexes tels que le complexe NURD ou ATRX chez l'Homme ou le complexe Mi-2 chez la souris (voir Figure 3.8). Il est à noter que, contrairement aux autres facteurs de remodelage, CHD1 existe principalement sous la forme d'un monomère^c (Lusser et al. (2005)).

c. On parlera du complexe CHD1 même si celui-ci ne contient qu'une sous-unité : Chd1.

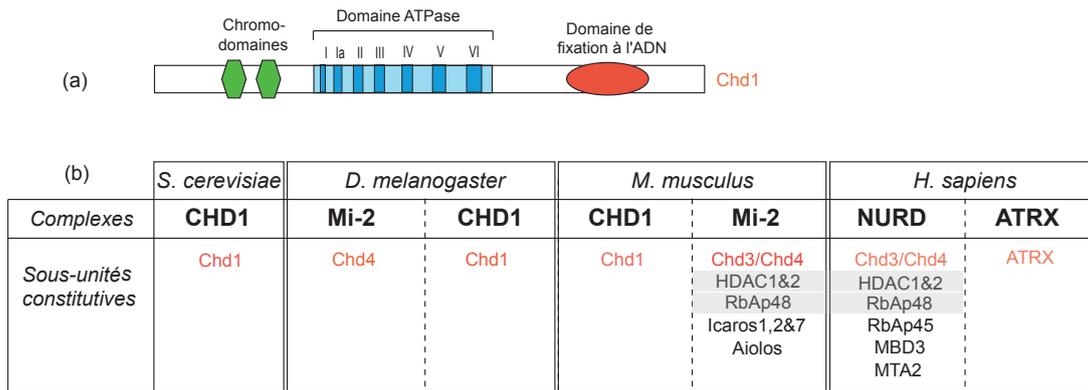


FIGURE 3.8 – a) Organisation en domaines de la sous-unité Chd1 (de *S. Cerevisiae*, *D. Melanogaster* ou *M. Musculus*). (b) Sous-unités composant les complexes associés aux membres de la sous-famille Nurd/Mi-2/Chd chez *S. Cerevisiae*, *D. Melanogaster*, *M. Musculus* et *H. Sapiens* : la sous-unité ATPase est en rouge, les sous-unités homologues dans les différents organismes sont grisées. D’après (Gangaraju and Bartholomew (2007)).

3.4.2 Rôles *in vivo*

Des études génétiques, biochimiques et structurales ont démontré que les complexes de la famille Nurd/Mi-2/Chd sont des régulateurs importants de la transcription et jouent des rôles critiques durant des processus de développement. Nombre de ces complexes sont aussi impliqués dans des maladies humaines (Marfella and Imbalzano (2007)).

3.4.2.1 Rôle de régulateur de la transcription

Le complexe CHD1 de la Drosophile (noté dCHD1) intervient dans la régulation de la transcription. Premièrement, il a été localisé sur les chromosomes polyténiques au niveau des régions diffuses et relâchées (*interbands*) et dans les régions où existe une forte activité de transcription (*puffs*) ; ceci suggère un rôle de dCHD1 dans l’activation de la transcription (Stokes et al. (1996)). En accord avec ceci, dCHD1 est largement colocalisé avec les formes actives de la RNA polymérase II (Srinivasan et al. (2005)). De plus, dCHD1 peut interagir avec SSRP1 (*Structure Specific Recognition Protein 1*), une sous-unité du facteur d’élargation de la transcription FACT (*Facilitates Chromatin Transcription*) (Orphanides et al. (1998)), (Kelley et al. (1999)). Enfin, il a été montré récemment que les chromodomaines des complexes CHD1 interagissent de manière spécifique avec les queues des histones H3 méthylées en K4, cette méthylation étant une marque d’une chromatine activement transcrite (3rd Sims et al. (2005)), (Pray-Grant et al. (2005)), (Flanagan et al. (2005)).

3.4.2.2 Implication de ces complexes dans le développement et la différenciation cellulaire

Les complexes de la famille Nurd/Mi-2/Chd jouent un rôle dans le développement et les processus de différenciation cellulaire (Marfella and Imbalzano (2007)), (Smith and Peterson (2004)). Des mutations de la protéine Mi-2 de la Drosophile sont létales pour les embryons, et, dans *C. Elegans*, LET-418/Mi-2 est nécessaire pour le maintien de la différenciation cellulaire des cellules somatiques, une étape cruciale dans les premiers stades du développement embryonnaire (Khattak et al. (2002)), (Unhavaithaya et al. (2002)).

3.4.2.3 Implication de ces complexes dans certaines maladies humaines

Des mutations de nombreux complexes de la famille Nurd/Mi-2/Chd ont été associées à des maladies humaines comme le montre le tableau suivant (Marfella and Imbalzano (2007)).

Complexe impliqué	Maladie humaine associée
hCHD3	<i>Dermatomyositis</i> Lymphome de Hodgkin
hCHD4	<i>Dermatomyositis</i>
hCHD5	Neuroblastome
hCHD7	Syndrome CHARGE

3.5 La famille Ino80/Swr1

On va présenter plus brièvement cette famille étant donné que l'on ne sera pas amené, au cours de ce travail de thèse, à travailler directement avec l'un de ses membres.

3.5.1 Les complexes associés aux membres de la famille Ino80/Swr1

Chez *S. Cerevisiae*, les deux complexes associés aux membres de la famille Ino80/Swr1 sont de très gros complexes contenant 15 sous-unités pour yINO80 et 14 pour ySWR1 (*Swi2/Snf2 Related*) (voir figure 3.9). Les sous-unités ATPases associées à ces complexes possèdent un domaine ATPase de type hélicase qui n'est pas contigu comme pour les autres sous-familles.

Complexes	<i>S. cerevisiae</i>		<i>H. sapiens</i>
	yINO80	ySWR1	hINO80
Sous-unités constitutives	Ino80	Swr1	hIno80
	Arp8		Arp8
	Arp5		Arp5
	Arp4	Arp4	BAF53a/Arp4
	Rvb1	Rvb1	Tip49a
	Rvb2	Rvb2	Tip59b
	les2		hles2/PAPA-1
	les6		hles6/C18orf37
	Act1	Act1	Amida
	Taf14	Arp6	FLJ90652
	Nhp10	Aor1/Swc5	NFRKB
	les1	Vps71/Swc6	MCRS1
	les3	Vps72/Swc2	FJL20309
	les4	Yaf9	
	les5	Bdf1	
	Swc1/Swc3		
	Swc4/God1		

FIGURE 3.9 – Sous-unités composant les complexes associés aux membres de la sous-famille Ino80/Swr1 chez *S. Cerevisiae* et *H. Sapiens* : la sous-unité ATPase est en rouge, les sous-unités partagées par plusieurs complexes d'un même organisme sont soulignées, les sous-unités homologues dans les différents organismes sont grisées. D'après (Gangaraju and Bartholomew (2007)).

3.5.2 Rôles *in vivo* de ces complexes

yINO80 joue un rôle lors de la réparation de cassures de l'ADN. En effet, l'une des premières étapes de la réponse de la cellule à un dommage causé à l'ADN est une phosphorylation rapide de l'histone H2AX adjacent au site de cassure de l'ADN, la forme phosphorylée est notée γ -H2AX. Or des études ont montré qu'il existait une forte interaction entre yINO80 et γ -H2AX, ceci suggère un mode de recrutement de yINO80 au niveau des cassures double-brin de l'ADN (van Attikum et al. (2004)).

SWR1 est nécessaire à l'incorporation du variant H2A.Z à approximativement 25 sites différents dispersés sur l'ensemble du génome de la levure (Meneghini et al. (2003)).

Ces complexes sont également impliqués dans l'activation de la transcription. La protéine Htz1 joue un rôle dans la transcription et peut aussi jouer le rôle de barrière empêchant les régions télomériques réprimées de déborder sur les régions de la chromatine où la transcription est activée. Il a été observé que la déposition de Htz1 au niveau des télomères était dépendante de SWR1 (Zhang et al. (2004)). Des analyses biochimiques ont montré que la sous-unité Swc2 de SWR1 se liait physiquement à Htz1 et était nécessaire au dépôt de Htz1 sur les télomères (Wu et al. (2005)).

3.6 Activité de remodelage de la chromatine de ces complexes

Le remodelage de la chromatine décrit une altération de la structure du nucléosome sans que l'on ne connaisse davantage la nature du changement ni le mécanisme sous-jacent. Le remodelage peut être observé à l'échelle d'un nucléosome unique ou bien au niveau d'un réseau linéaire constitué de plusieurs nucléosomes.

Quelque soit la famille de facteurs de remodelage considérée, nous avons pu voir que ses membres sont impliqués *in vivo* dans des processus directement liés à des changements structuraux de la chromatine : c'est le cas pour la régulation de la transcription de gènes (HO, PHO8, SUC2...), le maintien de la structure globale de chromosomes entiers (exemple du chromosome X) ou le contrôle de la position des régions denses (hétérochromatine), ou moins denses (euchromatine) au sein d'un chromosome particulier (exemple du chromosome polyténique). Ces considérations ont motivé de nombreuses études biochimiques pour essayer d'appréhender la façon dont ces facteurs de remodelage perturbent la structure de la chromatine. Le remodelage de la chromatine peut être observé à l'échelle d'un nucléosome unique au bien au niveau d'un réseau linéaire constitué de plusieurs nucléosomes ; cette considération va guider l'organisation des prochains paragraphes. Nous nous limiterons aux facteurs de remodelage SWI/SNF et RSC pour la famille Swi2/Snf2, aux membres de la famille Iswi rencontrés chez la levure (yISW1a, yISW1b, yISW2) et chez la drosophile (sous-unité seule dIswi, ACF, CHRAC, NURF) et au complexe CHD1^d.

3.6.1 Remodelage d'un mononucléosome

Différentes expériences de biochimie ont été mises au point pour mettre en évidence les altérations d'un mononucléosome suite à l'action d'un facteur de remodelage de la chromatine (*FaRC*). On va en présenter plusieurs que l'on a schématiquement illustré dans la figure 3.10.

d. Comme précédemment, pour simplifier les notations, on parlera des *complexes Swi2/Snf2* pour faire référence aux complexes associés à une sous-unité de la famille Swi2/Snf2 et des *complexes ISWI* pour faire référence à ceux associés à une sous-unité de la famille Iswi.

3.6.1.1 Principe des expériences permettant de tester l'activité de remodelage d'un FaRC sur un mononucléosome

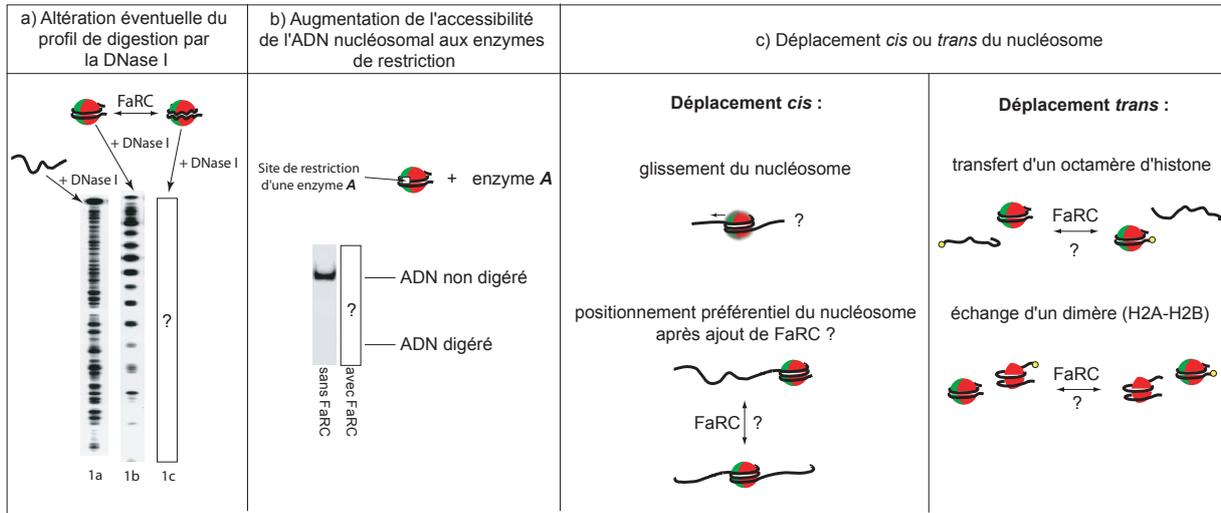


FIGURE 3.10 – Tests biochimiques permettant de sonder l'altération de la structure d'un nucléosome unique, après action d'un facteur de remodelage de la chromatine. (a) Altération éventuelle du profil de digestion par la DNase I. (b) Augmentation de l'accessibilité de l'ADN nucléosomal aux enzymes de restriction. (c) Déplacement *cis* ou *trans* du nucléosome.

Altération du profil de digestion d'un ADN nucléosomal par la DNase I. On digère, par la DNase I, un fragment d'ADN court (par exemple le fragment 5S RNA), puis le même fragment d'ADN sur lequel est positionné un nucléosome. On fait migrer sur gel les produits de digestion obtenus : pour l'ADN nu, on obtient un profil de digestion relativement uniforme (Figure 3.10 (a), colonne 1a); pour l'ADN nucléosomal, le profil présente une alternance de bandes avec une périodicité de ~ 10 pb puisque la DNase I coupe l'ADN au niveau de son sillon mineur qui se trouve exposé tous les 10 bp environ à la surface de l'octamère (Figure 3.10 (a), colonne 1b).

On ajoute au substrat nucléosomal, un facteur de remodelage en présence d'ATP, et on regarde si cela perturbe le profil de digestion par la DNase I préalablement obtenu.

Augmentation de l'accessibilité de l'ADN nucléosomal aux enzymes de restriction. Le test classique consiste à positionner un nucléosome sur un court fragment d'ADN possédant une séquence positionnante (généralement le fragment 5S RNA de 167 pb) et contenant un site de reconnaissance d'une enzyme de restriction près du dyad de nucléosome (dans le cas du fragment 5S RNA, présence d'un site de restriction pour l'enzyme Dra I au niveau du dyad du nucléosome) (Figure 3.10(b)). En l'absence de FaRC, la digestion de l'ADN ne peut avoir lieu : l'ADN est en effet enroulé contre la surface de l'octamère d'histones et le site de restriction est alors protégé. On regarde si l'ajout d'un FaRC, en présence d'ATP, rend possible ou non la coupure de ce site.

Déplacements *cis* et *trans*. Les déplacements *cis* correspondent à un glissement de l'octamère d'histones le long d'un fragment d'ADN. Ce glissement peut entraîner le positionnement du nucléosome en des lieux privilégiés le long de l'ADN. Les déplacements *trans* correspondent à des transferts éventuels de l'octamère (ou simplement d'un dimère (H2A-H2B)) d'un fragment d'ADN vers un autre accepteur.

Déplacements *cis*. Le substrat utilisé pour ces expériences est un court fragment d'ADN (environ 200 pb) sur lequel est positionné un octamère d'histones. On fait migrer ce substrat : on obtient différentes bandes correspondant à différentes positions que peut adopter l'octamère d'histones le long de l'ADN (les substrats, pour lesquels l'octamère adopte une position proche des extrémités de l'ADN, migrent plus vite qu'un fragment d'ADN sur lequel l'octamère est au centre). On place ce substrat en présence du FaRC étudié et d'ATP et on regarde, après remodelage, la modification éventuelle du profil de migration sur gel des produits issus du remodelage.

Déplacements *trans*. Pour détecter les transferts d'octamères, on met en présence des fragments courts d'ADN possédant un nucléosome avec des fragments d'ADN nus, servant d'accepteurs, qui sont marqués par un phosphate ^{32}P radioactif. En présence du FaRC étudié et d'ATP, on regarde si on voit apparaître, après migration sur gel, une bande radioactive migrant moins vite que le fragment accepteur seul et correspondant à un fragment accepteur sur lequel a été transféré un octamère d'histones (Lorch et al. (1999)).

Pour détecter les échanges de dimères (H2A-H2B), on positionne un octamère d'histones sur un fragment d'ADN (220 pb environ) dans lequel les histones H2A sont marqués par un *tag* fluorescent (fluorophore Oregon Green par exemple). On place ces nucléosomes en présence de fragments d'ADN plus courts ne possédant que des tétramères (H3-H4)₂ et servant l'accepteurs. On ajoute, à ces deux substrats, le FaRC étudié en présence d'ATP. On regarde, après migration sur gel, l'apparition éventuelle de fluorescence pour ces fragments plus courts, témoignant d'un transfert d'un ou de deux dimères (H2A-H2B) (Bruno et al. (2003)).

3.6.1.2 Remodelage d'un mononucléosome par les complexes de type Swi2/Snf2

Les complexes Swi2/Snf2 perturbent significativement le chemin qu'emprunte l'ADN nucléosomal autour de la surface de l'octamère

Le gel à gauche de la figure 3.11 (a) montre les résultats obtenus pour RSC pour le test à la DNase I : la colonne 1c correspond à la digestion du substrat nucléosomal remodelé par RSC, elle ressemble davantage au profil de digestion de l'ADN seul (1a) qu'à celui de l'ADN nucléosomal seul (1b). Ceci suggère un réarrangement significatif de la position de l'ADN sur la surface de l'octamère, rendant celui-ci bien plus accessible à la nucléase DNase I (Cairns et al. (1996)), (Lorch and Kornberg (2004)), (Wittmeyer et al. (2004)). Un résultat similaire a été obtenu avec SWI/SNF. Pour ces deux complexes, un ratio molaire 1 :1 entre les nucléosomes et les facteurs de remodelage est nécessaire (Cairns et al. (1996)).

L'expérience testant un changement de l'accessibilité d'un site de restriction situé au niveau du dyad d'un nucléosome confirme ceci : la figure 3.11 (b) présente les résultats obtenus pour RSC : en l'absence de RSC, la digestion de l'ADN nucléosomal par l'enzyme de restriction Dra I ne peut avoir lieu (colonne 3) : l'ADN est en effet enroulé contre la surface de l'octamère d'histones et le site de restriction est alors protégé. L'ajout de RSC rend la digestion possible (colonnes 5-8) montrant que l'ADN a été déplacé de la surface de l'octamère. Ceci a également été vérifié dans le cas de la sous-unité ATPase Sth1 seule (Saha

3.6. ACTIVITÉ DE REMODELAGE DE LA CHROMATINE DE CES COMPLEXES

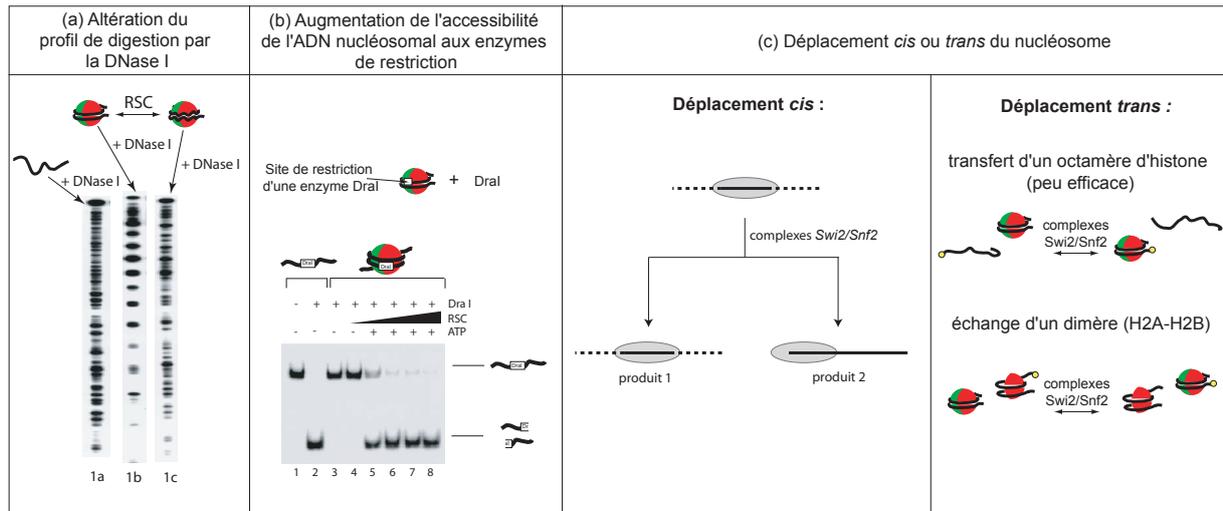


FIGURE 3.11 – (a) Migration sur gel du produit de digestion par la DNase I (1a) du fragment d'ADN *5S RNA* seul, (1b) du même fragment d'ADN *5S RNA* sur lequel est positionné un nucléosome, (1c) du même mononucléosome après remodelage par RSC en présence d'ATP. Extrait de (Cairns et al. (1996)). (b) Protection d'un site de restriction de l'enzyme Dra I par la présence d'un nucléosome, et déprotection de celui-ci en présence de RSC et d'ATP. Migration sur gel du fragment d'ADN *5S RNA* de 167 pb seul (colonne 1), puis en présence de Dra I (colonne 2); migration du même fragment d'ADN sur lequel est positionné un nucléosome en présence de Dra I (colonne 3), en présence de Dra I, de RSC mais sans ATP (colonne 4), en présence de Dra I, d'ATP et d'une concentration croissante en RSC (colonnes 5 à 8). Le site initialement protégé par le nucléosome (colonne 3) est déprotégé en présence de RSC et d'ATP (colonnes 5-8). D'après (Saha et al. (2002)). (c) *Déplacements cis* : Les nucléosomes sont représentés en projection 2D, avec la position de l'octamère d'histones sur l'ADN représentée par un ovale grisé. Les lignes noires représentent le fragment d'ADN sur lequel est positionné l'octamère. Le remodelage par les complexes *Swi2/Snf2* produit des substrats pour lesquels l'octamère adopte des positions variées le long du fragment d'ADN (produit 1) et un produit majoritaire pour lequel l'octamère vient se placer à l'extrémité du fragment d'ADN et pour lequel 50 pb d'ADN environ se sont détachées de sa surface (produit 2) (Saha et al. (2006)). *Déplacements trans* : les complexes *Swi2/Snf2* permettent, mais de manière peu efficace, l'échange d'un octamère d'histones ou d'un dimère (H2A-H2B).

et al. (2002)), (Wittmeyer et al. (2004)). Notons toutefois que l'activité de Sth1 est réduite par rapport à celle de RSC, ceci suggère que les sous-unités associées au coeur catalytique modulent l'activité de remodelage du complexe entier.

L'état remodelé du mononucléosome est stable pour au moins 30 min après s'être débarrassé de l'ATP et du FaRC (Elgin and Workman (2000)), dans certaines conditions expérimentales mais pas toutes (Imbalzano et al. (1996)). L'état remodelé d'un mononucléosome a été isolé après action de SWI/SNF ou RSC (Lorch et al. (1998)), (Schnitzler et al. (1998)). Cet état conserve tous les histones et l'ADN initial. L'état remodelé est réversible : il revient lentement vers son état normal en l'absence des facteurs de remodelage. Ceci permet d'être sûr que les histones ne se détachent pas car on n'observe pas de déposition d'octamères sur l'ADN libre dans les conditions testées dans ces expériences (Kingston and Narlikar (1999)).

Les complexes Swi2/Snf2 génèrent une variété de produits de remodelage avec une préférence tout de même pour les formes où l'octamère se trouve à l'extrémité du fragment d'ADN avec perte de 4-5 contacts ADN-histones

Les complexes *Swi2/Snf2* génèrent une variété de produits de remodelage pour lesquels l'ADN nucléosomal peut prendre toutes les positions possibles le long de la surface de l'octamère d'histones (Figure 3.11(c), produit 1) (Whitehouse et al. (1999)). Cependant, un produit prépondérant existe (Figure 3.11(c), produit 2) : il s'agit de la forme pour laquelle l'octamère d'histones se positionne au bout du fragment d'ADN avec 50 bp d'ADN qui sont décrochées de la surface de l'octamère (rupture de 4-5 contacts histones-ADN) (Flaus and Owen-Hughes (2003)), (Kassabov et al. (2003)), (Bruno et al. (2003)).

Les complexes Swi2/Snf2 catalysent l'échange de dimères (H2A-H2B)

Pour le produit 2 présenté sur la figure 3.11 (c), les 50 pb d'ADN qui se sont détachées de la surface de l'octamère correspondent en fait à celles qui assuraient la majorité des contacts entre l'ADN et l'un des dimères (H2A-H2B) le retenant ainsi fermement ancré dans le nucléosome. Cette rupture de contact laisse envisager le départ possible d'un dimère (H2A-H2B) dans cette forme remodelée. Bruno et al. ont montré que ceci peut effectivement avoir lieu dans certaines conditions : RSC peut catalyser l'échange de dimères (H2A-H2B) sur des fragments courts d'ADN (Bruno et al. (2003)). RSC peut également catalyser l'échange entre un plasmide de chromatine et un réseau de nucléosomes, cela suggère que l'échange de dimères (H2A-H2B) peut aussi avoir lieu en l'absence d'extrémités à l'ADN et être donc une activité de remodelage plus générale des complexes de type *Swi2/Snf2*.

Les complexes Swi2/Snf2 catalysent le transfert d'octamères d'histones

Les facteurs de type *Swi2/Snf2* peuvent provoquer, dans certaines conditions, l'éjection d'un octamère d'histones d'un fragment d'ADN ou son transfert à un fragment d'ADN compétiteur (Elgin and Workman (2000)), (Lorch and Kornberg (2004)), (Lorch et al. (2001)), (Owen-Hughes and Workman (1996)). Cependant, tous les nucléosomes ne semblent pas être de bons substrats pour le transfert, son efficacité dépend sans doute fortement de la séquence de l'ADN de la particule de coeur (Lorch et al. (1999)). Remarquons également que le transfert d'octamères n'est pas très efficace par rapport à un déplacement *cis*, moins de 5 % des nucléosomes sont en effet transférés (Elgin and Workman (2000)). Soit l'expérience réalisée *in vitro* n'a pas permis de rassembler les conditions garantissant une optimisation de cet effet, soit il ne s'agit pas de l'activité majeure de ces facteurs.

3.6.1.3 Remodelage du mononucléosome par les complexes ISWI

Les complexes ISWI modifient le profil de digestion par la DNase I mais moins nettement que les complexes Swi2/Snf2

Le test à la DNase I a été réalisé avec NURF, membre de la famille Iswi (voir Figure 3.12 (a)) : lorsque l'on met 1 complexe NURF pour 18 nucléosomes, le profil de digestion par la DNase I (colonne 1c) obtenu reste plus proche de celui de l'ADN nucléosomal (colonne 1b) que de celui plus uniforme obtenu avec l'ADN nu (colonne 1a) (Tsukiyama and Wu (1995)). Si on se place dans des conditions stoechiométriques (pour pouvoir comparer ces résultats avec ceux obtenus avec RSC ou SWI/SNF), le profil de digestion par la DNase I, après action de NURF, change très peu par rapport au cas précédent. On observe donc une perturbation du profil de digestion d'un substrat nucléosomal avec ou sans NURF, NURF agit donc sur

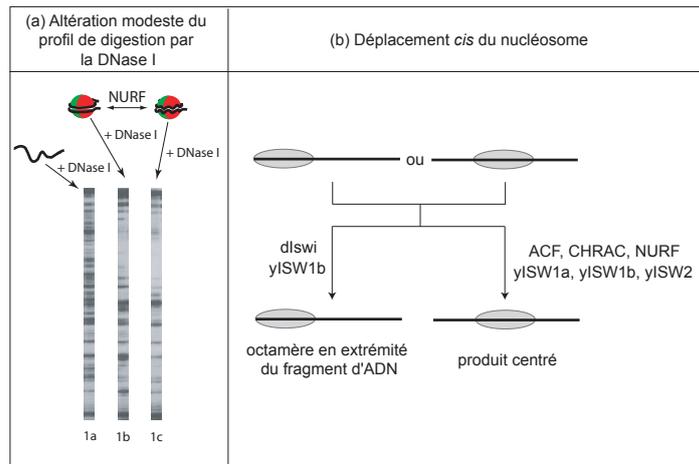


FIGURE 3.12 – (a) Migration sur gel du produit de digestion par la DNase I : d’un fragment d’ADN de 155 pb nu (colonne 1a), du même fragment d’ADN sur lequel est positionné un nucléosome (colonne 1b), du même mononucléosome après remodelage par NURF en présence d’ATP (colonne 1c). Extrait de (Tsukiyama and Wu (1995)). (b) Glissement directionnel d’un mononucléosome par différents complexes de type ISWI.

la structure interne du nucléosome ; cependant celle-ci est nettement moins marquée dans le cas de NURF que dans le cas de RSC ou SWI/SNF.

Les profils différents obtenus entre les complexes de la famille Swi2/Snf2 et Iswi laissent supposer qu’il y a des différences notoires dans l’état physique du nucléosome après remodelage par ces différents facteurs (Cairns et al. (1996)). Il est à noter que les deux expériences présentées ci-dessus n’ont pas été réalisées avec le même fragment d’ADN, ceci peut aussi expliquer un certain nombre d’écarts.

Glissement du nucléosome catalysé par les complexes ISWI

Il a été montré que les facteurs de remodelage du type ISWI étaient capables de faire glisser le nucléosome le long du fragment d’ADN. Cependant, la directionnalité de ce mouvement est différente d’un complexe à l’autre (Vary et al. (2003)).

La directionnalité du déplacement du nucléosome par rapport à l’ADN dépend des sous-unités associées à la sous-unité ATPase de la famille Iswi (voir Figure 3.12(b)). En effet, les complexes ACF, CHRAC et NURF de la *Drosophile* partagent la même sous-unité catalytique notée dIswi. Or, il a été montré que dIswi avait tendance à déplacer le nucléosome d’une position centrale vers une extrémité de l’ADN (déplacement *center-to-end*), alors que les complexes ACF, NURF et CHRAC procédaient à l’inverse (déplacement *end-to-center*) (Gangaraju and Bartholomew (2007)), (Langst et al. (1999)).

Dans le cas des complexes ISWI de la levure, yISW1b peut faire glisser les nucléosomes soit lors d’un déplacement *end-to-center*, soit *center-to-end* (Gangaraju and Bartholomew (2007)), alors que yISW1a et yISW2 déplacent préférentiellement le nucléosome vers le centre du fragment. La très grande affinité de la sous-unité Itc1 de yISW2 pour l’ADN extranucléosomal pourrait être responsable de la directionnalité du complexe entier (Gangaraju and Bartholomew (2007)). Notons également que yISW1a et yISW2 ne sont pas

capables de déplacer des nucléosomes situés à moins de 15 paires de bases d'une extrémité du fragment d'ADN alors que ISW1b le peut. Plus l'ADN linker est court et plus le remodelage est difficile dans le cas de γ ISW1a et γ ISW2.

Ces tests sont faits sur de très courts fragments où les facteurs de remodelage rencontrent très vite une extrémité de l'ADN, ils ne prétendent pas mimer l'activité de remodelage d'un nucléosome *in vivo* mais ils montrent que les substrats obtenus après remodelage dépendent des complexes agissant sur le nucléosome (et donc des sous-unités associées au coeur catalytique). Cela laisse présager qu'il puisse y avoir différents mécanismes ayant une finalité commune : altérer la structure de la chromatine. Ces tests nous guideront pour proposer des modèles cohérents avec les observations expérimentales de remodelage (Saha et al. (2006)).

dIswi repositionne le nucléosome de façon à atteindre le produit thermodynamiquement stable

Il a été montré qu'un nucléosome reconstitué sur un court fragment d'ADN peut se déplacer spontanément le long de l'ADN lorsqu'on élève la température du milieu, les positions d'équilibre favorisées thermodynamiquement correspondent à celles où le nucléosome se positionne près de l'extrémité du fragment d'ADN (Flaus and Owen-Hughes (2003)). Flaus et al. ont montré que dIswi relocalisait le mononucléosome vers ces positions d'équilibre thermodynamique. dIswi ne ferait qu'accélérer ce processus. Ce n'est pas le cas de RSC ou SWI/SNF qui relocalisent le nucléosome au delà de cette position d'équilibre (perdant ainsi le contact avec 50 bp d'ADN).

Les déplacements trans par les complexes ISWI sont rares

L'éjection d'un octamère d'histones de son substrat ADN par des complexes ISWI n'a pas été observée.

La sous-unité catalytique dIswi ne montre quasiment pas d'activité d'échange de dimères (Bruno et al. (2003)). γ ISW1b peut transférer des dimères (H2A-H2B) mais cette activité n'est pas du tout efficace. γ ISW1a ne peut pas catalyser cet échange. Ceci est cohérent avec le fait que γ ISW1b peut déplacer les nucléosomes vers les extrémités du fragment d'ADN (dans cette configuration, des contacts ADN-histones sont sans doute plus facilement rompus au niveau du dimère (H2A-H2B), ce qui facilite son départ éventuel).

3.6.2 Remodelage d'une fibre de chromatine

Le remodelage de la chromatine peut aussi se révéler au niveau d'un chapelet de nucléosomes. Les facteurs de remodelage peuvent alors être impliqués dans divers processus schématisés sur la figure 3.13 : il peut s'agir de l'assemblage d'octamères sur un fragment d'ADN, du glissement d'octamères le long de cette molécule d'ADN ou de la régularisation de l'espacement entre nucléosomes (ou son contraire).

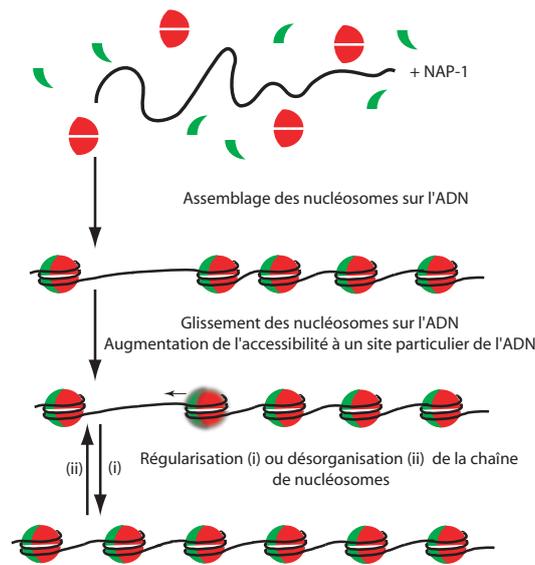


FIGURE 3.13 – Les facteurs de remodelage de la chromatine peuvent participer à divers processus impliquant un chapelet de nucléosomes à savoir son assemblage, le glissement d’octamères le long de l’ADN ou la régularisation (i) ou la désorganisation (ii) du chapelet de nucléosomes. D’après (Langst and Becker (2001)).

3.6.2.1 Assemblage de la chromatine en présence de NAP-1 : dépôt d’octamères sur un fragment d’ADN

Le facteur de remodelage ACF (*ATP-Utilizing Chromatin Factor*) peut déposer de manière processive des octamères d’histones le long de l’ADN pour former de longues répétitions périodiques de nucléosomes. L’activité d’assemblage de la chromatine par ACF nécessite l’intervention du chaperon d’histones NAP-1 (Kingston and Narlikar (1999)). Une seconde protéine intervient dans ce processus d’assemblage : la protéine HMGB1 (protéine autre que les histones et participant à la structure nucléoprotéique de la chromatine). Celle-ci régule l’activité de ACF en agissant comme un chaperon d’ADN, limitant la distorsion de l’ADN et gênant donc son enroulement autour des octamères (Gangaraju and Bartholomew (2007)).

3.6.2.2 Glissement des nucléosomes sur l’ADN

La capacité qu’ont les facteurs de remodelage de la chromatine (FaRC) à faire glisser les nucléosomes le long de l’ADN a déjà été décrite pour le remodelage d’un nucléosome. Des expériences similaires ont été réalisées sur des réseaux de nucléosomes : un substrat d’ADN, sur lequel étaient positionnés des nucléosomes en des positions bien précises, était soumis à l’action d’un FaRC. Il a ainsi été montré que NURF (Hamiche et al. (1999)), CHRAC et dIswi (Langst et al. (1999)), SWI/SNF (Whitehouse et al. (1999)), RSC (Lorch et al. (2001)), dCHD1 et son homologue isolé chez la levure (Lusser et al. (2005)), (Tran et al. (2000)) induisent le glissement de nucléosomes le long de l’ADN et ce, de manière ATP-dépendante.

3.6.2.3 Régularisation/Désorganisation d'un chapelet de nucléosomes

On parle de régularisation d'un chapelet de nucléosomes lorsque, partant d'une fibre sur laquelle les nucléosomes sont positionnés de manière quelconque les uns par rapport aux autres, on aboutit à une fibre pour laquelle les longueurs des fragments d'ADN liant les nucléosomes les uns aux autres sont de taille similaire.

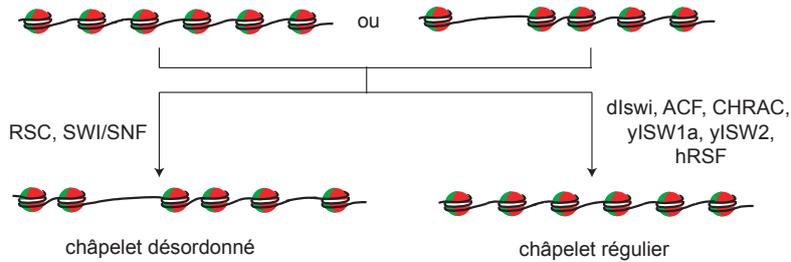


FIGURE 3.14 – Régularisation ou, au contraire, désorganisation d'un chapelet de nucléosomes en présence de différents facteurs de remodelage de la chromatine.

Régularisation d'un chapelet de nucléosomes en présence de NAP-1. Seuls certains complexes de la famille Iswi se sont révélés être capables de régulariser un chapelet de nucléosomes (voir Figure 3.14) : les complexes ACF et CHRAC de la Drosophile et de l'Homme, le complexe RSF (Ito et al. (1997)), (LeRoy et al. (1998)), (LeRoy et al. (2000)), (Poot et al. (2000)), la sous-unité ATPase seule dIswi (Kingston and Narlikar (1999)), (Corona et al. (1999)) et les complexes yISW1a (Vary et al. (2003)) et yISW2 (Tsukiyama et al. (1999)) de la levure sont capables de régulariser une fibre de chromatine. yISW2 a une activité de régularisation qui est toutefois moins forte que yISW1a (Gangaraju and Bartholomew (2007)). On ne connaît pas le mécanisme de régularisation de ces fibres. On peut noter que les complexes ISWI qui présentent cette capacité à la régularisation de fibres de chromatine sont aussi ceux qui ont une directionnalité claire dans le déplacement *cis* de nucléosomes : en effet, yISW1b ne provoque pas un déplacement *cis* d'un nucléosome avec une directionnalité claire et n'a pas d'activité de régularisation d'une fibre, à l'inverse yISW1a et yISW2 ont une direction privilégiée lors d'un déplacement *cis* et régularisent les fibres de chromatine (Vary et al. (2003)).

L'espacement imposé entre les nucléosomes dépend du facteur de remodelage considéré : yISW2 espace les nucléosomes tous les 200 pb environ (ADN de liaison de 67 pb), yISW1a les espace tous les 175 pb environ (ADN extranucléosomal de 30 pb). Cet espacement pourrait dépendre de la façon dont le complexe interagit et se fixe à son substrat : pour yISW2, il a été montré que sa sous-unité Itc1 avait une très forte affinité avec l'ADN extranucléosomal, ceci pourrait participer à l'activité de régularisation de l'espacement entre nucléosomes. Le complexe yISW1a interagit plus particulièrement avec l'ADN en entrée et en sortie du nucléosome ce qui pourrait expliquer un espacement différent du cas précédent (Gangaraju and Bartholomew (2007)).

Dans tous les cas, ces réactions de régularisation nécessitent la présence, en plus du facteur de remodelage, de protéines comme NAP-1 qui jouent sans doute un rôle d'accepteurs d'histones (Kingston and Narlikar (1999)).

Désorganisation d'un chapelet de nucléosomes. Contrairement à l'action de nombreux complexes ISWI, les facteurs de remodelage de type SWI/SNF désorganisent un chapelet de nucléosomes au préalable régulier (Flaus and Owen-Hughes (2003)) (voir Figure 3.14).

Le glissement des nucléosomes sur l'ADN est une propriété commune aux facteurs de remodelage de type Swi2/Snf2 et Iswi, mais différents produits de remodelage en découlent. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer les diverses constatations expérimentales obtenues (notamment l'augmentation de l'accessibilité de l'ADN en surface du mononucléosome ou le déplacement *cis* du nucléosome), ils s'appuient tous sur une caractéristique commune aux facteurs de remodelage de la chromatine, à savoir leur capacité à se déplacer le long de l'ADN.

3.6.3 Les facteurs de remodelage sont des translocases

On avait déjà évoqué le fait que la sous-unité ATPase des facteurs de remodelage est très similaire à celle des hélicases conventionnelles. Les hélicases combinent deux activités : l'une est la capacité de se déplacer le long d'une molécule d'ADN (activité de *translocation*), l'autre activité consiste en la séparation active des deux brins de l'ADN au cours de ce déplacement (voir Figure 3.15(a)). Les FaRC n'ont pas la possibilité de séparer les deux brins de l'ADN (Côté et al. (1994)). Qu'en est-il de leur potentielle activité de translocation ?

3.6.3.1 Stimulation de l'activité ATPase des FaRC en fonction du substrat

L'activité ATPase de RSC, de sa sous-unité catalytique seule Sth1, et de SWI/SNF est aussi bien stimulée par l'ADN simple brin que le double brin (une taille minimale d'ADN est cependant requise pour stimuler l'activité de ces complexes (25 pb pour RSC), il s'agit sans doute de la taille minimale nécessaire pour que le complexe se fixe sur son substrat, voir figure 3.15(b)) (Saha et al. (2002)). L'activité ATPase de RSC est supérieure à celle de Sth1 suggérant un rôle de régulation des sous-unités associées. On n'observe pas de préférence significative de RSC ou de SWI/SNF pour l'ADN nucléosomal (Cairns et al. (1996)), (Lorch and Kornberg (2004)).

En ce qui concerne les complexes ISWI :

- la sous-unité dIswi peut se fixer sur l'ADN nu en l'absence d'ATP (Whitehouse et al. (2003)).
- l'activité ATPase de la sous-unité dIswi est faiblement stimulée par l'ADN simple ou double brin (Whitehouse et al. (2003)). Elle est par contre stimulée fortement par les nucléosomes (avec une préférence pour ceux qui ont des ADN de liaison) mais pas par les histones seules en solution, indiquant que la sous-unité dIswi doit reconnaître un trait structural particulier aux nucléosomes (Corona et al. (1999)).
- l'activité ATPase de γ ISW1a et γ ISW1b est stimulée par les nucléosomes, on n'observe pas d'activité ATPase de la sous-unité Isw1 seule (Vary et al. (2003)).
- l'activité ATPase de CHRAC est stimulée à la fois par l'ADN libre et par les nucléosomes, alors que celle de NURF est spécifiquement stimulée par les nucléosomes. En effet, NURF interagit avec la queue N-terminale de l'histone H4 et cette interaction est essentielle pour stimuler son activité ATPase (Hamiche et al. (1999)), (Bouazoune and Brehm (2006)), (Gangaraju and Bartholomew (2007)).

Pour résumer, l'activité ATPase des complexes Swi2/Snf2 est stimulée aussi bien par l'ADN nu que par les nucléosomes, celle de plusieurs complexes ISWI n'est stimulée qu'en présence de nucléosomes. Cela suggère que les différentes familles pourraient interagir avec des portions différentes de la chromatine afin de perturber sa structure, cette activité étant sans doute étroitement liée à leur capacité à se transloquer le long de l'ADN.

3.6.3.2 Expériences en faveur de la translocation des FaRC

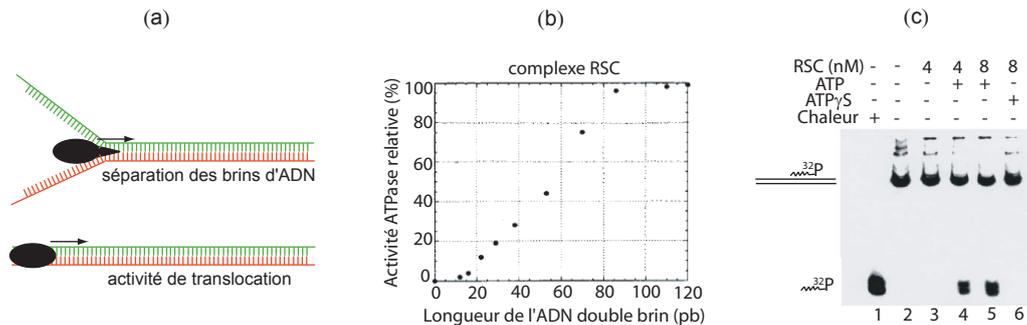


FIGURE 3.15 – (a) Illustration des activités de *translocation* et de *séparation des brins d'ADN*, (b) Activité ATPase relative du complexe RSC en fonction de la taille (en pb) de son substrat d'ADN double brin, en présence de 1 mM ATP (Lorch and Kornberg (2004)), (c) Déplacement d'une triple hélice : lorsque l'on chauffe le substrat d'ADN double brin sur lequel se trouve une région triple hélice, le troisième brin marqué par ^{32}P se détache du double brin (colonne 1). Si on place ce substrat en l'absence de RSC (colonne 2) ou en présence de RSC mais sans ATP (colonne 3), le substrat triple hélice reste intact. L'ajout de RSC en présence d'ATP (colonnes 4 et 5) déplace la triple hélice. La forme non-hydrolysable de l'ATP, l'ATP- γ -S, ne suffit pas pour que RSC puisse déplacer la triple hélice (colonne 6), il s'agit donc d'un processus actif nécessitant l'hydrolyse de l'ATP (Lorch and Kornberg (2004)).

Saha et al ont réalisé diverses expériences pour prouver l'activité de translocation de RSC et de sa sous-unité ATPase Sth1 (Saha et al. (2002)) :

1. Ils mettent RSC (ou Sth1) en présence d'un substrat ADN de taille donnée et d'ATP ; ils mesurent l'activité ATPase du complexe. Ils montrent que cette activité ATPase est proportionnelle à la longueur du substrat ADN, à condition que sa longueur soit comprise entre 25 et 80 pb (voir figure 3.15(b)). Les 25 pb correspondent à la taille minimale d'ADN requise pour que RSC se fixe sur son substrat, au delà de 80 pb, l'activité ATPase plafonne à sa valeur maximale : cette taille caractérise la processivité de l'enzyme, c'est-à-dire la distance que RSC peut parcourir le long de l'ADN avant de se dissocier de celui-ci. Ces résultats sont valables, que le substrat d'ADN soit simple ou double brin.

2. Ils préparent un substrat d'ADN sur lequel se trouve une petite région d'ADN en triple hélice stable. Si RSC peut se transloquer le long de l'ADN, il rencontrera cet obstacle et pourra éventuellement le déstabiliser. C'est effectivement ce que les auteurs ont montré, renforçant ainsi l'idée que RSC se transloque le long de l'ADN (voir Figure 3.15 (c)).

L'activité ATPase observée sur l'ADN simple brin suggère que la translocation de RSC se fait en sui-

vant le cheminement de l'un des deux brins de l'ADN (Saha et al. (2002)).

Le même type de résultat a été obtenu avec la sous-unité catalytique dIswi mais sur un substrat nucléosomal cette fois, comme le montre le paragraphe suivant (Whitehouse et al. (2003)).

3.6.3.3 La translocation serait polarisée et se ferait le long d'un des deux brins de la molécule d'ADN

Une expérience supplémentaire a été réalisée avec dIswi pour préciser le processus de translocation. Whitehouse et al. utilisent un substrat particulier : il s'agit d'un fragment d'ADN sur lequel se trouve à la fois un nucléosome et une région en triple hélice. Entre ces deux éléments est laissée une longueur d'ADN variable. Cette portion d'ADN intermédiaire peut également présenter un *nick* (interruption, sur l'un des brins, du squelette sucro-phosphate) ou un *gap* de 5 ou 10 bases (absence sur un brin de 5 ou 10 bases consécutives). En l'absence de *nick* ou de *gap*, l'ajout de dIswi en présence d'ATP induit le départ de la triple hélice. La triple hélice est d'autant mieux déplacée qu'elle ne se trouve pas trop loin du nucléosome (au delà de 50 pb d'écart entre le nucléosome et la triple hélice, on n'observe plus de déplacement de l'hélice). La présence d'un *nick* sur l'un des deux brins ne modifie pas les résultats précédents. Par contre, un *gap* de 5 ou 10 bp entre la triple hélice et le nucléosome sur le brin 3'-5' empêche le départ de la triple hélice alors que les mêmes *gaps* sur le brin 5'-3' permettent le déplacement de la triple hélice (Whitehouse et al. (2003)). Cela suggère que dIswi fonctionnerait comme une translocase, positionnée au niveau du nucléosome et qui "pomperait" l'ADN en direction du nucléosome en suivant le brin 3'-5' (Whitehouse et al. (2003)).

Cette expérience est en faveur d'une translocation orientée qui se ferait principalement sur un brin (dans la direction 3'-5'). Ceci n'est pas très surprenant si on considère à nouveau les facteurs de remodelage de la chromatine dans le contexte de la super-famille SF2 des hélicases. Les hélicases peuvent en effet être séparées en deux groupes selon que leur activité se fait avec une polarité 3'-5' ou 5'-3'. Or, beaucoup de membres de la super-famille SF2 montrent une spécificité 3'-5', ce qui est cohérent avec les constatations faites sur dIswi. Remarquons cependant que si l'activité de translocation des facteurs de remodelage se fait effectivement en suivant un brin d'ADN s'enroulant en double hélice, il est probable que les facteurs de remodelage puissent générer de la contrainte torsionnelle au sein du substrat ADN. Des expériences montrent effectivement que l'activité de remodelage des FaRC induit des changements conformationnels dans l'ADN ou le substrat nucléosomal.

3.6.4 Changements conformationnels lors de l'activité de remodelage

3.6.4.1 Test d'extrusion d'une structure cruciforme

L'équipe de T. Owen-Hughes a mis au point un test permettant de mesurer l'introduction, par les facteurs de remodelage de la chromatine, de surenroulement négatif dans un fragment d'ADN linéaire. Le principe du test est le suivant : on prépare un fragment d'ADN linéaire contenant en son centre une séquence répétée inversée (par exemple $[AT]_n$). En l'absence de contrainte torsionnelle, l'ADN reste sous la forme classique d'une double hélice d'ADN. Si on introduit maintenant de la torsion négative dans le fragment d'ADN, on voit apparaître une forme en croix (extrusion d'une structure *cruciforme*) qui permet de relaxer le surenroulement négatif dans le reste de la molécule. On utilise une endonucléase (*Endo VII*) pour tester la présence de cette forme cruciforme : en effet, cette enzyme coupe les deux brins d'ADN des deux formes extrudées au niveau de la base de la structure cruciforme, on peut alors tester cette digestion sur gel (voir Figure 3.16 (a)).

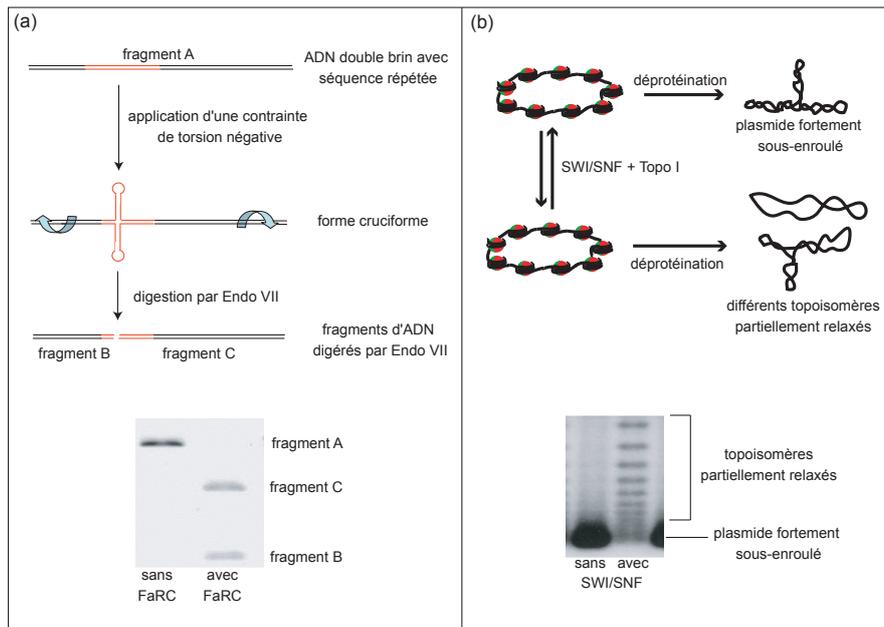


FIGURE 3.16 – (a) Illustration du principe du test d'extrusion d'une structure cruciforme. (b) Altération de la topologie d'un chapelet de nucléosomes par le complexe SWI/SNF.

L'équipe de T. Owen-Hughes a ainsi montré que de nombreux facteurs de remodelage comme γ SWI/SNF, la sous-unité dIswi, le complexe Mi-2 de *Xenopus*, la sous-unité Brg1 sont capables de contraindre en torsion un substrat d'ADN ou de chromatine (Havas et al. (2000))^e.

3.6.4.2 Altération de la topologie d'un chapelet circulaire de nucléosomes

L'équipe de Kingston a utilisé un réseau circulaire de nucléosomes qui, lorsqu'il est déprotéiné fournit un ADN circulaire très sous-enroulé (un tour négatif est associé au départ de chacun des nucléosomes). Lorsque l'on soumet ce substrat à l'action conjointe de SWI/SNF et de la Topoisomérase I (enzyme qui enlève préférentiellement les supertours négatifs d'un substrat ADN circulaire), on observe, après déprotéination du réseau de nucléosomes, une diminution nette du sous-enroulement de l'ADN circulaire (voir figure 3.16 (b)). Ceci indique que la présence de SWI/SNF permet d'obtenir des régions où l'ADN est sous-enroulé et accessible à l'action de la Topo I, cette dernière relaxe ces zones sous-enroulées accessibles. Après déprotéination, le sous-enroulement global est donc moindre. SWI/SNF est donc capable de causer des changements topologiques significatifs (Imbalzano et al. (1994)), (Elgin and Workman (2000)), (Jaskelioff et al. (2000)).

3.7 Mécanismes proposés pour l'action de ces facteurs

Plusieurs modèles mécanistiques ont été proposés pour interpréter les observations biochimiques décrites précédemment comme la capacité qu'ont les facteurs de remodelage à déplacer les nucléosomes ou à modifier leur structure interne. Les deux modèles les plus classiques proposent que l'activité de translocation mise

e. γ SWI/SNF et RSC sont capables de générer de la torsion à la fois sur un substrat ADN ou un substrat nucléosomal, dIswi et Mi-2 ne sont capables de contraindre en torsion que des substrats nucléosomaux.

en évidence pour de nombreux FaRC soit à la base de l'activité de remodelage : il s'agit du modèle de bulle (*Bulging model*) et du modèle de torsion (*Twisting model*) (Flaus and Owen-Hughes (2001)), (Langst and Becker (2001)) (voir figure 3.17).

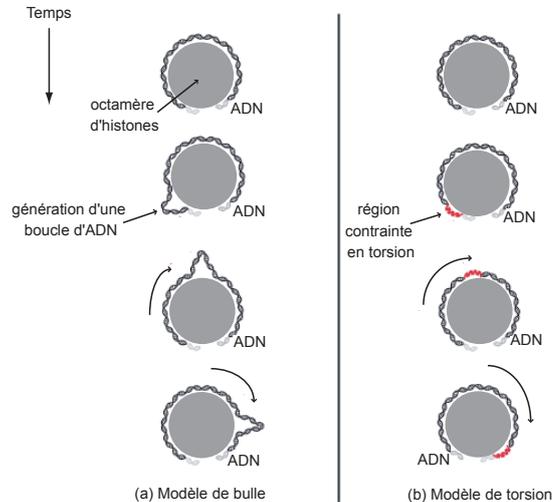


FIGURE 3.17 – (a) *Bulging model* : Modèle dans lequel une bulle d'ADN est créée à l'entrée du nucléosome, sous l'action d'un facteur de remodelage et/ou de fluctuations thermiques, puis se propage pour ressortir de l'autre côté du nucléosome. b) *Twisting model* : Modèle de torsion dans lequel le défaut est une déformation angulaire (*twist*) qui peut être propagée activement ou thermiquement. D'après (Montel (2008)).

3.7.1 Diffusion d'une boucle d'ADN à la surface de l'octamère ou *Bulging model*

Ce modèle propose qu'un facteur de remodelage puisse se positionner au niveau d'un nucléosome (en interagissant par exemple avec l'un des histones) et interagir avec l'ADN à l'entrée ou à la sortie du nucléosome. Il pourrait alors se servir de son activité de translocation pour "pomper" un peu d'ADN à la surface de l'octamère, détruisant ainsi quelques contacts ADN-histones. Les fluctuations thermiques permettraient ensuite dans certains cas de recréer les contacts détruits mais de manière imparfaite en créant une boucle d'ADN ou une bulle. Ceci aurait pour conséquence de créer un nucléosome possédant un défaut à l'entrée. Celui-ci serait alors susceptible de diffuser rapidement puisque lorsque le défaut se déplace, il crée autant de contacts qu'il en détruit. La bulle se propagerait ainsi tout autour de la surface de l'octamère modifiant ainsi la position de l'ADN par rapport à l'octamère d'histones et permettant donc le glissement de celui-ci le long de l'ADN. Il est souvent proposé que le moteur ait une action de type "pince à sucre" comme le décrit le schéma de la figure 3.18 (Saha et al. (2006)).

3.7.2 Diffusion de torsion à la surface de l'octamère ou *Twisting model*

Il a été montré que plusieurs facteurs de remodelage étaient capables de modifier la topologie de l'ADN et de modifier ainsi les interactions entre l'ADN et les histones (Havas et al. (2000)). Ce modèle propose qu'un facteur de remodelage puisse se positionner au niveau d'un nucléosome et appliquer un couple sur l'ADN entrant ou sortant du nucléosome (par translocation le long d'un des brins de celui-ci par exemple). L'application de ce couple induirait une altération locale du degré d'enroulement de l'ADN rompant ainsi

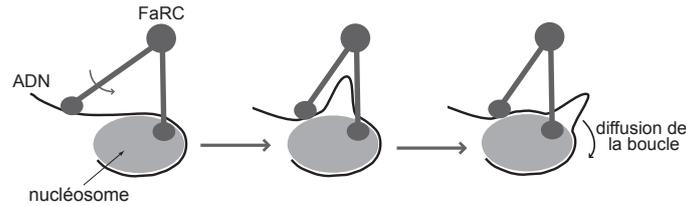


FIGURE 3.18 – Dans le cas de dIswi, il a été proposé que le facteur de remodelage soit capable de former à l'entrée du nucléosome une boucle à la manière d'une "pince à sucre". Cette boucle serait ensuite propagée par diffusion le long de la surface de l'octamère. D'après (Langst and Becker (2001)).

quelques contacts entre celui-ci et la surface de l'octamère. Cette petite région d'ADN altérée pourrait ensuite diffuser spontanément autour de la surface de l'octamère, modifiant ainsi le positionnement global de l'octamère par rapport à l'ADN.

Ces deux modèles ne sont pas exclusifs l'un de l'autre, la situation réelle pourrait tout à fait correspondre à une situation intermédiaire entre ces deux propositions. En effet, pour RSC ou SWI/SNF (ou Mi-2) par exemple, il a été montré que l'induction d'un défaut de torsion est, en partie seulement, nécessaire à la translocation de l'ADN à l'intérieur du nucléosome (Saha et al. (2002)), (Aoyagi et al. (2002)), (Aoyagi et al. (2003)). L'existence d'un pas caractéristique pour ce déplacement et la manière dont la contrainte mécanique du moteur est propagée reste aujourd'hui encore sujet à caution. En particulier, différentes valeurs pour ce pas élémentaire ont été mesurées, allant de 1 à 50 pb pour des moteurs très proches (Saha et al. (2005)), (Zofall et al. (2006)). Cette discordance est probablement liée au caractère indirect des mesures effectuées. Enfin, il existe très probablement des différences mécanistiques entre les quatre familles de facteurs de remodelage classiques (Becker and Horz (2002)).

3.8 Atouts et limites de ces approches biochimiques

Les approches biochimiques présentées jusqu'à présent ont permis de réelles avancées concernant la compréhension du mécanisme de remodelage de la chromatine par les FaRC : après avoir identifié les différents complexes responsables de ce remodelage, elles ont pu préciser la structure de certains produits remodelés et permettre l'élaboration de modèles mécanistiques simples en accord avec ces observations. Néanmoins, ce type d'approche a ses limites.

3.8.1 Limites des approches biochimiques

Considérons une expérience typique de biochimie. Elle met en jeu un tube à essai qui contient un volume de 100 μl d'une solution de protéines à la concentration de 100 nM. Un rapide calcul montre que notre tube à essai contient $\sim 10^{12}$ protéines. Dès lors, toute mesure sur le contenu de ce tube ne peut donner accès qu'à la moyenne d'ensemble des propriétés de cette population de molécules. Cette mesure, dite d'ensemble, va gommer deux types de désordre, appelés désordre *statique* et désordre *dynamique* (Lionnet (2006)).

Le désordre *statique* rend compte de l'hétérogénéité d'une population de molécules. En effet, toutes les protéines d'un tube à essai, même ayant rigoureusement la même composition ((ie) la même séquence en acides aminés) peuvent avoir des propriétés différentes. On peut imaginer que ces protéines puissent exister sous deux états différents (par exemple dans des conformations correspondant à des repliements différents), chaque état possédant des propriétés biochimiques particulières. Si on tente de mesurer l'une

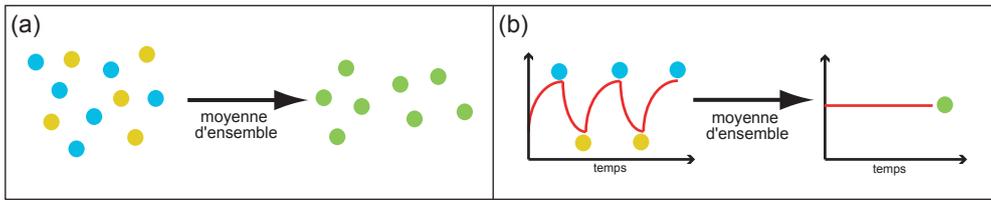


FIGURE 3.19 – (a) Moyenne d'ensemble du désordre statique : une expérience en tube à essai, donc sur une grande population de molécules ne mesure que la moyenne d'une propriété, et non sa distribution. Ici deux populations coexistent, chacune ayant des propriétés biochimiques particulières (symbolisées par des couleurs différentes). Le résultat, moyenne des deux populations, n'offre pas une description correcte des propriétés au niveau microscopique. (b) Moyenne d'ensemble du désordre dynamique : une molécule peut occuper deux états distincts au cours du temps, par exemple deux conformations différentes. Chaque état est caractérisé par des propriétés biochimiques spécifiques (symbolisées par des couleurs différentes). Le résultat de la mesure de la grandeur d'intérêt sur une population désynchronisée est la moyenne de la propriété sur les deux états, mais encore une fois, cela ne reflète ni les propriétés distinctes de chaque état, ni la dynamique du changement d'état.

de ces propriétés en tube à essai, le résultat obtenu est égal à la moyenne de cette propriété biochimique sur les deux états de la protéine, et risque fort de ne représenter aucune des propriétés existant réellement (voir Figure 3.19(a)). En particulier, la présence de protéines inactives dans un échantillon - indétectables des autres lors de la mesure de la concentration de la solution - conduit inéluctablement à sous-estimer l'activité d'une protéine.

Le désordre *dynamique* rend compte, quant à lui, de la variabilité dans le temps des propriétés d'une molécule donnée de notre population. Par exemple, la vitesse de catalyse d'une enzyme peut varier au cours du temps. Or, dans un tube à essai, toutes les molécules sont désynchronisées les unes par rapport aux autres, et on ne peut espérer mesurer que la moyenne de cette variabilité (voir Figure 3.19(b)).

3.8.2 Observation ou manipulation d'une molécule à la fois

De nouvelles techniques, permettant de sonder une molécule à la fois, se sont largement développées au cours des dernières décennies. En plus de s'affranchir des effets pervers des moyennes d'ensemble, les techniques de visualisation et de manipulation de molécules uniques apportent souvent une information plus fine que celle tirée des observables de la biochimie traditionnelle. Prenons l'exemple des hélicases, les expériences d'ensemble ne donne accès qu'à une mesure "tout ou rien" : soit le substrat d'ADN double brin est intact, soit les deux simples brins sont complètement séparés l'un de l'autre. Différentes techniques de molécules uniques permettent de suivre en temps réel l'activité d'ouverture d'un substrat ADN par une hélicase, et donc d'avoir accès à la multitude d'intermédiaires réactionnels correspondant (Lionnet et al. (2007)).

Dans le cas des facteurs de remodelage de la chromatine, il peut être très intéressant d'avoir recours à de telles techniques. Les FaRC agissent comme des moteurs moléculaires, capables de se déplacer le long de l'ADN et d'altérer la structure des nucléosomes par un mécanisme ATP-dépendant. Le recours à des techniques de molécules uniques permettrait de suivre en temps réel ces divers processus, d'en extraire des caractéristiques discrètes (vitesse de translocation, processivité, nature de l'altération du nucléosome :

génération de torsion ? bulle d'ADN ? autre mécanisme ?...) et de préciser les mécanismes par lesquels le remodelage de la chromatine a lieu. C'est ce que nous avons souhaité faire au cours de cette thèse, en utilisant un dispositif de pinces magnétiques pour étudier l'activité de divers facteurs de remodelage de la chromatine. Avant de présenter plus particulièrement ce travail, il nous paraît nécessaire de présenter d'abord, les différentes techniques de molécules uniques mises au point, de présenter ensuite plus particulièrement celle dont on se servira au cours de ce travail, à savoir les pinces magnétiques, et enfin, de montrer ce que ces différentes techniques ont apporté concernant la structure de la chromatine ou l'activité des facteurs de remodelage de la chromatine. Ces trois aspects sont l'objet de la seconde partie de cette thèse.

Deuxième partie

A l'échelle de la molécule unique

Chapitre 4

Différents dispositifs pour visualiser et/ou manipuler une molécule à la fois

Sommaire

4.1 Visualisation de molécules uniques	69
4.1.1 Deux exemples de visualisation par fluorescence	69
4.1.2 La microscopie électronique en transmission	71
4.1.3 La microscopie à force atomique ou AFM	72
4.2 Manipulation de molécules uniques	72
4.2.1 Tirer et tordre une molécule	72
4.2.2 Ordres de grandeur des paramètres d'intérêt à l'échelle de la molécule unique	73
4.2.3 Les différents montages permettant la manipulation de molécules uniques	75
4.2.4 Comparaison de ces différentes techniques	77

Depuis une dizaine d'années, les progrès techniques réalisés dans les méthodes de microscopie et l'avènement de méthodes de micromanipulation ont permis d'accomplir un vieux rêve : visualiser et/ou manipuler une molécule à la fois, en temps réel, dans des conditions quasi physiologiques.

4.1 Visualisation de molécules uniques

Les techniques de microscopie optique, appliquées à la biologie par Van Leeuwenhoek et Hooke au XVII^{ème} siècle, ont permis de poser les bases de la théorie cellulaire. Les techniques de microscopie se sont constamment améliorées depuis, mais sont cependant limitées par leur résolution théorique maximale, de l'ordre de 200 nm. Certaines techniques de microscopie actuelle ont permis de repousser cette limite, pour atteindre des résolutions de l'ordre de plusieurs dizaines de nanomètres (Willig et al. (2006)), (Hofmann et al. (2005)). L'observation de molécules uniques en microscopie optique est notamment possible par des techniques de fluorescence, ce n'est alors pas directement la molécule d'intérêt que l'on observe, mais un ou plusieurs marqueurs fluorescents qui viennent la "décorer".

4.1.1 Deux exemples de visualisation par fluorescence

4.1.1.1 Visualisation de molécules d'ADN uniques immobilisées sur une surface

La technique du *peignage moléculaire* a été mise au point il y a un peu plus de 20 ans par D. Bensimon et al. (Bensimon et al. (1994)) et consiste à étirer de manière homogène des molécules d'ADN sur une surface

et à visualiser celles-ci par un montage de microscopie optique classique. Les molécules d'ADN "naturelles" ne sont bien sûr pas visibles directement par cette méthode. Il est nécessaire d'utiliser un marqueur fluorescent spécifique de l'ADN pour les visualiser (le *YOYO1* par exemple) (voir figure 4.1(a)). Cette technique permet, par exemple, de faire de la cartographie génétique : il s'agit de repérer des séquences nucléotidiques particulières sur l'ADN peigné. On utilise pour cela des séquences nucléotidiques qui servent de sondes et qui sont marquées en fluorescence et complémentaires à celles recherchées (méthode de FISH, *fluorescent in situ hybridization*). Leur détection en fluorescence, le long des ADN peignés, permet de localiser leurs positions relatives très précisément grâce à la grande homogénéité de l'extension des molécules peignées (Weier et al. (1995)).

Néanmoins, cette technique souffre de la limite de résolution de la microscopie optique. Pour étudier des interactions protéines-protéines, il faudra faire appel à d'autres techniques. En effet, les protéines ont une taille caractéristique de 0,1 à 1 nm, on ne peut donc pas montrer, par ces techniques de fluorescence classiques, qu'il y a contact entre deux protéines. On peut par contre utiliser d'autres techniques exploitant les propriétés de la fluorescence, comme le FRET.

4.1.1.2 Etude de la dynamique d'un mono-nucléosome par une technique de FRET

La technique de FRET (*Fluorescence (or Förster) Resonance Energy Transfer*) permet de mesurer des mouvements nanométriques par le couplage résonant de deux fluorophores différents attachés en deux points de la molécule d'intérêt. L'un des fluorophores, le donneur, est excité par une source externe et transfère de manière non radiative son énergie au second fluorophore, l'accepteur, dont le spectre d'absorption chevauche le spectre d'émission du donneur. L'efficacité E de ce transfert d'énergie est donnée par :

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

où R est la distance entre le donneur et l'accepteur et R_0 est le rayon de Förster pour lequel 50 % de transfert d'énergie a lieu (ce rayon vaut typiquement 5 nm pour le couple de donneur/accepteur Cy3/Cy5, paire de fluorophores communément utilisée en FRET). Cette technique permet de suivre des déplacements relatifs des deux fluorophores de 1 à 10 nm environ. Elle a été notamment mise à profit pour l'étude de la dynamique de la structure d'un mononucléosome (Koopmans et al. (2007)).

L'équipe de J. Van Noort a observé par FRET la dynamique de l'ADN nucléosomal d'un mononucléosome. Un fluorophore (Cy-5) est positionné sur l'ADN au niveau de l'axe dyadique du nucléosome, l'autre fluorophore (ATTO647N) est placé sur l'ADN à la sortie de la particule de coeur (voir Figure 4.1(b)). Les mononucléosomes sont ensuite immobilisés sur une surface fonctionnalisée et observés en TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*) peut améliorer le rapport signal sur bruit de la mesure. J. Van Noort met en évidence une réduction transitoire du transfert d'énergie entre les deux fluorophores pour 3 % des nucléosomes intacts étudiés (constante de temps de 120 ms). Il attribue cette observation à la "respiration" de l'ADN nucléosomal en sortie de la particule de coeur : quelques contacts ADN-histones pourraient être transitoirement rompus en sortie de la particule de coeur avec un temps caractéristique proche de 0,1 s (Koopmans et al. (2007)).

Le même type d'expériences a été réalisé par l'équipe de J. Widom et aboutit à une conclusion similaire : l'ADN nucléosomal est capable de se détacher de manière transitoire de la surface de l'octamère d'histones : l'ADN reste complètement lié à l'octamère pour 250 ms avant de se détacher de manière spontanée. L'ADN se lie à nouveau à l'octamère en 10 à 50 ms (Li et al. (2005)).

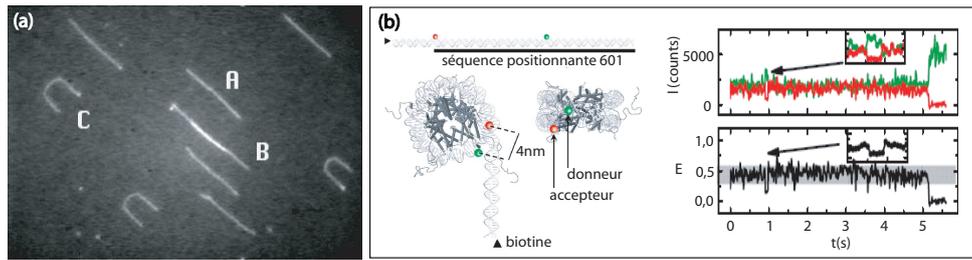


FIGURE 4.1 – (a) Molécules d’ADN de phage λ peignées sur une surface recouverte de polylysine. La molécule A mesure exactement 16,2 microns, la molécule B est en fait composée de deux molécules se superposant partiellement. La molécule C s’est ancrée par les deux extrémités à la surface, ce qui a produit cette forme en boucle (Bensimon et al. (1995)). (b) en haut à gauche, position des deux fluorophores sur l’ADN nucléosomal ; en bas à gauche, position respective des deux fluorophores sur un nucléosome intact ; à droite, traces de l’intensité I et de l’efficacité E du transfert d’énergie. On observe des fluctuations de l’intensité de l’accepteur (les encarts offrent un agrandissement de ces fluctuations), supérieures au bruit de l’expérience, et que l’on attribue à une modification de la position respective des deux fluorophores : l’ADN nucléosomal ‘respire’ au niveau de la sortie de la particule de coeur (Koopmans et al. (2007)).

Le développement de nouvelles techniques de microscopie a permis de gagner en résolution. C’est le cas par exemple de la microscopie électronique à transmission dont la résolution spatiale, fixée cette fois-ci par la longueur d’onde associée aux électrons, est de l’ordre de la fraction de nanomètre^a.

4.1.2 La microscopie électronique en transmission

La microscopie électronique, mise au point au milieu du XX^{ème} siècle, a permis l’observation d’objets avec une résolution accrue (jusqu’à une fraction de nanomètre pour la microscopie électronique à transmission). Il s’agit d’envoyer un faisceau d’électrons sur un échantillon biologique très mince préalablement marqué par des métaux lourds (exemple : acétate d’uranyle). L’échantillon disperse les électrons qui le traversent et le faisceau est focalisé par des lentilles magnétiques pour former une image visible agrandie de l’échantillon sur un écran fluorescent. Une région plus épaisse de l’échantillon diffractera plus d’électrons et apparaîtra plus sombre sur l’image puisque moins d’électrons toucheront cette région de l’écran. Au contraire, les régions transparentes seront plus brillantes. Cette technique permet d’obtenir des grossissements de l’ordre de 100 000X, comme nous aurons l’occasion de le voir au cours de ce travail de thèse (cf Parties 3 et 4).

On a déjà eu l’occasion de présenter plusieurs exemples d’images obtenues en microscopie électronique (structure en collier de perles des chapelets de nucléosomes, fibres de 30 nm) ou en cryo-microscopie (structure des complexes RSC ou SWI/SNF).

Bien que cet outil soit puissant, la microscopie électronique impose de travailler avec des échantillons conducteurs, dans des conditions très éloignées d’un milieu physiologique, par exemple sur des échantillons figés par refroidissement (dans le cas de la cryo-microscopie électronique), de plus les images obtenues sont uniquement dans le plan parallèle à la surface de l’objet. Ces microscopes ne peuvent pas fournir facilement

a. Notons ici que la résolution d’un microscope électronique est surtout limitée par les aberrations dues aux lentilles magnétiques.

les dimensions verticales d'un objet déposé sur la surface ou même les caractéristiques topographiques de cette surface. D'autres types de microscopie permettent de répondre à cette exigence, c'est le cas notamment de la microscopie à force atomique ou *AFM*.

4.1.3 La microscopie à force atomique ou AFM

La microscopie à force atomique (*AFM* pour *Atomic Force Microscopy*), développée dans le milieu des années 1980 (Binnig et al. (1986)), est une technique de microscopie à sonde locale qui permet d'observer le relief d'une surface. Pour ceci, une pointe très fine, supportée par un microlevier, balaie l'échantillon (voir figure 4.2). Les micro-leviers commerciaux ont des longueurs de 50 à 300 μm , des largeurs de 5 μm et sont faits en silicium, oxyde de silicium ou nitrure de silicium, quant à la pointe, on utilise généralement des pointes en carbone diamant ayant un rayon de courbure final entre 1 et 3 nm (Montel (2008)). La pointe, très proche de la surface, subit de la part de celle-ci une force attractive ou répulsive (de type Van der Waals) qui a pour effet de dévier le micro-levier. On envoie un faisceau laser sur le micro-levier, et on recueille le faisceau réfléchi sur une photodiode à quatre cadrans et on enregistre sa position. Grâce à une boucle de rétroaction appropriée, on stabilise au cours du balayage la position de la pointe par rapport à la surface de l'échantillon pour obtenir une déviation constante. On obtient ainsi une image iso-force de la surface qui reflète sa topographie. L'observation d'une surface par AFM permet d'observer sa topographie pratiquement à l'échelle atomique.

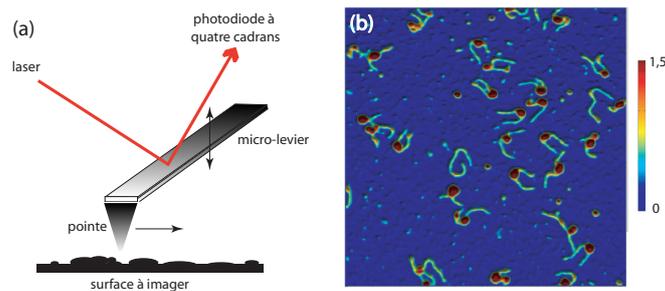


FIGURE 4.2 – (a) Schéma de principe du microscope à force atomique (AFM) (b) Image AFM de mononucléosomes positionnés. Echelle X/Y : 500 nm. Echelle Z : fausses couleurs de 0 (bleu foncé) à 1.5 nm (rouge). L'ADN apparaît en vert, les particules de coeur en rouge et la surface de mica en bleu foncé. La reconstitution n'étant pas totale on remarque des ADN libres. Image extraite de (Montel (2008)).

4.2 Manipulation de molécules uniques

Les techniques de manipulation apportent un ingrédient supplémentaire par rapport à la simple visualisation : la possibilité d'exercer et/ou de mesurer une contrainte mécanique.^b

4.2.1 Tirer et tordre une molécule

La possibilité d'exercer et/ou de mesurer une contrainte mécanique peut être d'un grand intérêt : rappelons que les facteurs de remodelage sont des complexes qui peuvent imposer, par exemple, des dé-

b. Cette partie est très largement inspirée du manuscrit de thèse de T. Lionnet qui a travaillé sur le mécanisme d'action des hélicases dans l'équipe de V. Croquette et D. Bensimon (Lionnet (2006)).

placements directionnels aux nucléosomes. Ils couplent ainsi l'énergie chimique (issu de l'hydrolyse de l'ATP) à un travail mécanique, ils constituent à cet égard des moteurs moléculaires. Pour comprendre leur fonctionnement, il est donc important d'introduire des notions telles que force, couple, vitesse ou efficacité de conversion de l'énergie.

Comme les réactions chimiques du cycle d'un moteur moléculaire sont couplées à un effet mécanique, on peut imaginer exercer une contrainte mécanique sur ce moteur pour influencer par exemple sur sa vitesse. Cette approche permet d'extraire des informations sur le mécanisme de transduction de l'énergie. Ainsi, exercer une force ou un couple sur une molécule, ou alternativement fixer l'extension ou le degré de torsion de celle-ci, permet d'ajouter un paramètre thermodynamique supplémentaire à la gamme traditionnelle des paramètres utilisés en biochimie (concentration en réactifs et/ou produits, température, etc). Par conséquent, la description offerte par ce type d'expériences est plus complète que ce qui pourrait se faire en tube à essai (Bustamante et al. (2004)).

Toutefois, on peut reprocher à ce type de méthodes d'être invasives et de ne pas reproduire fidèlement les conditions physiologiques. Cet argument n'est que partiellement justifié. En effet, dans le cas de l'ADN, les notions de couple et de torsion sont cruciales puisque le surenroulement constitue une variable finement régulée dans la cellule. De plus, les expériences réalisées en tirant sur l'ADN peuvent souvent être extrapolées à force nulle à partir de la variation observée en fonction de la force exercée. Une incertitude subsiste cependant quant à la gamme effective de forces réellement exercée par les moteurs *in vivo*, gamme qui reste pour le moment difficile à mesurer.

Dans cette partie, nous précisons d'abord les ordres de grandeur des paramètres importants pour ces expériences à l'échelle d'une seule molécule (énergie, force, tailles caractéristiques...) puis nous présentons les principales méthodes de manipulation qui permettent de sonder une molécule unique, nous nous attarderons sur celle que nous avons utilisé au cours de cette thèse : les pinces magnétiques (Chapitre 5). Nous reviendrons enfin sur quelques résultats clefs, obtenus par ces techniques, et concernant la chromatine et les facteurs de remodelage de la chromatine (Chapitre 6).

4.2.2 Ordres de grandeur des paramètres d'intérêt à l'échelle de la molécule unique

Il est important avant de se lancer dans la description des différentes méthodes de micromanipulation, de rappeler quelques ordres de grandeur intervenant à l'échelle d'une molécule unique.

4.2.2.1 Energies

Toutes les énergies seront par la suite le plus souvent exprimées en multiples de l'énergie thermique $k_B T = 4.1 \cdot 10^{-21} \text{ J} = 4.1 \text{ pN}\cdot\text{nm}$ à température ambiante (où k_B désigne la constante de Boltzmann, T la température exprimée en K). $k_B T$ constitue l'échelle d'énergie pertinente au niveau de la molécule unique, puisqu'elle permet de juger de la stabilité d'une liaison. Les énergies des liaisons faibles mettent en jeu quelques $k_B T$, tandis qu'une liaison covalente met en jeu typiquement $100 k_B T$. L'hydrolyse de l'ATP, une source universelle d'énergie pour les moteurs moléculaires, fournit environ $20 k_B T$. L'énergie nécessaire pour séparer deux bases de l'ADN est de l'ordre de $2 k_B T$.

4.2.2.2 Distances

Deux échelles de distances interviennent dans les expériences de micromanipulation de l'ADN. La première, l'échelle des phénomènes impliquant l'ADN, s'étend typiquement de la fraction de nanomètre (l'extension d'une paire de bases le long de l'axe hélical) à la dizaine de nanomètres (la longueur de

persistance de la molécule d'ADN). La seconde est fixée par les dimensions du senseur utilisé pour exercer et mesurer une force sur la molécule d'ADN, typiquement $1 \mu\text{m}$. La longueur bout à bout des molécules d'ADN utilisées varie de la centaine de nm à la dizaine de μm . Elle est fixée par le nombre de paires de bases de la molécule, quantité librement contrôlée par l'expérimentateur grâce aux techniques de biologie moléculaire.

Les dimensions des phénomènes étudiés impliquent que les objets considérés évoluent dans un milieu à nombre de Reynolds extrêmement faible, de l'ordre de $Re = \rho Lv/\eta = 10^3 \cdot 10^{-6} \cdot 10^{-5} / 10^{-3} = 10^{-5} \ll 1$ pour une sphère de diamètre $L \sim 1 \mu\text{m}$ évoluant à la vitesse v –déjà impressionnante– de $10 \mu\text{m/s}$ dans de l'eau (de masse volumique $\rho = 10^{-3} \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ et de viscosité $\eta = 10^{-3} \text{ S.I.}$). Par conséquent, la dynamique est essentiellement dominée par les effets dissipatifs (la viscosité du milieu) et les effets inertiels sont parfaitement négligeables (Nelson (2004)).

4.2.2.3 Durées

Les durées biologiques varient sur une très grande gamme : le cycle d'activité d'une enzyme varie typiquement de la milliseconde à la seconde. Les étapes biochimiques élémentaires de ce cycle varient elles de $1 \mu\text{s}$ à 1 ms . Les changements conformationnels des protéines s'effectuent sur des durées de l'ordre de 1 ns , tandis que la dynamique moléculaire évolue sur des ps. La bande passante limitée de la mesure effectuée (quelques dizaines de Hz) limite donc la gamme des phénomènes biologiques étudiés aux cycles enzymatiques et à certaines de leurs sous-étapes.

4.2.2.4 Forces

Force de Langevin La petite taille des moteurs moléculaires les rend extrêmement sensibles aux chocs causés par les molécules d'eau soumises à l'agitation thermique. La collision de chaque molécule d'eau sur une protéine produit une force instantanée, mais comme statistiquement la particule reçoit autant de chocs venant d'une direction que de la direction opposée, elle subit en moyenne une force nulle. Cependant, pour peu que l'on observe une particule sur un temps suffisamment court, les fluctuations statistiques du nombre de collisions subies peuvent devenir importantes et la force ressentie devient non négligeable. La force nette exercée par les chocs dépend donc cruciallement du temps d'observation de la particule.

L'effet de ces collisions est modélisé mathématiquement sous la forme d'une force - ou plutôt *densité de force* - dite de Langevin, dont les propriétés sont les suivantes : sa valeur moyenne est nulle, et sa valeur instantanée est aléatoire. Elle peut être représentée par une variable aléatoire gaussienne dont la fonction de corrélation (indépendante du temps) vaut $\langle F_L(t)F_L(t + \tau) \rangle = 12\pi\eta dk_B T \delta(\tau)$, où d représente le diamètre de la particule considérée, η désigne la viscosité du milieu, et δ la distribution de Dirac. Cette définition permet de calculer l'amplitude F_L de la force ressentie par une particule durant un temps Δt , c'est-à-dire observée avec une bande passante $\Delta f \equiv 1/\Delta t$ (exprimée en Hz) :

$$F_L(\Delta f) = \sqrt{12\pi\eta dk_B T \Delta f} \quad (4.1)$$

Ce résultat sera présenté et discuté plus en détail au paragraphe concernant la mesure de force. Si on applique cette formule à une sphère de diamètre $1 \mu\text{m}$ dans de l'eau à température ambiante, observée sur 1 s , on obtient une force de l'ordre de 0.01 pN . On voit donc que les paramètres expérimentaux, à savoir la taille de la particule que l'on observe et la bande passante de la mesure fixent la résolution de la mesure de force.

Force entropique En l'absence de force exercée sur l'ADN, la molécule adopte une configuration en pelote statistique dans laquelle l'orientation locale de la molécule est aléatoire, cette configuration maximise son entropie, c'est-à-dire le nombre de micro-états. Lorsque l'on tente d'étirer l'ADN, l'alignement de la

molécule le long de l'axe de la contrainte réduit le nombre de micro-états accessibles, et est donc défavorisé entropiquement. Cela donne naissance à une force résistant à l'étirement, dite *entropique*. Les énergies en jeu sont de l'ordre de $k_B T$ par degré de liberté. On peut par exemple estimer l'ordre de grandeur des forces mises en jeu pour étirer une molécule d'ADN. Celle-ci est assimilée à une chaîne dont les maillons auraient pour taille sa longueur de persistance ($\xi = 50$ nm), ce qui donne : $F \approx k_B T / \xi \approx 0.1$ pN.

Force de rupture d'une liaison Pour obtenir un ordre de grandeur de la force de rupture d'une liaison, on peut adopter une approche dimensionnelle, en utilisant comme ingrédients d'une part l'énergie mise en jeu dans cette liaison et d'autre part la taille de cette liaison. Cette estimation - même si elle donne un ordre de grandeur correct - ne saurait cependant offrir une description satisfaisante du phénomène dynamique que constitue la rupture d'une liaison, puisque toute liaison soumise à une force finit par rompre, pour peu que l'on attende suffisamment longtemps (Evans and Ritchie (1997)).

Tout d'abord, nous allons nous intéresser à la force de rupture d'une liaison faible (*i.e.* non covalente), comme par exemple la liaison entre deux bases appariées. L'énergie mise en jeu dépend de la nature des bases et de ses voisines, de la température et des conditions salines mais vaut en moyenne 2-3 $k_B T$. Comme le rayon de la double hélice vaut 1 nm, la force de rupture de l'appariement vaut environ : $F \approx 10$ pN. Une autre liaison faible intéressante est le lien biotine-streptavidine, utilisé dans les expériences de pinces magnétiques pour ancrer la molécule d'ADN à la bille magnétique. Il s'agit d'une des liaisons faibles les plus solides, sa force de rupture est de l'ordre de 160 pN (Florin et al. (1994)). Ceci fournit la limite supérieure des forces que l'on pourra appliquer à une molécule d'ADN.

Pour le cas des liaisons covalentes, les énergies mises en jeu sont plutôt de l'ordre de l'eV, c'est-à-dire environ 40 $k_B T$, et les distances de l'ordre de 1 Å. La force de rupture d'une liaison covalente est donc de l'ordre du nN.

4.2.3 Les différents montages permettant la manipulation de molécules uniques

Différentes techniques de micromanipulation ont été développées ces vingt dernières années essentiellement pour manipuler des molécules d'ADN uniques. Nous allons ici présenter trois de ces dispositifs et comparer leurs performances : les *microfibres optiques*, les *pinces optiques* et les *pinces magnétiques* sur lesquelles nous reviendrons de manière détaillée dans le chapitre qui suit. Le principe général de ces méthodes est le suivant : il s'agit d'ancrer une molécule linéaire d'ADN d'une part à une surface fixe et d'autre part à un élément mobile qui servira de senseur de force.

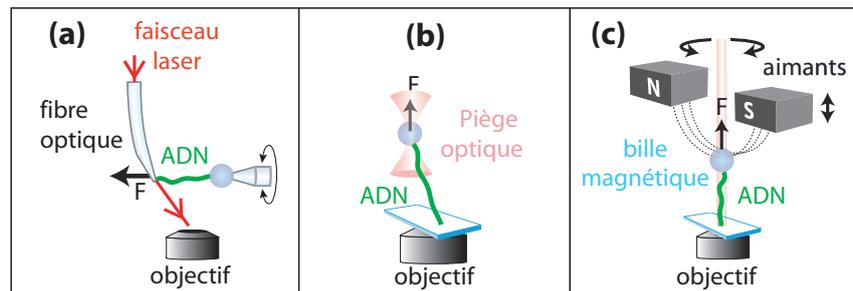


FIGURE 4.3 – Schéma de principe (a) de la microfibre optique, (b) des pinces optiques, (c) des pinces magnétiques.

4.2.3.1 Microfibre optique

Dans cette technique, l'ADN est maintenu par une extrémité à une micropipette, et à l'autre à une microfibre optique (voir figure 4.3(a)) (Cluzel et al. (1996)), (Leger et al. (1998)). La microfibre mesure typiquement $1\ \mu\text{m}$ de diamètre et de 1 mm à 1 cm de long. Lorsqu'on impose un déplacement à la micropipette, cela engendre une force sur l'ADN, à son tour transmise à la fibre optique. Celle-ci se courbe alors, ce qui modifie la direction du faisceau laser qui en sort, que l'on recueille dans un objectif de microscope. La déflexion de celui-ci permet de remonter à la force exercée sur l'ADN en utilisant la raideur de courbure de la fibre. Celle-ci est calibrée au préalable en mesurant la déflexion induite par la force de traînée visqueuse exercée lors d'un mouvement relatif de la fibre et de l'échantillon. La mesure de l'extension de l'ADN est extraite de la position de la pipette et de la déflexion du faisceau laser. Cette méthode permet d'obtenir une résolution de l'ordre de 10 nm. La raideur typique du ressort effectif que constitue la fibre varie entre 10^{-2} et 10^{-6} N/m (Cluzel et al. (1996)).

4.2.3.2 Pincettes optiques

Le piégeage optique consiste à faire passer un faisceau laser à travers un objectif de grande ouverture numérique afin de fortement le focaliser (voir figure 4.3(b)) (Neuman and Stock (2004)), (Molloy and Padgett (2002)). L'intensité lumineuse résultante permet de piéger au voisinage du point focal une particule dont l'indice de réfraction est plus important que celui du milieu environnant (typiquement du polystyrène dans l'eau). Il est possible d'utiliser des particules mesurant quelques centaines de nm, et d'y greffer une molécule d'ADN. En fixant l'autre extrémité de l'ADN à une surface, on obtient un système qui permet de tirer sur l'ADN. Les pincettes optiques constituent donc naturellement un système de micromanipulation à *distance constante* : l'expérimentateur impose la position du piège optique mais la force exercée résulte de l'équilibre du système constitué par la bille piégée et la molécule qui y est ancrée. Notons toutefois que l'on peut utiliser un système de rétroaction sur la position du piège pour travailler à force constante à l'aide de pincettes optiques (Neuman and Stock (2004)).

La raideur de ce système est imposée par le potentiel d'interaction entre la bille et le faisceau. Elle peut être réglée simplement car elle est proportionnelle à l'intensité du faisceau laser ; les valeurs utilisées dans les expériences sur l'ADN s'étendent sur une gamme allant de 10^{-5} à 10^{-3} N/m (Molloy and Padgett (2002)), (Abbondanzieri et al. (2005)). Il faudra dans un premier temps calibrer la raideur du piège (différente pour chaque bille) avant de mesurer le déplacement du senseur (la bille) et d'en déduire la force.

Les pincettes optiques ne permettent pas, dans la plupart des cas, de bloquer la bille piégée en rotation. Cependant, il est possible d'exercer une contrainte de torsion, en modifiant le système. Plusieurs méthodes ont été mises au point. La première consiste à utiliser des particules absorbantes ou biréfringentes qui vont pouvoir effectuer un transfert de spin et de moment angulaire avec le faisceau lumineux, ce qui génère un couple. La seconde consiste à utiliser un faisceau anisotrope, ce qui est réalisé en utilisant par exemple un mode élevé de faisceau gaussien, une figure d'interférence asymétrique, ou tout simplement un faisceau légèrement diffracté par une ouverture. On peut enfin utiliser une particule anisotrope (Molloy and Padgett (2002)).

4.2.3.3 Pincettes magnétiques

Le principe des pincettes magnétiques est simple : une molécule d'ADN est attachée d'une part à une bille super-paramagnétique (de dimension $\sim 1\ \mu\text{m}$) et d'autre part à la surface de verre d'un échantillon placé sur un microscope inversé (voir figure 4.3(c)). Un couple d'aimants permanents, placé au-dessus de l'échantillon, génère un champ magnétique orienté horizontalement au niveau de l'échantillon. La bille est alors soumise d'une part à une force verticale et d'autre part à un couple qui oriente son moment magnétique dans la direction (horizontale) fixée par le champ magnétique (Gosse and Croquette (2002)). Les pôles

des aimants sont séparés d'une fraction de mm, ce qui fixe l'échelle de variation du champ magnétique résultant. Ainsi, à l'échelle des déplacements de la bille ($\leq 1 \mu\text{m}$), le champ est essentiellement homogène, et la force exercée est donc constante. Celle-ci peut être variée en approchant ou en éloignant le couple d'aimants de l'échantillon. Ce système se distingue donc des pinces optiques dans son principe même : ici, la force est imposée par l'expérimentateur — via la position des aimants — et c'est l'extension de la molécule qui relaxe à sa valeur d'équilibre. Une contrainte de torsion peut être imposée simplement en tournant la direction du champ magnétique.

La position de la bille est enregistrée en temps réel (la bande passante typique est de 60 Hz) avec une résolution de l'ordre du nm et la force est mesurée pour chaque position des aimants à partir des fluctuations browniennes transverses de la bille (le principe de la mesure de la force sera présentée plus en détail au Chapitre 5).

Le senseur que constitue la bille ne fixe pas de raideur : en effet, quel que soit son déplacement, la bille subit la même force. En fait, la raideur est fixée par l'élasticité de la molécule ancrée à la bille. Cette valeur dépend donc de la force exercée sur la molécule. Pour une molécule d'ADN double brin de longueur $1 \mu\text{m}$ sur laquelle on exerce une force de 0.5 pN, la raideur vaut quelques 10^{-6} N.m^{-1} . La raideur augmente de manière importante avec la force : à 10 pN, elle vaut environ $2.10^{-4} \text{ N.m}^{-1}$.

4.2.4 Comparaison de ces différentes techniques

4.2.4.1 Comparaison qualitative

On peut regrouper les techniques de micromanipulation en deux groupes : les techniques qui imposent une extension constante à la molécule et mesurent la force résultante (microfibre et pinces optiques) et celles qui réalisent l'opération inverse (les pinces magnétiques). Travailler dans des conditions où la force est constante est souvent pratique en biologie, les pinces magnétiques permettent d'y accéder naturellement (dans le cas des autres techniques, il faut mettre en place un dispositif de rétroaction). D'autre part, les pinces magnétiques permettent d'exercer une contrainte de torsion sur la molécule piégée de manière extrêmement simple.

4.2.4.2 Performances comparées des différents systèmes

Limites de résolution en force Comme on l'a vu précédemment, la résolution ultime en force d'une technique est fixée par la force de Langevin. Celle-ci vaut $F_L(\Delta f) = \sqrt{12\pi\eta d k_B T \Delta f}$. La viscosité et la température sont des paramètres imposés par la biologie (ici, les expériences sont généralement effectuées dans l'eau à des températures comprises entre 25 et 30°C). La bande passante ne peut pas être inférieure à la fréquence caractéristique du phénomène observé (typiquement 1-100 Hz). Le paramètre de contrôle restant est la taille de la particule considérée, c'est-à-dire celle du senseur de force.

Dans le cas de la microfibre, la résolution en force vaut typiquement quelques pN pour une bande passante de l'ordre de quelques centaines de Hz (Leger et al. (1998)), mais peut descendre à une fraction de pN en réduisant la bande passante à quelques Hz (Essevaz-Roulet et al. (1997)).

Pour les pinces optiques, la résolution typique en force vaut 0.1 pN (bille de $1 \mu\text{m}$ mesurée avec une bande passante de 100 Hz).

La mesure de force dans le cas des pinces magnétiques consiste en général en une calibration préliminaire pour une bille donnée ; il n'est donc pas nécessaire de mesurer la force avec une bande passante importante et on peut par conséquent mesurer des forces très précisément. La limite à la mesure est alors d'ordre pratique : la durée typique d'acquisition pour obtenir une précision de l'ordre de 10 % à 0.01 pN est de quelques dizaines de minutes. Cette technique de mesure empêche cependant de mesurer des forces élevées (on y reviendra dans le chapitre suivant). La force maximale mesurable pour une bille de diamètre $1 \mu\text{m}$

attachée à une molécule de longueur $1 \mu\text{m}$ vaut typiquement une dizaine de pN pour une bande passante de 60 Hz (on pourra atteindre des forces plus importantes en utilisant des billes magnétiques de plus grand diamètre).

Limites de résolution en distance La limite théorique de résolution des méthodes de microscopie optique utilisées dans les techniques de micromanipulation est de l'ordre de 200 nm. Cette valeur limite le *pouvoir de séparation* de deux objets proches, mais elle ne limite pas la précision du *positionnement* d'un objet. On peut détecter la position d'un objet avec une précision arbitrairement grande, pour peu que le nombre de photons émis par l'objet soit suffisant. En pratique, les méthodes de suivi de particules permettent en général de trouver la position d'une particule de taille typique $1 \mu\text{m}$ avec une précision de l'ordre du nanomètre (dans la gamme des bandes passantes typiques).

En général, le principal facteur limitant est donc imposé par les fluctuations browniennes du senseur qui sont reliées via la raideur du senseur k aux fluctuations de la force de Langevin évoquées plus haut (données par la relation (4.1)) :

$$\sqrt{\langle \delta x^2 \rangle} = \frac{\sqrt{12\pi\eta d k_B T \Delta f}}{k},$$

dans la limite où la bande passante n'excède pas la fréquence de coupure des fluctuations du senseur, c'est-à-dire la fréquence au-dessus de laquelle les mouvements du senseur sont amortis par la viscosité du milieu environnant. Pour donner un ordre d'idée, la fréquence de coupure d'une bille de $1 \mu\text{m}$ de diamètre dans un piège optique de raideur 10^{-4} N.m^{-1} vaut environ 1 kHz.

Résumé des performances de ces trois systèmes Le tableau ci-dessous reprend quelques caractéristiques des trois dispositifs de micromanipulation présentés précédemment à savoir la gamme de forces accessibles, la résolution spatiale de ces montages et la raideur de leur senseur.

Dispositif	$F_{min} - F_{max}$ accessibles (pN)	Résolution spatiale	Raideur du senseur (N.m^{-1})
Micropipette	10-1000	qq Å	10^{-6} à 10^{-2}
Pince optique	0,1-100	qq Å	10^{-5} à 10^{-3}
Pince magnétique	0,01-100	qq nm	10^{-6} à 10^{-3}

Chapitre 5

Principe des pinces magnétiques et comportement mécanique d'une molécule d'ADN unique

Sommaire

5.1	Le principe des pinces magnétiques	80
5.1.1	Préparation et ancrage d'une molécule d'ADN unique	80
5.1.2	Description globale du dispositif	81
5.1.3	Les améliorations apportées par la nouvelle version de pinces magnétiques	88
5.2	Comportement mécanique d'une molécule d'ADN double brin	89
5.2.1	Comportement élastique de l'ADN	89
5.2.2	Comportement de l'ADN sous torsion à différentes forces	90
5.3	Les pinces magnétiques, outils de choix pour l'étude d'interactions ADN-protéine	96
5.3.1	Principe de l'étude de l'activité d'une enzyme sur l'ADN, en pinces magnétiques	96
5.3.2	Les pinces magnétiques offrent la résolution nécessaire pour suivre, en temps réel, les cycles enzymatiques d'une Topo II unique	97

La première utilisation des billes magnétiques dans le domaine de la micromanipulation d'ADN remonte à 1992 (Smith et al. (1992)). L'équipe de C. Bustamante a alors réussi à obtenir une première mesure de l'élasticité d'une molécule unique d'ADN en exploitant conjointement la force magnétique créée par des aimants et la force de traînée visqueuse créée par le courant de fluide dans la microchambre dans laquelle se déroule l'expérience.

Depuis, des dispositifs plus évolués, nommés *pinces magnétiques*, ont été mis au point (Strick et al. (1996)). Ils permettent d'exercer une force et une contrainte de torsion sur une bille de taille micrométrique, bille à laquelle on fixe généralement une molécule d'ADN par l'une de ses extrémités, l'autre étant attachée à une surface de verre fixe. Dans la plupart des cas, la force exercée sur la bille est unidirectionnelle, constante et homogène. Il ne s'agit donc pas de *pinces* à proprement parler, puisque la bille n'est pas piégée autour d'une position choisie, mais tirée dans une direction donnée.

Les premières pinces magnétiques mises au point dans l'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse datent du milieu des années 1990. Elles ont permis, dans un premier temps, d'étudier l'effet de la torsion sur une molécule d'ADN unique (Strick et al. (1996)), (Strick et al. (1998)). Durant ma thèse, j'ai eu recours

à deux dispositifs de pinces magnétiques : j'ai utilisé, durant les premières années de ma thèse (janvier 2005-décembre 2007), le dispositif dont s'était servi G. Lia au cours de son travail de recherche (Lia (2005)). A partir de janvier 2008, j'ai disposé d'une nouvelle génération de pinces magnétiques, mise au point par V. Croquette et commercialisée par la start-up, *Picotwist*, qu'il a créé. Le principe des deux dispositifs est identique, cependant, de nombreuses améliorations ont été apportées à la nouvelle version, la rendant plus sensible et plus facile d'utilisation^a. Nous nous proposons de présenter ici, le principe de base commun à ces deux dispositifs, nous préciserons ensuite les améliorations marquantes apportées à la nouvelle génération de pinces, puis présenterons enfin le comportement d'une molécule d'ADN unique manipulée avec des pinces magnétiques. Il est, en effet, fondamental de bien cerner son comportement afin d'être en mesure d'interpréter correctement, par la suite, l'action d'enzymes sur une molécule d'ADN.

5.1 Le principe des pinces magnétiques

Comme on l'a déjà précisé, la technique des pinces magnétiques consiste à accrocher une molécule d'ADN par une extrémité, à une bille magnétique de taille micrométrique, et par l'autre, à la surface de verre d'une chambre microfluidique dans laquelle se déroulera l'expérience. Un couple d'aimants permanents placé au dessus de la chambre permettra d'exercer une force et une contrainte de torsion sur la bille magnétique et donc, de tirer et de tordre la molécule d'ADN piégée. La première étape consiste donc à préparer et ancrer une molécule d'ADN unique.

5.1.1 Préparation et ancrage d'une molécule d'ADN unique

5.1.1.1 Préparation de molécules d'ADN fonctionnalisées aux extrémités

L'ancrage des molécules d'ADN, d'une part à une bille magnétique et d'autre part à une surface de verre, repose sur l'utilisation de couples antigène/anticorps qui forment, l'un avec l'autre, une liaison extrêmement stable. On utilise en l'occurrence les couples biotine/streptavidine et digoxygénine/antidigoxigénine. Il est possible d'acheter des billes, de taille micrométrique, recouvertes de streptavidine, et il est assez simple d'obtenir une surface de verre fonctionnalisée par de l'antidigoxigénine^b. Enfin, diverses méthodes de biologie moléculaire permettent de fonctionnaliser les extrémités de l'ADN d'une part avec de la biotine, et d'autre part avec de la digoxygénine. Nous allons préciser celle que nous utilisons, les principales étapes de ce processus sont schématisées sur la figure 5.1.

Les molécules d'ADN que nous utilisons sont des molécules d'ADN double brin linéaires obtenues par ligation de trois fragments différents. Le fragment central est obtenu par la digestion d'un plasmide, par deux enzymes de restriction différentes (appelées *A* et *B*). Cela permet d'obtenir un fragment d'ADN linéaire ayant deux terminaisons différentes spécifiques. Les deux fragments centraux principalement utilisés au cours de mon travail de thèse comptent 3508 pb (resp. 2519 pb) et sont générés par la digestion du plasmide pSA580^c (resp. pGEM3Z-mod, voir Annexe C.1). Les deux fragments constituant les extrémités sont synthétisés par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en présence d'oligonucléotides d'UTP marqués soit par une biotine, soit par une digoxygénine. De cette façon, on obtient des fragments d'ADN portant soit plusieurs biotines, soit plusieurs digoxygénines. Ces fragments sont digérés soit par l'enzyme de restriction

a. T. Lionnet a travaillé avec un dispositif très similaire durant sa thèse et détaille assez précisément les grandes caractéristiques de ce dispositif dans son manuscrit de thèse (Lionnet (2006)).

b. Le détail du protocole est donné dans l'Annexe A.

c. Plasmide offert par S. Adhya.

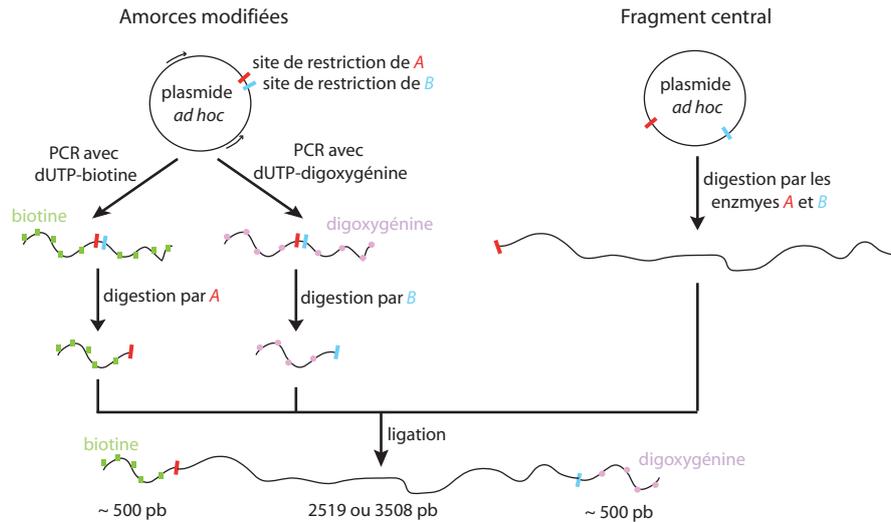


FIGURE 5.1 – Illustration de la préparation de molécules d’ADN linéaires fonctionnalisées aux deux extrémités.

A, soit par l’enzyme de restriction *B*. Les trois fragments d’ADN linéaires obtenus sont ligués entre eux pour former une molécule d’ADN fonctionnalisée aux extrémités.

5.1.1.2 Ancrage des molécules d’ADN fonctionnalisées

L’ADN fonctionnalisé est mélangé dans un tube à essai à une solution de billes magnétiques (Figure 5.2(a)), et incubé afin que l’extrémité biotine des molécules d’ADN se fixe à la surface streptavidine des billes (Figure 5.2(b)). Le mélange est ensuite injecté dans la microchambre où se déroulent les expériences. En l’absence de force magnétique, les billes sédimentent lentement, ce qui favorise les contacts avec la surface inférieure de la chambre, recouverte d’antidigoxygénine (Figure 5.2(c)). Un rinçage doux de la microchambre permet de s’assurer que les billes ne portant pas de molécule d’ADN sont évacuées (Figure 5.2(d)). L’ensemble surface-ADN-bille constitue donc un système auto-assemblé. En jouant sur le rapport des concentrations de billes et d’ADN lors du mélange en tube à essai (typiquement 10^8 billes pour 10^7 molécules d’ADN dans $10 \mu\text{L}$), on peut se placer dans des conditions où très peu de billes sont effectivement fixées à une molécule d’ADN. La probabilité que deux molécules soient ancrées sur une seule bille est par conséquent très faible. Cette éventualité n’est pas vraiment un problème dans la mesure où des tests très simples permettent de s’assurer que la bille est ancrée par un lien unique à la surface. Remarquons que l’ancrage à la bille d’une part et à la surface d’autre part se fait en plusieurs points sur chacun des brins d’ADN, ceci permet de contraindre la molécule d’ADN à suivre la torsion imposée par la bille (Figure 5.2(e)).

5.1.2 Description globale du dispositif

5.1.2.1 Vue d’ensemble du dispositif

Le principe des pinces magnétiques a déjà été largement décrit ailleurs (Gosse and Croquette (2002)), (Strick (1999)). En ce qui concerne le premier dispositif que j’ai utilisé, celui-ci est plus particulièrement décrit par

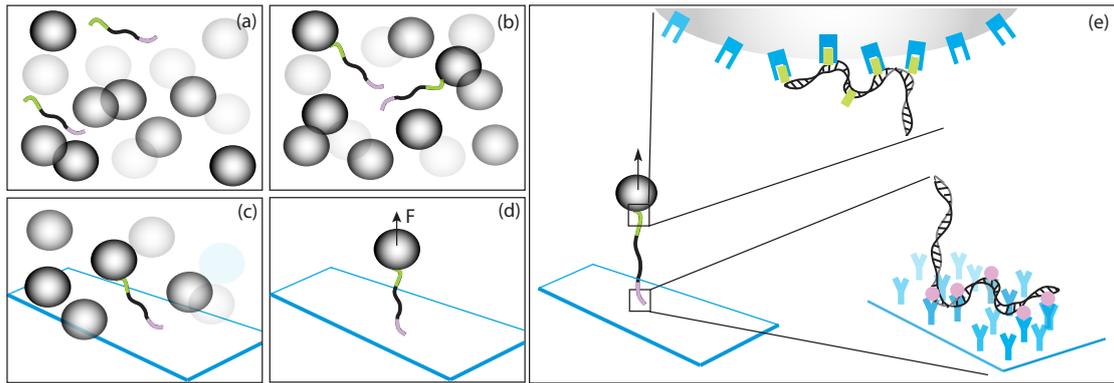


FIGURE 5.2 – Stratégie d’ancrage des molécules d’ADN. (a) Dans un tube à essai, des molécules d’ADN modifiées à leurs extrémités (respectivement biotine et digoxygénine) sont mélangées à un large excès de billes magnétiques fonctionnalisées par de la streptavidine (diamètre $1\ \mu\text{m}$). (b) Après incubation, un petit nombre de billes porte une molécule d’ADN. (c) Le mélange ADN-bille est introduit dans la chambre microfluidique dont la surface inférieure est fonctionnalisée par de l’anti-digoxygénine, en l’absence de force magnétique. (d) Après quelques minutes de rinçage, seules les billes portant une molécule d’ADN restent piégées au voisinage de la surface. Il est alors possible de les étirer en approchant les aimants de l’échantillon. (e) Détail de l’ancrage de la molécule d’ADN : de multiples points d’ancrage sur chacun des brins de l’ADN permettent de contraindre la molécule d’ADN à suivre la torsion imposée par la bille.

G. Lia dans (Lia (2005)), le deuxième dispositif utilisé est très semblable à celui décrit par T. Lionnet dans (Lionnet (2006)). On va revenir sur les principales caractéristiques de ce dernier montage et insister sur les améliorations qu’il offre par rapport à la première version^d.

Les figures 5.3(a) et (b) donnent une vue d’ensemble du dispositif utilisé, celui-ci est actuellement commercialisé par la start-up *Picotwist* créée par V. Croquette. Il s’agit d’un microscope inversé sur lequel est placée une microchambre dans laquelle se déroulent les expériences. Un couple d’aimants surmontant la chambre permet de micromanipuler une bille magnétique. Les figures 5.3(c) et (d) précisent la géométrie de la microchambre de travail ainsi que la façon dont celle-ci est assemblée^e. On éclaire l’échantillon à l’aide d’une LED rouge focalisée au niveau de l’échantillon et on image le tout, grâce à un objectif à immersion à huile (100X, N.A.=1,2, Olympus), sur une caméra CCD (Jai CV-M40) à la fréquence 60 Hz. L’éclairement ainsi réalisé permet d’obtenir des anneaux de diffraction autour des billes magnétiques qui sont mis à profit pour suivre la position 3D d’une ou de plusieurs billes simultanément.

5.1.2.2 Suivi vidéo et mesure de la position 3D d’une bille magnétique

Le principe de la détection de la position de la bille repose sur la configuration particulière de l’éclairement : comme celui-ci est quasiment parallèle au niveau de l’échantillon, les objets diffusants, comme les billes, produisent une figure de diffraction qui apparaît sous la forme d’anneaux concentriques (Figure 5.4). Un calcul d’auto-convolution sur l’image permet de trouver le centroïde de ces anneaux, qui correspond à la position dans le plan (x, y) de la bille. L’exploitation des propriétés de la figure de diffraction permet d’extraire de l’image à deux dimensions l’information sur la troisième dimension. En effet, la taille des

d. La partie qui suit est très largement inspirée de la thèse de T. Lionnet (Lionnet (2006)).

e. On se reportera à l’Annexe A pour les détails de la préparation de la chambre microfluidique.

5.1. LE PRINCIPE DES PINCES MAGNÉTIQUES

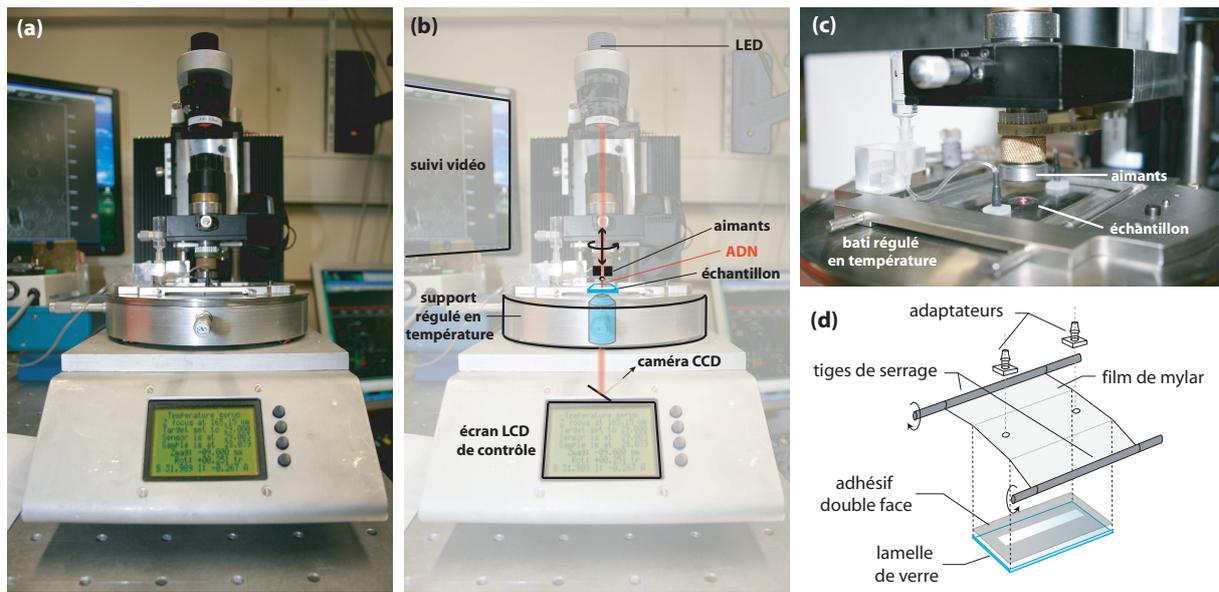


FIGURE 5.3 – Le dispositif des pinces magnétiques. (a) Photo de l'ensemble du dispositif. (b) Schéma de principe. Une LED est focalisée sur l'échantillon. La zone d'intérêt est imagée par un objectif sur une caméra CCD. Des aimants placés au-dessus de l'échantillon permettent d'exercer une force et une contrainte de torsion sur une bille magnétique ancrée à la surface par une molécule d'ADN (lien rouge). La bille, les aimants et la molécule d'ADN ne sont pas représentés à l'échelle. (c) Gros plan de l'échantillon. Des puits permettent l'injection de fluide jusque dans la chambre microfluidique dans laquelle se déroule l'expérience. Les aimants placés au-dessus de l'échantillon peuvent être translattés verticalement et entraînés en rotation autour de l'axe vertical. (d) Principe d'assemblage de la micro-chambre. Un microcanal est creusé au centre d'un film adhésif double-face. Celui-ci est placé entre une lamelle de verre et un film de mylar tendu entre deux tiges. Deux trous percés dans le mylar permettent, après y avoir collé des adaptateurs, d'injecter les fluides par des tubes. Les dimensions du canal ainsi créé sont de près de $50 \text{ mm} \times 5 \text{ mm} \times 60 \mu\text{m}$, soit un volume de près de $15 \mu\text{L}$.

anneaux de diffraction augmente au fur et à mesure que la bille s'éloigne du plan focal de l'objectif ; cette taille fournit donc une mesure indirecte de la position relative bille-plan focal de l'objectif. Chaque bille considérée nécessite une calibration, dont le principe est le suivant : on exerce une force élevée sur la bille, ce qui étire l'ADN et surtout réduit les fluctuations browniennes de la position de la bille. On déplace ensuite l'objectif sur une gamme de positions le long de l'axe optique. Pour chacune de ces positions, on enregistre plusieurs images de la bille afin d'en obtenir une image moyenne. On obtient un jeu d'images à partir duquel on extrait la relation entre le profil des anneaux et la position de l'objectif. Une fois cette étape réalisée, il suffit ensuite de fixer la position de l'objectif et d'enregistrer en temps réel le profil des anneaux. L'inversion de la relation obtenue lors de la calibration permet d'obtenir une mesure de la position de la bille.

Cette méthode permet un suivi de la position de la bille en temps réel, à 60 Hz, avec une précision de l'ordre de 1 nm. Comme on exerce une force verticale, une variation de l'extension de l'ADN produit un déplacement de la bille de la même quantité. On a donc accès directement à une mesure de l'exten-

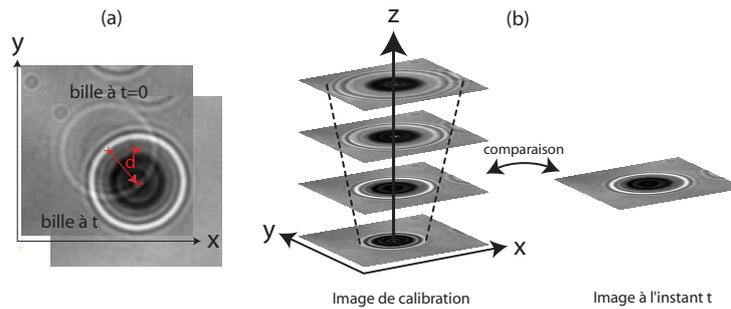


FIGURE 5.4 – Principe de suivi de la position de la bille. (a) Mesure dans le plan (x, y) . A un instant t donné, on enregistre la position du centroïde des anneaux de diffraction. En effectuant la corrélation du profil radial d'intensité à t avec celui à $t = 0$, on obtient le déplacement de la bille dans le plan (x, y) . (b) Mesure le long de l'axe optique. Au début de l'expérience, on varie la distance relative bille-plan focal de l'objectif en maintenant la position de la bille immobile et en déplaçant l'objectif le long de l'axe optique. Une image est enregistrée pour chaque position relative bille-plan focal, formant ainsi un jeu d'images de calibration. Au cours de l'expérience, l'image de la bille est comparée en temps réel aux images de calibration ce qui permet, connaissant la position de l'objectif, de remonter à la position de la bille.

sion bout-à-bout de la molécule d'ADN. Toutefois, la mesure ainsi obtenue est relative et ne donne pas accès à la valeur de l'extension absolue de l'ADN. On peut toutefois estimer cette dernière en mesurant dans un premier temps la position relative de la bille à force nulle, et en soustrayant ensuite cette valeur des mesures de position ultérieures. Cette méthode induit une incertitude de l'ordre de 10 à 200 nm sur l'extension absolue de la molécule. Généralement, la mesure de l'activité d'une protéine ne nécessite une grande précision que sur des valeurs relatives de l'extension de la molécule d'ADN, cette limitation ne posera donc pas de problème dans ce cas. On verra par contre que ceci peut s'avérer ennuyeux dans le cas de la mesure de la force exercée sur une molécule d'ADN.

Nous allons nous intéresser ici à la force et la torsion imposées par les aimants : on va montrer que la bille se déplace en bloc pour aligner sa direction d'aimantation avec le champ et que l'on peut mesurer la force appliquée sur la bille en étudiant ses fluctuations transverses.

5.1.2.3 Génération de torsion dans une molécule d'ADN ancrée entre une bille magnétique et la surface de la microchambre

Un couple d'aimants permanents (NeFeB), pôles opposés en regard, séparés typiquement d'une fraction de mm, est positionné au-dessus de l'échantillon. Le champ magnétique ainsi généré est orienté horizontalement, vaut typiquement 0.7 Tesla au centre de la fente séparant les aimants, et décroît à peu près exponentiellement le long de l'axe optique z , avec une distance caractéristique de l'ordre de la taille de la fente, c'est-à-dire ~ 0.3 mm.

Les billes magnétiques utilisées sont constituées d'un matériau superparamagnétique, c'est-à-dire qui couple forte susceptibilité et aimantation rémanente nulle. En pratique, les billes sont constituées d'un ensemble de nanocristaux ferromagnétiques fixes (avec $T_c > T_{amb}$), orientés dans une matrice non magnétique (Pankhurst et al. (2003)). Ces nanodomains sont suffisamment petits pour perdre leur aimantation rémanente sous l'effet des fluctuations thermiques. Lorsqu'un champ magnétique est appliqué à la bille, celle-ci acquiert un moment magnétique composé de deux contributions : la première, la plus importante (de l'ordre de

5.1. LE PRINCIPE DES PINCES MAGNÉTIQUES

10^{-14} A.m^2), est alignée le long du champ. La seconde, beaucoup plus faible (de l'ordre de 10^{-16} A.m^2), est alignée le long d'une direction d'aimantation préférentielle fixée par rapport à la bille, due à une légère anisotropie de la répartition et de l'orientation du matériau magnétique. La contribution anisotrope crée donc un couple (de l'ordre de 10^4 pN.nm) qui tend à aligner la direction d'aimantation préférentielle de la bille à celle du champ. Ce couple dépasse de quelques ordres de grandeurs tous les couples en jeu dans nos expériences (de l'ordre du pN.nm). On pourra donc considérer que l'application d'un champ magnétique suffit à déplacer la bille en bloc pour aligner sa direction d'aimantation avec le champ.

5.1.2.4 Mesure de la force exercée, par les aimants, sur la bille magnétique

La méthode de mesure de la force exercée par les aimants sur une bille magnétique repose sur la mesure des fluctuations browniennes de cette bille ancrée, par une molécule d'ADN, à la surface de l'échantillon.

Analyse temporelle Intéressons nous au mouvement de la bille. Celle-ci est soumise à la force exercée par les aimants, à la tension de la molécule d'ADN et à l'interaction avec l'eau qui l'entoure, qui consiste d'une part en une force de frottement visqueux F_v et d'autre part en la force de Langevin F_L .

La force de frottement visqueux vaut (dans l'approximation où la bille est située loin de la surface (Svoboda and Block (1994))) : $F_v = 6\pi\eta r v$, où r désigne le rayon de la bille, v sa vitesse et η la viscosité de l'eau.

Lorsque, sous l'action d'une fluctuation, la bille s'éloigne de δx de l'axe de la force z , la résultante δF de la force exercée par les aimants et par l'ADN est transversale et vaut $\delta F \sim F\delta x / \langle z \rangle$ (Figure 5.5(gauche)). La bille est donc maintenue autour de l'axe de la force magnétique par un ressort effectif de raideur $k_x = F / \langle z \rangle$.

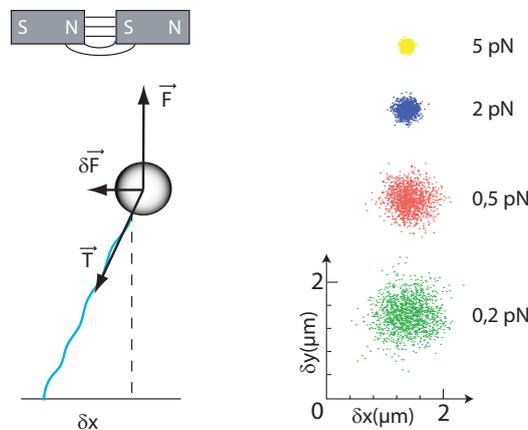


FIGURE 5.5 – (gauche) La résultante des forces exercées sur la bille par l'ADN et les aimants constitue une force de rappel δF équivalente à un ressort de raideur $k_x = F / \langle z \rangle$. (droite) Enregistrement des fluctuations transverses ($\delta x, \delta y$) d'une bille magnétique de diamètre $1 \mu\text{m}$ attachée à une molécule d'ADN de $5,8 \mu\text{m}$. Les fluctuations transverses suivent une loi gaussienne et leur amplitude décroît avec la force. On a décalé le centre des fluctuations pour plus de clarté.

Le théorème d'équipartition établit que la valeur moyenne de l'énergie mise en jeu dans chaque degré de liberté quadratique indépendant d'un système à la température T vaut $k_B T / 2$ (Reif (1965)). Appliqué à la

position x , on obtient que $k_B T/2 = k_x \langle \delta x^2 \rangle / 2 = F \langle \delta x^2 \rangle / (2 \langle z \rangle)$, soit $F = k_B T \langle z \rangle / \langle \delta x^2 \rangle$. Ce résultat très simple confirme l'intuition que plus la force appliquée au système est grande et plus ses fluctuations transverses sont faibles : la figure 5.5 (droite) présente des résultats expérimentaux illustrant cela : on a mesuré l'amplitude des fluctuations transverses (δx , δy) d'une bille magnétique de diamètre $1 \mu\text{m}$, attachée à la surface par une molécule d'ADN de $5,8 \mu\text{m}$, pour des forces comprises entre 0.2 et 5 pN . L'amplitude des fluctuations diminue avec la force.

Malheureusement, cette approche simple n'est que rarement utilisable en pratique. En effet, la bande passante nécessairement finie de la mesure ne permet pas d'avoir accès aux composantes haute fréquence des fluctuations. Les fluctuations sont donc sous-échantillonnées, ce qui conduit à surestimer la force. D'autre part, les dérives mécaniques du système dans le domaine des basses fréquences augmentent artificiellement le niveau du bruit mesuré. Il est possible de contourner ces problèmes par l'analyse fréquentielle comme on va le voir maintenant.

Analyse fréquentielle On écrit l'équation du mouvement de la bille le long de l'axe x , dans l'espace direct :

$$k_x x + 6\pi\eta r \frac{\partial x}{\partial t} = F_{L,x}$$

On a négligé dans cette équation le terme inertiel, du fait du nombre de Reynolds extrêmement faible ici (Nelson (2004)).

On opère une transformée de Fourier de l'équation précédente :

$$k_x \tilde{x} + 12\pi^2 \eta r j f \tilde{x} = \tilde{F}_{L,x}$$

où f désigne la fréquence (Hz), et $\tilde{x}(f)$ et $\tilde{F}_{L,x}(f)$ les transformées de Fourier respectives de $x(t)$ et $F_{L,x}(t)$. On en déduit simplement le spectre de puissance des fluctuations de position :

$$|\tilde{x}^2(f)| = \frac{12\pi k_B T \eta r}{k_x^2} \frac{1}{1 + (f/f_c)^2}$$

en utilisant le fait que le spectre de puissance de la force de Langevin $|\tilde{F}_{L,x}(f)|^2$ est égal à la transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation : c'est donc un bruit blanc de niveau $|\tilde{F}_{L,x}(f)|^2 = 12\pi\eta r k_B T$. Le spectre des fluctuations est Lorentzien, avec une fréquence de coupure $f_c = k_x / (12\pi^2 \eta r) = F / (12\pi^2 \eta r z)$ au-delà de laquelle les fluctuations sont amorties par le frottement visqueux. Cet amortissement implique qu'il n'est pas nécessaire d'avoir une bande passante infinie pour mesurer correctement les fluctuations. Acquérir la position de la bille à une fréquence d'acquisition f_{acq} grande devant f_c suffit à correctement échantillonner le signal. Cependant, dans des situations où la fréquence de coupure est de l'ordre ou supérieure à la fréquence de Nyquist $f_{Nyquist} = f_{acq}/2$, il sera impossible de mesurer correctement la force exercée sur la bille. L'analyse de l'expression de f_c montre que cette situation se produit dans le régime des hautes forces, pour des molécules courtes et des billes de faible diamètre.

Enfin, l'amortissement aux hautes fréquences signifie que la contribution brownienne aux fluctuations de position est gommée par la faible réponse de la bille. Dans ce domaine de fréquences, la position de la bille est donc corrélée dans le temps. Cette corrélation intervient sur des durées $\leq \tau = 1/f_c$. Pour obtenir une statistique significative, il faut donc vérifier que la durée de l'acquisition des fluctuations de la bille est

5.1. LE PRINCIPE DES PINCES MAGNÉTIQUES

très supérieure à τ . Cela pose un deuxième obstacle, d'ordre pratique, à la mesure de F , cette fois-ci dans le régime des basses forces : les durées d'acquisition nécessaires deviennent rapidement longues pour permettre une mesure systématique (typiquement quelques dizaines de minutes pour atteindre une précision de 10% à $F=0.01$ pN).

La figure 5.6(a) présente les spectres des fluctuations transverses d'une bille de $1 \mu\text{m}$ de diamètre reliée à une molécule d'ADN de $16.2 \mu\text{m}$ de long : l'ajustement des spectres à une lorentzienne permet de déterminer la force. En répétant ce procédé pour différentes positions des aimants et en mesurant la valeur moyenne de l'extension de la molécule d'ADN pour chacune de ces positions, il est possible de construire la courbe force-extension caractérisant le comportement élastique d'une molécule d'ADN double brin (Figure 5.6(b)).

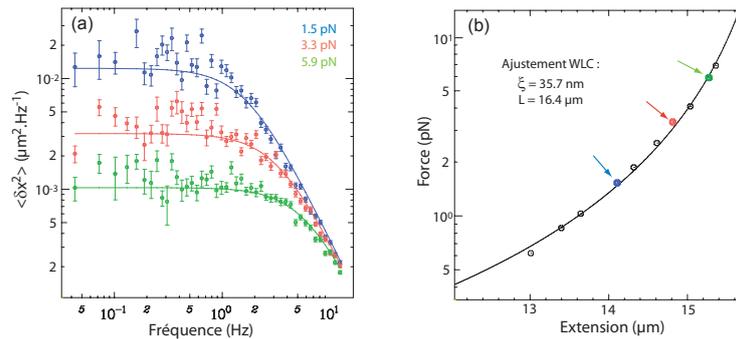


FIGURE 5.6 – Calcul de la force par la mesure des fluctuations transverses. (a) Spectre des fluctuations transverses d'une bille de $1 \mu\text{m}$ de diamètre attachée à une molécule d'ADN de $16,2 \mu\text{m}$ de long. L'ajustement à une Lorentzienne permet d'extraire la valeur de la force. (b) Courbe force-extension d'une molécule d'ADN double brin, dans le tampon suivant : 10 mM Hepes pH ~ 7.3 , 50 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 0.1 mM DTT, 0.2 % BSA. La valeur de la longueur de persistance vaut, pour ces conditions de tampon, 35,7 nm. Les spectres donnés en (a) correspondent aux points de couleur indiqués par des flèches.

Dans le cadre de nos expériences sur les facteurs de remodelage de la chromatine, nous avons essentiellement utilisé des molécules de 860 nm ou de $1,2 \mu\text{m}$. Dans ces conditions, la fréquence de coupure atteint la fréquence de Nyquist de 30 Hz, pour une force de ~ 3 pN (en prenant $r \sim 1 \mu\text{m}$, $z \sim 1 \mu\text{m}$ et $\eta \sim 10^{-3} Pl$). Les mesures de force faites pour des valeurs supérieures à 1 pN seront surestimées. De plus, les molécules d'ADN étant très courtes, dès que la force sera faible, la bille sera suffisamment proche de la surface pour que la description faite précédemment tombe à défaut : l'expression de la force visqueuse proposée précédemment ($F_v = 6\pi\eta r v$) ne sera plus valable du fait de la proximité de la surface et, un potentiel d'interaction entre la surface et la bille, d'expression inconnue, va venir perturber les fluctuations de la bille au voisinage de la surface. Il ne sera donc pas possible de mesurer systématiquement la force pour chacune des billes étudiées. Pour connaître la force appliquée à nos molécules d'ADN courtes, on procédera comme suit : on mesurera les fluctuations transverses d'une bille de $1 \mu\text{m}$ de diamètre, reliée à une molécule d'ADN longue (typiquement $16 \mu\text{m}$) dans un régime de force pour lequel $f_{Nyquist} \geq 2f_c$. On déterminera ainsi la force appliquée à cette molécule en fonction de la distance relative entre l'échantillon et les aimants et notée d_{aimant} . On répètera cette calibration pour une dizaine de molécules d'ADN. Cela nous donnera une relation entre la force appliquée à une bille de diamètre $1 \mu\text{m}$ et la distance d_{aimant} , quelque soit la longueur de la molécule choisie ensuite pour relier la bille à la surface. Notons que la force ainsi estimée ne peut être connue à mieux que 15 %, en effet, les billes magnétiques commerciales sont légèrement polydisperses : à distance des aimants constante, on observe une distribution de force de largeur

~ 15 %.

5.1.3 Les améliorations apportées par la nouvelle version de pinces magnétiques

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion de travailler avec deux dispositifs de pinces magnétiques différents. La version la plus récente présente de nombreuses améliorations par rapport à la première, celles-ci ont grandement facilité mon travail de recherche. Ces améliorations sont essentiellement dues aux efforts de V. Croquette qui développe et commercialise un dispositif de pinces magnétiques très semblable à la dernière version que j'ai utilisé. Sans entrer dans les détails techniques, nous rappelons ici les principales innovations du dispositif le plus récent :

1. Augmentation de la force maximale accessible :

Avec l'ancien dispositif de pinces magnétiques, la force maximale que l'on atteignait, avec des billes magnétiques de $1\ \mu\text{m}$ de diamètre, était proche de $3\ \text{pN}$. Avec le nouveau dispositif, on atteint, avec les mêmes billes, une force maximale de $9\ \text{pN}$ ^f. Cette amélioration essentielle est due à deux progrès majeurs : d'une part, l'utilisation d'un couple d'aimants plus performant permet de générer un gradient de champ magnétique plus intense au voisinage de l'échantillon, d'autre part, la nouvelle géométrie de la chambre microfluidique permet d'avoir un échantillon plus fin et donc d'approcher les aimants plus près de la bille afin d'obtenir des forces plus importantes au niveau de celle-ci^g.

2. Régulation de la température de l'échantillon et compensation des dérives thermiques :

Dans la première version du dispositif, la température de la chambre microfluidique n'était pas contrôlée : les pinces magnétiques étaient par contre placées dans une salle climatisée pour garantir au mieux une température constante. Néanmoins, les fluctuations de température, inévitables même dans un environnement climatisé, entraînaient des dérives thermiques considérables. En effet, ces fluctuations dilatent ou contractent les pièces mécaniques différemment selon leur nature, ce qui génère de grandes dérives dans les basses fréquences ($\leq 1\ \text{Hz}$)^h. Pour s'affranchir de ces dérives, on effectuait systématiquement des mesures en différentielle : on suivait simultanément deux billes, la première étant la bille d'intérêt, la seconde une bille fixée sur la surface de verre. En soustrayant à la position de la bille d'intérêt celle de la bille fixe, la contribution de la dérive de la distance objectif-échantillon était presque totalement éliminée. Cependant, le bruit sur la mesure de position dans le domaine des hautes fréquences était dû d'une part à l'erreur du suivi de position (pour la bille fixe) et d'autre part aux fluctuations browniennes (pour la bille d'intérêt). Ces deux bruits n'étant pas corrélés, ils s'additionnaient lors de la mesure différentielle.

La nouvelle génération de pinces intègre un système qui permet de réduire considérablement les dérives thermiques. Son principe est simple : il s'agit de maintenir l'objectif par une pièce mécanique qui permet de compenser la dilatation de celui-ciⁱ. Grâce à ce dispositif, les dérives thermiques sont très nettement réduites : on a enregistré les dérives de la position d'une bille immobile sur la surface de la microchambre : celles-ci sont de l'ordre de $160\ \text{nm}$ sur 11 heures d'acquisition, soit une dérive inférieure à $15\ \text{nm}$ par heure.

f. On atteint même actuellement $20\ \text{pN}$ grâce à un couple d'aimants encore plus performant.

g. Dans l'ancien dispositif, l'expérience était menée dans un capillaire de verre de dimension $50\ \text{mm} \times 1\ \text{mm} \times 1\ \text{mm}$. En mettant les aimants au contact de la surface supérieure du capillaire de verre, la distance entre aimant et bille était voisine de $1200\ \mu\text{m}$ ($1\ \text{mm}$ pour la hauteur du capillaire et $200\ \mu\text{m}$ pour l'épaisseur de la surface supérieure du capillaire). Dans le cas des nouvelles cellules, la distance minimale entre les aimants et la bille vaut $120\ \mu\text{m}$ ($60\ \mu\text{m}$ pour l'épaisseur du scotch double face et $60\ \mu\text{m}$ pour celle de la feuille de mylar).

h. L'amplitude de ces dérives est significative : un objectif se dilate de $1\ \mu\text{m}$ pour une variation de 1°C , ce qui s'avère dramatique dans notre cas puisqu'on souhaite mesurer des variations de longueur de l'ordre de la centaine de nm.

i. Ce principe est décrit dans la thèse de T. Lionnet (Lionnet (2006)).

3. La nouvelle interface permet le suivi simultané de nombreuses billes :

Dans l'ancien dispositif, on suivait systématiquement deux billes : la bille d'intérêt et une bille immobile pour la nécessité du suivi différentiel, mais l'interface du dispositif ne permettait pas d'en suivre plus. Dans la nouvelle version, V. Croquette a développé une interface plus complète grâce à laquelle on peut suivre, en temps réel, un nombre important de billes simultanément. On est alors davantage limité par le nombre de billes intéressantes présentes dans le champ de vue ($\sim 57 \mu\text{m} \times 44 \mu\text{m}$), mais il est courant de pouvoir suivre 4 à 8 billes en même temps. Enfin, l'utilisation d'une caméra ayant une cellule comportant davantage de pixels (*Jai CM-140 GE*) permet d'augmenter la taille du champ de vue de l'expérience (le champ de vue est alors près de 6 fois plus grand), on peut alors suivre de l'ordre de 30 billes simultanément. Il s'agit là d'une amélioration essentielle qui permet d'augmenter le parallélisme des expériences et de gagner un temps précieux.

Pour pouvoir ensuite comprendre les résultats présentés dans le cadre de cette thèse, il est essentiel de présenter maintenant le comportement mécanique d'une molécule d'ADN lorsque celle-ci est soumise à une force de traction ou à une contrainte de torsion, c'est l'objet de ce second paragraphe.

5.2 Comportement mécanique d'une molécule d'ADN double brin

5.2.1 Comportement élastique de l'ADN

L'ADN, comme tout polymère en solution, a tendance à former une pelote statistique sous l'effet de l'entropie. Comme on l'a déjà précisé auparavant, ce polymère a une certaine rigidité de courbure caractérisée par la longueur de persistance ξ^j . Cela permet d'adopter une description inspirée de la physique des milieux continus, ne prenant pas en compte le détail des interactions spécifiques des atomes de la chaîne. On va présenter le modèle qui permet le mieux de décrire le comportement élastique de l'ADN et donc d'ajuster les courbes force-extension caractéristiques de ce comportement (voir celle présentée dans la figure 5.6(b)).

Le modèle qui donne la meilleure description du comportement élastique d'une molécule d'ADN sous tension est le *modèle du ver* (ou *Worm-Like Chain model* (abrégié en *WLC*) en anglais). Ce modèle a d'abord été traité numériquement par Fixman et Kovac (Fixman and Kovac (1973)), une première approche analytique a ensuite suivi (Kovac and Crabb (1982)), puis son traitement complet a été fait par Marko, Siggia et Bustamante (Bustamante et al. (1994)). On paramètre l'ADN par un vecteur tangent à la molécule $\vec{t}(s)$, défini localement, repéré par l'abscisse curviligne s (Figure 5.7).

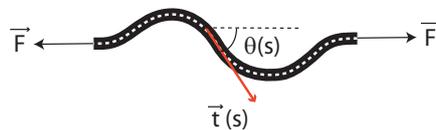


FIGURE 5.7 – Coordonnées utilisées pour décrire la molécule d'ADN dans le modèle du ver.

Dans le cadre de ce modèle, l'énergie, E , d'une molécule d'ADN étirée s'écrit comme l'intégrale de deux

j. Cette grandeur a déjà été définie dans la partie précédente : elle fixe l'échelle de la courbure induite par les fluctuations thermiques et vaut environ 150 pb.

contributions (Bouchiat et al. (1999)) :

$$E/k_B T = \frac{1}{2} \xi \int_0^{L_0} \left(\frac{\partial \vec{t}}{\partial s} \right)^2 ds - \frac{F}{k_B T} \int_0^{L_0} \cos(\theta(s)) ds$$

Le premier terme décrit l'énergie de courbure, d'autant plus importante que la variation locale d'orientation de la chaîne est importante. Le paramètre ξ permet de donner une mesure de cette énergie, et donc de la flexibilité de la molécule : un des résultats du modèle est que les corrélations de l'orientation locale de la chaîne décroissent exponentiellement : $\langle \vec{t}(s) \cdot \vec{t}(s') \rangle \sim \exp(-|s' - s|/\xi)$; ξ décrit donc la persistance des corrélations d'orientation, d'où son nom de longueur de persistance.

Le second terme correspond au travail de la force qui tend à orienter la chaîne le long de l'axe de la contrainte de tension.

Une approche analytique permet d'approcher les résultats du modèle avec une précision de 0.1 % :

$$F = \frac{k_B T}{\xi} \left[\frac{1}{4(1 - \langle z \rangle / L_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{\langle z \rangle}{L_0} + \sum_{i=2}^{i \leq 7} \alpha_i \left(\frac{\langle z \rangle}{L_0} \right)^i \right]$$

où L_0 est la longueur cristallographique de la molécule, et où les coefficients polynomiaux α_i valent respectivement : $\alpha_2 = -0.5164228$, $\alpha_3 = -2.737418$, $\alpha_4 = 16.07497$, $\alpha_5 = -38.87607$, $\alpha_6 = 39.49944$ et $\alpha_7 = -14.17718$.

Ce modèle décrit très bien les données expérimentales présentées sur la figure 5.6(b), rappelons que cette courbe force-extension est obtenue pour une molécule d'ADN de 16.2 μm de long, reliée à une bille magnétique de 1 μm de diamètre, et plongée dans la solution suivante : 10 mM Hepes pH \sim 7.3, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT, 0.2 % BSA. L'ajustement de cette courbe par le modèle du ver permet de déterminer la longueur de persistance d'une telle molécule pour ces conditions de tampon : $\xi \sim 35.7 \text{ nm}^k$.

Remarquons que ce modèle décrit bien le domaine d'élasticité entropique et la saturation de l'extension de la molécule dans le régime des forces modérées ($\leq 10 \text{ pN}$). Toutefois, au contraire d'un ressort idéal, le ressort entropique devient inextensible lorsque sa longueur atteint sa longueur de contour. Lorsque l'on applique des forces plus importantes, il faut tenir compte d'un effet supplémentaire : en effet, la force exercée est suffisante pour avoir quasiment aligné la molécule le long de l'axe de la force (à 10 pN, $\langle z \rangle / L_0 \sim 95\%$), et la molécule subit alors des réarrangements conformationnels mineurs qui l'allongent légèrement. Cet effet peut être introduit de manière phénoménologique sous la forme d'une contribution élastique, de type loi de Hooke, qui s'ajoute à l'énergie de la molécule (Smith et al. (1996)).

5.2.2 Comportement de l'ADN sous torsion à différentes forces

5.2.2.1 Motivations biologiques

L'étude du comportement d'une molécule d'ADN soumise à une contrainte de torsion est d'un grand intérêt en biologie et ce, pour plusieurs raisons. D'abord, notons que l'ADN de la majorité des bactéries est naturellement surenroulé négativement de près de 5 %. Ensuite, de nombreux processus induisent et/ou

k. Cette valeur est plus faible que la valeur généralement citée ($\sim 50 \text{ nm}$) mais la mesure est faite ici dans un tampon relativement salin (Wang et al. (1997)).

régulent la contrainte de torsion imposée à une molécule d'ADN : lors de la transcription de l'ADN par exemple, l'ARN polymérase doit venir lire le code de l'ADN afin de le transcrire en ARN messager. Lors de cette lecture, l'enzyme va avancer le long de la double hélice et séparer les deux simples brins d'ADN pour accéder aux bases. Ceci a pour effet de créer du surenroulement positif devant l'enzyme et du surenroulement négatif derrière elle. La libre rotation de l'un par rapport à l'autre est impossible à cause d'éléments extérieurs (Liu and Wang (1987)). Pour réguler ces accumulations de surenroulements, d'autres enzymes, les Topoisomérases, vont être recrutées pour relaxer cette contrainte due à la progression de l'ARN polymérase.

5.2.2.2 Quelques éléments de topologie

Définitions du nombre d'enlacement Lk et de la densité de surenroulement σ . De manière générale, on définit le nombre d'enlacement Lk d'une molécule d'ADN linéaire, dont on maintient fixes les extrémités (comme dans le dispositif des pinces magnétiques), comme étant le nombre de fois où les deux brins d'ADN s'entrecroisent. Bloquer une molécule en torsion permet d'assurer l'invariance topologique du nombre d'enlacement.

Dans le cas d'une molécule d'ADN relaxée, c'est-à-dire adoptant la forme B sans contrainte de torsion, le nombre d'enlacement, noté ici Lk_0 , correspond donc au rapport entre le nombre de paires de bases N_{pb} de la molécule et le pas hélicale p de l'ADN : $Lk_0 = N_{pb}/p$.

Une molécule d'ADN peut se trouver dans un état tel que son nombre d'enlacement est différent de Lk_0 . On définit alors le surenroulement ΔLk (valeur algébrique, non nécessairement entière) comme le nombre de tours n qu'il faudrait ajouter à la molécule initialement relaxée pour obtenir l'état final : $\Delta Lk = n$. Dans la suite, on parlera de surenroulement lorsque ΔLk est différent de 0, on précisera s'il s'agit de surenroulement *positif* ou *négatif* pour spécifier le signe de ΔLk .

Il est pratique de définir la densité de surenroulement $\sigma = \Delta Lk/Lk_0$, quantité qui permet de comparer des molécules d'ADN de tailles différentes.

Deux variables pour décrire l'état d'enroulement d'une molécule d'ADN : la torsade Tw et la vrille Wr . Pour caractériser l'état d'enroulement d'une molécule d'ADN, deux grandeurs entrent en compte : la torsade Tw (ou *twist*) et la vrille Wr (ou *ouwrith*). La torsade représente le nombre de tours qu'effectue un simple brin d'ADN autour de l'autre brin. Pour une molécule d'ADN relaxée, Tw est égal au nombre d'enlacement Lk_0 . La vrille représente le nombre de croisements de l'axe de la molécule avec lui-même. Pour une molécule relaxée, $Wr=0$.

Le théorème de White (White (1969)) stipule que le nombre d'enlacement Lk est un invariant topologique, égal à la somme de la torsade et de la vrille :

$$Lk = Tw + Wr$$

Remarque : le nombre d'enlacement Lk_0 d'une molécule d'ADN relaxée vérifie :

$$Lk_0 = Tw_0 + Wr_0 = Tw_0 = N_{pb}/p$$

Une contrainte de torsion peut conduire à la modification de la torsade (c'est-à-dire du pas hélicale) et/ou à la modification de la vrille (c'est-à-dire la déformation de l'axe de la molécule) comme l'illustre la

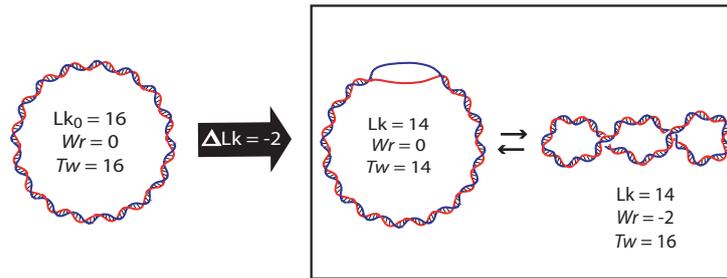


FIGURE 5.8 – Nombre d'enlacement, torsade et vrille. Une molécule d'ADN circulaire est dans son état relaxé, tel que $Lk_0 = 16$. On opère deux passages de brins successifs ($\Delta Lk = -2$). La molécule résultant de cette opération peut accumuler le déficit de torsion sous la forme de torsade (centre), de vrille (droite), ou d'une composition des deux (non représenté) (Lionnet (2006)).

figure 5.8.

L'accumulation de la contrainte de torsion sous forme de vrille peut conduire à la formation de structures particulières, appelées *plectonèmes*, structures pour lesquelles deux doubles brins d'ADN s'enroulent l'un autour de l'autre. La figure 5.9 montre que les plasmides bactériens surenroulés négatifs peuvent présenter naturellement de telles structures.

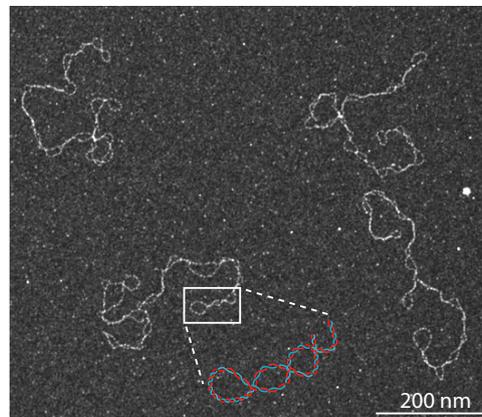


FIGURE 5.9 – Cliché de microscopie électronique du plasmide commercial PhiX de 5286 pb, surenroulé négatif, dans le tampon 10 mM Tris pH ~ 7.9 , 50 mM KCl, 3 mM MgOAc. Cliché de microscopie pris par A. De Cian et O. Piétrement, IGR, Villejuif.

La répartition de la contrainte de torsion entre vrille et torsade dépend de plusieurs paramètres : en premier lieu de l'état topologique de la molécule, mais aussi de son module de courbure, de son module de torsion, des conditions salines du milieu qui peuvent influencer le pas de l'hélice. On va voir maintenant que cette répartition dépend également de la force exercée sur l'ADN, en présen-

tant l'évolution de l'extension bout-à-bout d'une molécule d'ADN en fonction de la contrainte en torsion, à différentes forces.

5.2.2.3 Comportement en torsion d'une molécule d'ADN

Dans les expériences de micromanipulation par pinces magnétiques, nous travaillons avec des molécules d'ADN double brin dont les extrémités sont ancrées, en de multiples points, à la surface de verre de la microchambre d'une part, et à une bille magnétique d'autre part. On peut donc contrôler la torsion de cette molécule d'ADN, à condition que celle-ci ne présente aucun *nick*, c'est-à-dire aucune coupure simple-brin. Ce type de défaut permet en effet de relaxer toute contrainte de torsion puisque la molécule peut tourner librement autour du brin intact. Nous allons ici nous intéresser au comportement en torsion des molécules d'ADN double brin n'ayant aucun *nick*¹.

Pour étudier le comportement d'une molécule d'ADN contrainte en torsion, nous enregistrons l'extension de la molécule (étirée à force constante) en fonction de la torsion appliquée. La figure 5.10(a) présente trois courbes extension-rotation (appelées *courbes en chapeau* du fait de leur allure à basse force) obtenues pour une molécule d'ADN de 5,8 μm de long, pour trois valeurs de forces (0.2, 1 et 6 pN).

On va, dans les paragraphes qui suivent, justifier l'allure des courbes obtenues. On a vu, lors de l'étude de la réponse de l'ADN en tension, que celui-ci se comporte comme un polymère semi-flexible. Nous allons maintenant voir que dans le régime des forces modérées, la réponse de la double hélice à une contrainte de torsion peut être décrite en utilisant la même approche.

Comportement à basse force ($F \leq 0.5$ pN). La courbe rouge de la figure 5.10(a) présente la variation d'extension d'une molécule d'ADN en fonction du nombre de tours imposés ($\Delta Lk = n$). Pour $|\Delta Lk| \leq 30$, l'extension de la molécule varie peu. Elle diminue ensuite linéairement avec le nombre de tours ajoutés et ce, quel que soit le signe de la contrainte de torsion ajoutée : la courbe obtenue est symétrique.

L'allure de cette courbe est facile à comprendre en considérant la torsion d'un tube auquel on applique une force F : lorsqu'on impose des tours sur une molécule d'ADN, celle-ci accumule d'abord la contrainte de torsion sous forme de torsade, modifiant légèrement son pas hélical et ses propriétés géométriques, sans que cela n'induisse une variation significative de sa longueur. L'augmentation du nombre de tours n conduit à une augmentation linéaire du couple $\Gamma_{torsade}$ avec n ($\Gamma_{torsade} = 2\pi n k_B T C / L$, où C est le module de torsion de l'ADN, $C \approx 75\text{-}100$ nm (Mosconi et al. (2009)), et L , la longueur cristallographique de l'ADN) comme l'indique la figure 5.10(b). Lorsque le couple associé à la contrainte franchit une valeur seuil Γ_f , l'énergie en jeu pour augmenter la torsade devient supérieure à celle associée à la formation d'un plectonème. On assiste alors au flambage de la molécule : l'extension de la molécule diminue alors brusquement d'une quantité égale au périmètre de la première boucle de plectonème formée. Après la transition de flambage, des plectonèmes se rajoutent aux premiers et le couple reste constant et égal à Γ_f (Figure 5.10(b)). Dès lors, l'augmentation de n (ou de ΔLk) conduit à l'augmentation de la vrille Wr alors que la torsade Tw ne change plus.

Dans le cadre de ce modèle, on peut calculer l'énergie associée à la formation d'une boucle de plectonème, modélisée par un cercle de rayon R . Elle comporte deux contributions : la première correspond au

1. Les molécules d'ADN n'ayant aucun *nick* seront appelées molécules d'ADN *sensibles à la torsion*, ou molécules d'ADN *surenroulables*. Les molécules d'ADN présentant un *nick* seront appelées molécules d'ADN *insensibles à la torsion*.

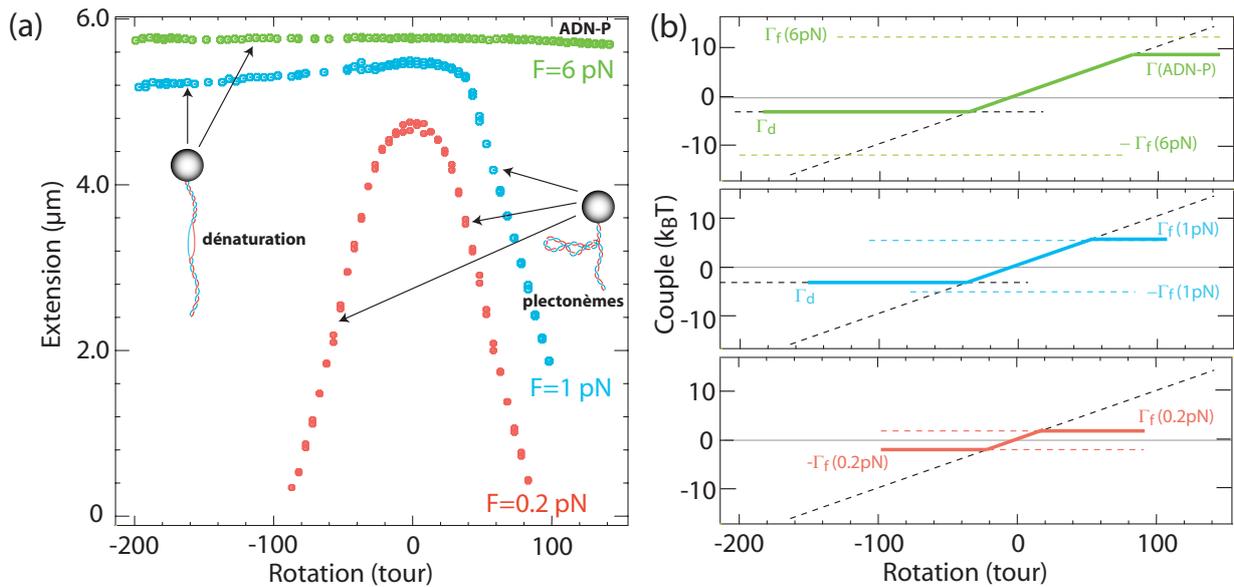


FIGURE 5.10 – (a) Courbes extension-rotation obtenues pour une molécule d'ADN double brin de $5,8 \mu\text{m}$ de long, dans le tampon suivant : 10 mM Hepes $\text{pH} \sim 7.3$, 50 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 0.1 mM DTT, 0.2 % BSA, à différentes forces. (b) Courbe couple-rotation : estimation des couples en jeu correspondant aux conditions de force présentées en (a), d'après le modèle simple détaillé dans le texte. *Bas* : $F=0.2 \text{ pN}$. Le couple suit la droite correspondant au couple de torsade ($\Gamma_{\text{torsade}}/k_B T = 2\pi n C/L$, courbe pointillée noire), avant de saturer à la valeur du couple de flambage à 0.2 pN ($\Gamma_f(0.2 \text{ pN})$). *Centre* : $F=1 \text{ pN}$. Le couple suit la loi correspondant à l'accumulation de torsade avant de saturer à la valeur du couple de flambage à 1 pN ($\Gamma_f(1 \text{ pN})$) pour des surenroulements positifs. Comme le couple de dénaturation est atteint avant le couple de flambage à 1 pN ($-\Gamma_f(1 \text{ pN})$, courbe pointillée bleue) pour un surenroulement négatif, la molécule subit une transition de phase vers de l'ADN dénaturé. *Haut* : $F=6 \text{ pN}$. Le couple de flambage à 6 pN ($\Gamma_f(6 \text{ pN})$) n'est atteint ni en positif, ni en négatif (valeurs indiquées par les pointillés verts). La molécule atteint d'abord le couple de formation de la phase P ($\Gamma(\text{ADN} - P)$) en positif, et le couple de dénaturation Γ_d en négatif.

coût à payer pour courber la molécule, la seconde au coût à payer pour diminuer l'extension bout-à-bout de la molécule contre la force exercée :

$$E_{\text{plec}} = (2\pi R) \frac{\xi k_B T}{2R^2} + 2\pi R F$$

Le rayon qui minimise le terme de droite est donné par : $R = \sqrt{\xi k_B T / (2F)}$. Ainsi, plus la force augmente et plus la taille des boucles de plectonèmes est petite. On montre ainsi que la pente des courbes en chapeau, $d\langle z \rangle / dn \approx 2\pi R$ diminue quand F augmente.

On peut déduire de l'énergie associée à un plectonème, le seuil de l'instabilité de flambage. Le seuil de flambage correspond à l'instant où l'énergie de torsade nécessaire pour ajouter un tour ($E_{\text{torsade}} = \theta \Gamma_{\text{torsade}} = 2\pi \Gamma_f$ au seuil de flambage) et l'énergie de formation d'un plectonème (E_{plec}) sont égales :

$$2\pi \Gamma_f = 2\pi \sqrt{2F \xi k_B T}$$

Ainsi, on en déduit l'expression de $\Gamma_f(F)$ et de n_f , le nombre de tours à imposer à une molécule relaxée pour que celle-ci flambe :

$$\Gamma_f(F) = \sqrt{2F\xi k_B T} \quad \text{et} \quad n_f = \frac{L}{\pi C} \sqrt{\frac{\xi F}{2k_B T}}$$

On en déduit que plus la force est grande, et plus le couple critique et n_f augmentent.

Ce modèle très simple décrit qualitativement le comportement de la molécule d'ADN sous torsion. Toutefois, il s'agit d'un modèle simple à température nulle, c'est-à-dire où le rôle des fluctuations thermiques n'est pas intégré. Cette approximation est en particulier visible au niveau du seuil de flambage : la théorie prévoit une instabilité brusque alors que la transition est adoucie par l'effet des fluctuations.

Des modèles plus complets ont été décrits depuis (Marko and Siggia (1994)), (Marko and Siggia (1995)), (Vologodskii and Marko (1997)). Notamment, un traitement par la mécanique statistique a été proposé récemment par J. F. Marko (Marko (2007)) et permet de rendre compte assez précisément de l'allure des *courbes en chapeau* en fonction de la densité de surenroulement, et de l'évolution du couple en fonction de la force appliquée. Dans ce modèle, la molécule d'ADN est séparée en deux domaines qui coexistent : une phase plectonémique non étirée et ayant une raideur torsionnelle P et un domaine dans lequel l'ADN est étiré et contraint en torsion et caractérisé par une longueur de persistance $\xi \sim 50$ nm et une raideur de torsion effective C_s . Néanmoins, ce modèle ne permet pas d'ajuster parfaitement nos données expérimentales, sur toute l'étendue de la gamme de force explorée, avec un unique paramètre d'ajustement P . Ceci n'est pas surprenant dans la mesure où ce modèle simplifie la description de la phase plectonémique (en omettant par exemple la variation du rayon des boucles de plectonèmes avec la force, du fait de répulsions entropiques). Enfin, plus récemment encore, d'autres groupes ont affiné ces modèles en tenant compte notamment de l'influence du sel sur la réponse en torsion de l'ADN (Forth et al. (2008)), (Mosconi et al. (2009)).

Comportement à force intermédiaire ($0.5 \leq F \leq 3$ pN). L'allure de la courbe extension-rotation, pour une force de traction plus importante (de l'ordre de 1 pN), est différente : on observe un comportement dissymétrique en fonction de σ (Figure 5.10(a), courbe bleue). Pour $\sigma > 0$, la molécule se raccourcit, comme précédemment, du fait de l'apparition de plectonèmes. En revanche, pour $\sigma < 0$, cette longueur ne semble plus dépendre de σ . Cette différence de comportement en fonction du signe de σ est prévisible puisque la molécule d'ADN est chirale. La transition qui apparaît pour des valeurs de surenroulement négatives correspond à l'apparition d'une "bulle de dénaturation". En surenroulant négativement la double hélice, on provoque l'apparition d'une petite région où les liaisons hydrogène qui maintiennent les bases complémentaires des deux brins cèdent sous la contrainte (voir figure 5.10(a)). Ceci se produit lorsque le couple nécessaire pour produire des plectonèmes devient supérieur à celui nécessaire pour dénaturer l'ADN ($|\Gamma_d| \sim 10$ pN.nm, (Lionnet (2006))). Le couple critique de formation des plectonèmes dépasse cette valeur pour des forces de l'ordre de 0.5 pN^m.

Comportement à haute force ($F \geq 3$ pN). Pour des valeurs supérieures à 3 pNⁿ, on observe un comportement nouveau dans le régime des surenroulements positifs (Figure 5.10(a), courbe verte). Le plateau observé correspond à la formation d'une phase d'ADN dite P, surenroulée environ trois fois plus que l'ADN

m. La force pour laquelle se déclarent les premières bulles de dénaturation dépend des conditions salines dans lesquelles on travaille.

n. Là encore, ce seuil de force dépend des conditions salines comme on le verra dans le chapitre 13.

B (Allemand et al. (1998)). Les expériences de micromanipulation ont permis d'estimer le couple nécessaire pour entraîner la transition vers la phase P, il vaut environ $\Gamma(ADN - P) \sim 34$ pN.nm (Bryant et al. (2003)). Lorsque la force est suffisante, le couple élastique de torsade atteint cette valeur avant d'avoir atteint celui nécessaire pour entraîner le flambage. L'ADN se scinde en deux phases, dont les proportions respectives sont déterminées par le nombre de tours positifs ajoutés après avoir franchi le seuil marquant le début de la transition.

5.3 Les pinces magnétiques, outils de choix pour l'étude d'interactions ADN-protéine

Durant la dernière décennie, le dispositif des pinces magnétiques a permis de décrire très précisément le comportement mécanique de l'ADN nu (réponse élastique de l'ADN double et simple brin (Bustamante et al. (1994)), (Dessinges et al. (2002)), comportement en torsion d'une molécule d'ADN double brin (Strick et al. (1998)), séparation des deux brins d'une molécule d'ADN (en pinces optiques ici) (Essevaz-Roulet et al. (1997))). La connaissance précise de cette réponse a pu ensuite servir d'outil pour suivre les interactions entre l'ADN et de nombreux moteurs moléculaires. Les pinces magnétiques ont, par exemple, permis d'étudier différentes hélicases sur l'ADN : UvrD (Dessinges et al. (2004)) ou gp41 (Lionnet et al. (2007)), différentes translocases : RuvAB (Dawid et al. (2004)) et FtsK (Saleh et al. (2004)), des topoisomérases comme la topoisomérase II de *Drosophila melanogaster* et la topoisomérase IV de *Escherichia Coli* (Crisona et al. (2000)), (Charvin et al. (2003)).

Nous allons présenter ici quelques résultats que nous avons obtenu, au cours de ce travail de thèse, en suivant l'action d'une topoisomérase de type II sur une molécule d'ADN nue. Cela nous donnera l'occasion de montrer comment on peut sonder l'activité d'une protéine en pinces magnétiques, de présenter l'allure des signaux que l'on peut acquérir et de discuter des informations que l'on peut en tirer.

5.3.1 Principe de l'étude de l'activité d'une enzyme sur l'ADN, en pinces magnétiques

On souhaite étudier l'action d'une topoisomérase de type II (la Topo II de levure) sur une molécule d'ADN double brin. La Topo II est une enzyme capable de relaxer, en présence d'ATP, de la contrainte positive ou négative accumulée au sein d'une molécule d'ADN. Ce système a déjà été étudié de manière extensive (Charvin (2004)).

Le seul paramètre, auquel le dispositif des pinces magnétiques donne accès, est la donnée de l'extension bout-à-bout ℓ_F de la molécule d'ADN que l'on a piégé. Pour pouvoir suivre l'action d'une enzyme quelconque agissant sur l'ADN, il est nécessaire que le processus impliqué, induise une variation de ℓ_F , sinon, celui-ci passera inaperçu. Pour étudier l'activité de la Topo II, il suffit de suivre l'extension d'une molécule d'ADN double brin à laquelle on applique un certain nombre de tours (positifs ou négatifs) à basse force. On sera alors dans le régime plectonémique. On devrait observer un allongement séquentiel de l'extension bout-à-bout de la molécule d'ADN du fait de la disparition progressive des plectonèmes, relaxés par l'action de la Topo II (Figure 5.11(a)).

5.3.2 Les pinces magnétiques offrent la résolution nécessaire pour suivre, en temps réel, les cycles enzymatiques d'une Topo II unique

On a fait agir la Topo II de levure sur une molécule d'ADN de 860 nm surenroulée positivement. Le principe de notre test est le suivant : nous partons d'une molécule d'ADN relaxée, étirée à une force de l'ordre de 1 pN. En commandant aux aimants une rotation de l'ordre de +10 tours, nous surenroulons positivement l'ADN, ce qui a pour effet de réduire son extension du fait de l'apparition de plectonèmes. Après un certain temps d'attente (réglé par la concentration d'enzymes en solution, typiquement quelques dizaines de pM), une enzyme se fixe dans la région plectonémique de l'ADN, au niveau d'un croisement entre deux fragments d'ADN double-brin, elle est alors capable de résoudre ce croisement et relaxe ainsi l'équivalent de deux boucles de surenroulement. En conséquence, l'extension de l'ADN augmente et ce, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de plectonèmes dans la molécule (voir Figure 5.11(a) et (b)). Pour résoudre chaque cycle enzymatique et espérer ainsi suivre pas à pas l'activité de la topoisomérase, on travaille à concentration en ATP modérée (les traces présentées ici ont été obtenues avec 1 mM ATP).

La figure 5.11(c) présente une trace typique obtenue lors de la relaxation des plectonèmes par la Topo II et montre que l'on résout parfaitement les événements individuels de relaxation des plectonèmes. L'extension bout-à-bout de la molécule d'ADN augmente d'abord de manière irréversible, par pas de 103 ± 2 nm, ce qui est la taille moyenne de deux boucles plectonémiques à 1 pN dans ces conditions de tampon. Viens ensuite un saut irréversible, plus petit que les précédents (51 nm) et qui permet de retrouver la longueur initiale de la molécule. Les premiers sauts sont de même taille (voisine de 103 nm) car on se trouve dans la partie du chapeau pour laquelle la pente est constante (voir Figure 5.11(b) : la pente du chapeau est égale à 54 ± 2 nm/tr), lorsque l'on s'approche du centre de rotation, la pente de la courbe en chapeau diminue, ce qui explique que la dernière relaxation opérée par la Topo II corresponde à un saut de taille inférieure.

Un autre élément est d'un grand intérêt ici : on observe, à la fin de la trace présentée dans la figure 5.11(c), une réduction suivie d'une augmentation rapide de l'extension de la molécule, mettant ainsi en évidence une erreur que commet l'enzyme : la Topo II a ajouté ici de la contrainte (positive ou négative), raccourcissant la molécule, le croisement créé alors par la Topo II est vite résorbé et l'ADN retrouve sa longueur initiale.

La figure 5.11(d) représente la taille des sauts ΔL mesurés pour 41 événements. On a distingué 3 groupes de sauts : les croix vertes correspondent aux sauts irréversibles à l'exception du dernier permettant de retrouver la longueur de l'ADN sans plectonème, les carrés bleus correspondent à ces derniers sauts, tandis que les ronds rouges correspondent aux erreurs commises par la Topo II (réduction de la longueur de la molécule, semblable à celle présente à la fin de la trace de la figure 5.11(c)). La majorité des croix vertes ont une taille moyenne de 103 ± 2 nm. Certaines ont une taille double et correspondent à deux cycles enzymatiques ayant lieu trop rapidement pour être distingués (groupe (i)). On note quelques rares cas où ces sauts ont une taille deux fois plus petite : dans ces cas, une seule boucle de plectonème est libérée, le croisement adjacent doit donc être maintenu bloqué, sans doute par la présence d'une seconde Topo II qui lui serait liée (groupe (ii)). Les carrés bleus correspondent à la relaxation de la molécule d'ADN pour des valeurs de rotation proches du centre de rotation de l'ADN : la pente du chapeau est alors plus faible qu'auparavant (voir Figure 5.11(b)) et la relaxation conduit donc à une augmentation de l'extension moindre. En ce qui concerne les erreurs commises par l'enzyme (réduction de la longueur de la molécule d'ADN, puis retour rapide à son extension de départ), elles apparaissent surtout lorsque l'extension de la molécule est proche de sa valeur maximale.

Le dispositif des pinces magnétiques est une technique très élégante pour suivre l'activité d'une topoi-

5.3. LES PINCES MAGNÉTIQUES, OUTILS DE CHOIX POUR L'ÉTUDE D'INTERACTIONS ADN-PROTÉINE

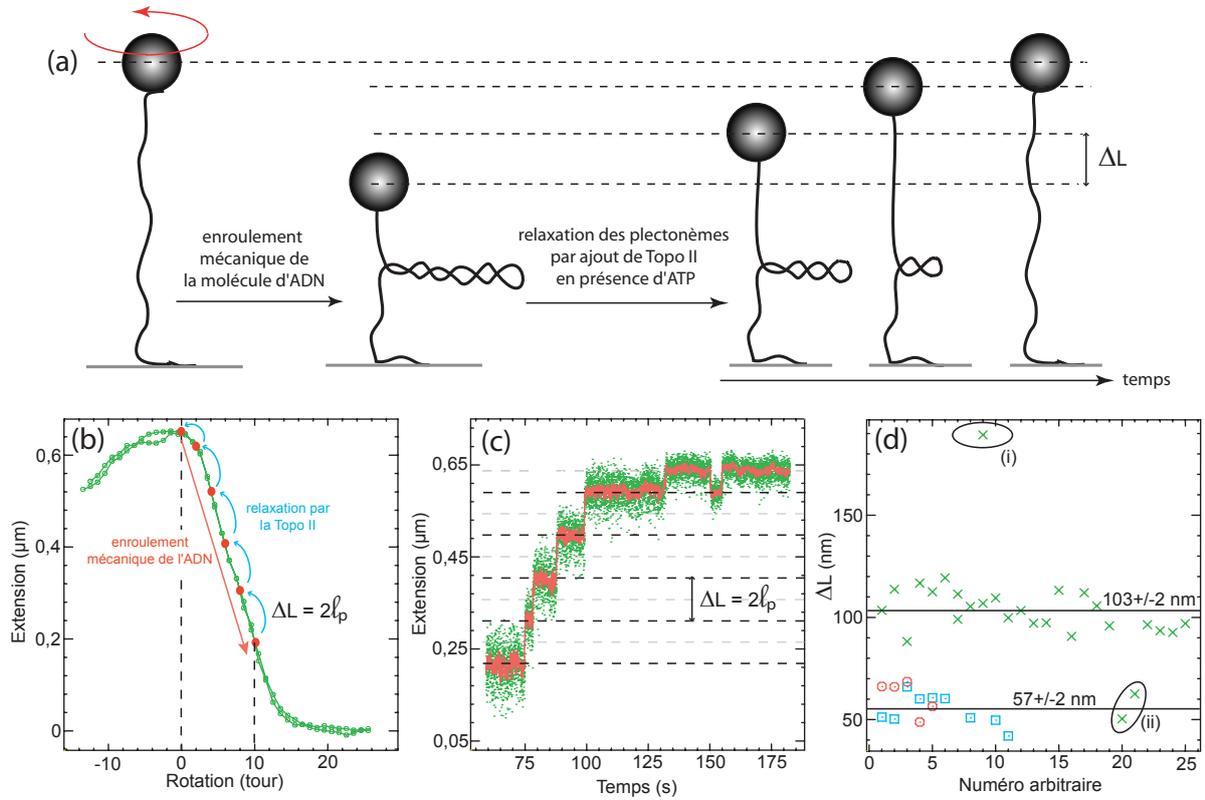


FIGURE 5.11 – (a) Illustration de l'expérience réalisée. (b) Courbe en chapeau obtenue à 1 pN pour cette molécule : on a rappelé les principales étapes de l'expérience : on surenroule l'ADN mécaniquement jusqu'à +10 tours (flèche rouge), puis on laisse la Topo II agir : celle-ci relaxe la molécule en résolvant les croisements dans la structure plectonémique, les uns après les autres : les flèches bleues indiquent le parcours que l'on suit sur la courbe en chapeau lors de ces relaxations. (c) Trace typique correspondant à la relaxation, d'une molécule d'ADN surenroulée, par la Topo II (les données brutes sont en vert, la trace rouge correspond aux données moyennées sur 0,25 seconde). Les conditions de tampon sont les suivantes : 10 mM Tris-Cl pH \sim 7.9, 50 mM NaCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA, 1 mM ATP. ΔL correspond à la taille des sauts d'extension observés lors de la relaxation de l'ADN par la Topo II, cette taille est égale au double de la taille d'une boucle plectonémique (notée ℓ_p), à l'exception de la dernière relaxation vers la longueur initiale : ici, on sort du régime plectonémique et la pente du chapeau n'est plus égale à ℓ_p . (d) Taille des sauts ΔL en nm : (croix vertes) sauts irréversibles à l'exception du dernier permettant à l'ADN de retrouver sa longueur maximale, (carrés bleus) dernier saut irréversible permettant à l'ADN de retrouver sa longueur maximale, (ronds rouges) erreurs commises par la Topo II.

somérase sur une molécule d'ADN. On résout parfaitement les augmentations de ℓ_F (réversibles ou non) de l'ordre de 50 et 100 nm, ayant des durées de l'ordre de la seconde à la dizaine de seconde, pour des forces voisines de 1 pN. Ici, il est relativement aisé d'obtenir de nombreux signaux puisqu'il suffit de surenrouler mécaniquement la molécule pour obtenir des événements de relaxation supplémentaires par la Topo II.

Notre travail de thèse a porté sur l'étude d'une autre famille de protéines agissant sur l'ADN (et sur la chromatine), à savoir les facteurs de remodelage de la chromatine. On sera amené à faire le même genre d'étude que celle présentée ici pour la Topo II. Il s'agira de trouver des conditions pour lesquelles on observe une variation de l'extension bout-à-bout du substrat (ADN, chromatine) consécutivement à l'action de l'enzyme. On jouera pour cela sur différents paramètres : la force, la contrainte de torsion, les conditions ioniques, la température, la présence ou non d'ATP, la nature du substrat....

Avant de présenter le coeur de nos travaux de recherche, nous faisons le point, dans le chapitre suivant, sur les différentes informations déjà obtenues sur la chromatine ou les facteurs de remodelage, à l'échelle de la molécule unique. Cela nous permettra d'identifier ce qu'il reste encore à comprendre et motiver ainsi nos travaux.

Chapitre 6

Une série de résultats très informative sur la chromatine et les FaRC, obtenue à l'échelle de la molécule unique

Sommaire

6.1 Réponse mécanique d'une fibre de nucléosomes	100
6.1.1 Réponse élastique d'une fibre de chromatine native	101
6.1.2 Réponse élastique d'une fibre de chromatine reconstituée <i>in vitro</i> à partir d'extraits cellulaires de <i>Xenopus</i>	102
6.1.3 Réponse élastique d'une répétition régulière de nucléosomes	103
6.1.4 Réponse en torsion d'une répétition régulière de nucléosomes	104
6.1.5 Vers un système plus simple : le mononucléosome	106
6.2 Premières expériences faites sur des facteurs de remodelage de la chromatine, à l'échelle de la molécule unique	107
6.2.1 Activité des facteurs de remodelage de la chromatine, sondée par des techniques d'AFM conventionnelles	107
6.2.2 L'AFM en liquide permet de suivre l'activité de remodelage sur une même molécule	109
6.2.3 Un suivi en temps réel s'impose comme la meilleure alternative pour suivre la dynamique de l'activité de remodelage de ces facteurs	110

Quelques groupes de recherche ont utilisé des dispositifs de visualisation et/ou de micromanipulation de molécules uniques pour essayer de caractériser le comportement mécanique de fibres de nucléosomes (Bancaud et al. (2006)), (Bancaud et al. (2007)), (Brower-Toland et al. (2002)), (Mihardja et al. (2006)); de même, ces techniques ont pu faire leurs preuves en permettant l'étude de facteurs de remodelage de la chromatine. Nous en donnons ici un bref résumé.

6.1 Réponse mécanique d'une fibre de nucléosomes

Après avoir caractérisé très précisément le comportement mécanique de l'ADN, de nombreux groupes ont souhaité se servir de ces différents dispositifs de micromanipulation pour sonder la structure de la chromatine.

6.1. RÉPONSE MÉCANIQUE D'UNE FIBRE DE NUCLÉOSOMES

Les premières expériences ont été réalisées dans le groupe de C. Bustamante (Cui and Bustamante (2000)) sur des fibres de chromatine native, dont il a sondé la réponse élastique. Il s'est avéré que cette réponse était beaucoup plus complexe que celle d'un ADN seul : plusieurs origines peuvent être proposées. La fibre de chromatine a intrinsèquement une structure plus complexe que l'ADN (présence d'histones de coeur, d'histones de liaison, interactions possibles entre les différents nucléosomes...), et chacun de ses constituants va participer à la réponse élastique (et torsionnelle) de la fibre. D'autre part, la composition de fibres de chromatine natives est hétérogène (présence éventuelle de variants d'histones, de modifications post-traductionnelles, d'autres protéines associées à la chromatine...), ceci peut compliquer sérieusement leur étude.

Les expériences réalisées par la suite vont tenter systématiquement de simplifier le modèle de chromatine étudié, afin d'en tirer des informations plus faciles à interpréter : le groupe de M. L. Bannink travaille sur des fibres de chromatine reconstituées *in vitro* à partir d'extraits d'oeufs de *Xenopus*, le groupe de M. Wang simplifie franchement le système en travaillant sur un chapelet périodique de nucléosomes soumis à une force de traction. Le groupe de J.-L. Viovy complète ce travail par une étude en torsion sur le même type de fibre. Mais là encore, les signaux sont complexes et il n'est pas simple d'identifier avec certitude la signature d'un unique nucléosome. Les dernières expériences réalisées par le groupe de C. Bustamante suivent le comportement d'un unique nucléosome soumis à une force de traction : ainsi, les signaux enregistrés correspondent, sans ambiguïté, à la réponse élastique d'un seul nucléosome. Revenons plus en détail sur ces différentes expériences, cela permettra de mieux comprendre les résultats que j'ai pu obtenir durant mes travaux de recherche.

6.1.1 Réponse élastique d'une fibre de chromatine native

Le groupe de C. Bustamante a été le premier à solliciter en traction une fibre de chromatine. Il a extrait pour cela des fibres de chromatine natives purifiées à partir d'érythrocytes de poulet, il a fonctionnalisé leurs extrémités pour pouvoir les manipuler grâce à un dispositif de pinces optiques (voir figure 6.1(a)) (Cui and Bustamante (2000)). Il a suivi la réponse de l'extension bout-à-bout de ces fibres de chromatine en fonction de la force appliquée.

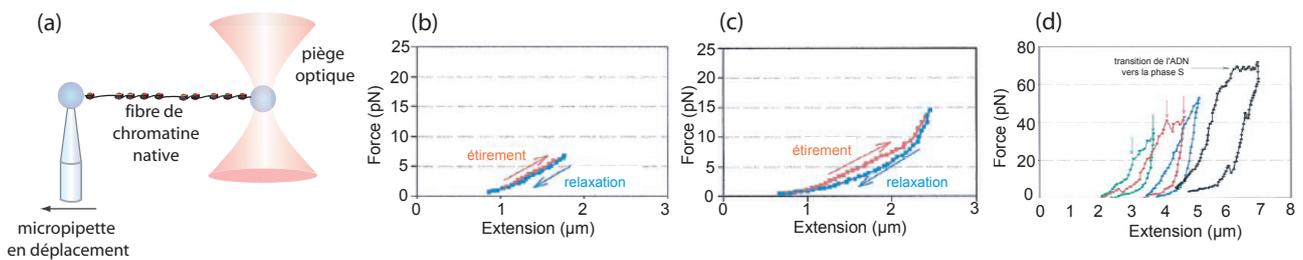


FIGURE 6.1 – (a) Schéma de principe de l'expérience. (b) Courbe force-extension à basses forces ($F \leq 7$ pN). (c) Courbe force-extension pour un régime de forces intermédiaires ($7 \leq F \leq 20$ pN). (d) Cycles successifs d'étirement-relaxation pour des forces supérieures à 20 pN, on a un comportement irréversible que l'on attribue à la perte d'octamères d'histones. D'après (Cui and Bustamante (2000)).

A bas sel, il observe trois différents régimes : pour des forces inférieures à 7 pN, la fibre s'allonge continuellement lorsqu'on augmente la force, puis diminue lorsque la force est abaissée, ces cycles d'étirement et de relaxation sont réversibles (voir figure 6.1(b)). Pour un régime de forces intermédiaires (entre 7 et 20 pN), la courbe de relaxation ne coïncide plus avec celle d'étirement et rejoint cette dernière uniquement

pour des forces inférieures à 2 pN (voir figure 6.1(c)). Au delà de 20 pN, la courbe n'est plus réversible et ne peut être répétée : un hystérésis apparaît entre chaque cycle étirement-relaxation réalisé (voir figure 6.1(d)). Ces observations suggèrent que pour des forces supérieures à 20 pN, on assiste aux détachements mécaniques irréversibles des octamères d'histones.

Ces détachements induisent un accroissement irréversible de la longueur bout-à-bout de la fibre, néanmoins, la résolution de l'expérience ne permet pas de déceler la signature du décrochement d'un nucléosome unique. Des expériences ultérieures ont tenté de répondre à cette question en travaillant avec des fibres de chromatine plus simples reconstituées *in vitro*.

6.1.2 Réponse élastique d'une fibre de chromatine reconstituée *in vitro* à partir d'extraits cellulaires de *Xenopus*

Le groupe de M. L. Bennink a utilisé un dispositif de pinces optiques pour étudier le comportement, sous l'action d'une force de traction, d'une fibre de chromatine irrégulière (Bennink et al. (2001)). Il piège une molécule d'ADN de phage λ dans un dispositif de pinces optiques et introduit dans la chambre microfluidique un extrait dilué d'oeufs de *Xenopus Laevis*. Cet extrait contient, entre autres, des histones et d'autres protéines s'associant à la chromatine (B4, HMG1, HMG2...) mais ne contient pas d'histones de liaison. L'ajout de cet extrait réduit fortement la longueur bout-à-bout initiale de la molécule d'ADN, il interprète ceci par l'assemblage sur l'ADN d'octamères d'histones pour former des nucléosomes (la cinétique de ce type d'assemblage *in vitro* a été caractérisé en microscopie de fluorescence par l'équipe de J.-L. Viovy (Ladoux et al. (2000))). Il tire ensuite sur cette fibre et enregistre l'évolution de l'extension bout-à-bout de la fibre en fonction de la force appliquée. Pour des forces comprises entre 20 et 40 pN, il obtient une courbe en dent de scie mais dont les événements de relaxation sont irréguliers : ils semblent correspondre à un accroissement de la longueur bout-à-bout de la fibre d'un multiple de 65 nm. Le groupe de Bennink propose donc que le détachement d'un octamère d'histones se fasse de manière irréversible à des forces supérieures à 20 pN et qu'il libère 65 nm d'ADN. Il justifie les écarts existant entre leurs résultats et ceux de Cui et al. de plusieurs manières : les fibres de chromatine qu'il sonde ne sont pas les mêmes (les précédents utilisaient une fibre native contenant des histones de liaison) et la vitesse à laquelle chaque groupe acquiert leurs données diffère également (ici, le groupe de Bennink applique la force de traction avec une vitesse de 38 pN.s⁻¹).

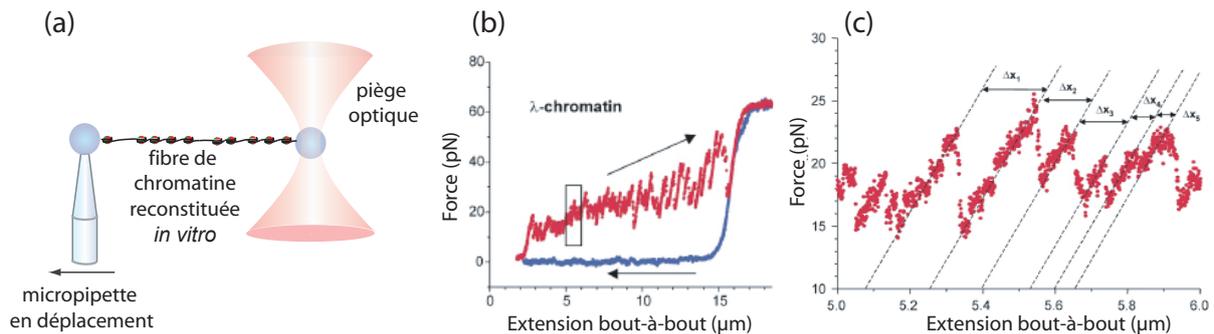


FIGURE 6.2 – (a) Schéma de principe de l'expérience réalisée. (b) Courbe force-extension typique : lorsqu'on augmente la force, l'extension de la molécule présente un profil en dent de scie irrégulier (en rouge), lorsqu'on rediminue la force, l'extension de la molécule diminue régulièrement comme le ferait une molécule d'ADN nue. (c) Zoom sur l'encadré de la figure (b). D'après (Bennink et al. (2001)).

6.1. RÉPONSE MÉCANIQUE D'UNE FIBRE DE NUCLÉOSOMES

Néanmoins, cette étude présente quelques faiblesses : elle ne permet pas directement d'avoir accès aux caractéristiques de détachement d'un unique nucléosome et propose ce détachement de 65 nm par des analyses plus globales. De plus, la reconstitution de la fibre de chromatine à partir de *Xenopus* peut éventuellement fournir une fibre plus complexe que prévue sur laquelle pourraient se fixer d'autres protéines non histoniques, ce qui compliquerait l'identification de la signature du décrochement d'un unique nucléosome. Une solution à ce problème a été proposée par l'équipe de M. Wang qui utilise cette fois un chapelet de nucléosomes dont la structure est entièrement contrôlée.

6.1.3 Réponse élastique d'une répétition régulière de nucléosomes

Le groupe de M. Wang étudie la dynamique de désassemblage d'un chapelet régulier de nucléosomes soumis à l'action d'une force de traction. Il positionne pour cela des octamères d'histones (purifiés à partir d'érythrocytes de poulet) sur un fragment d'ADN de 3684 pb, possédant 17 séquences positionnantes 5S RNA répétées en tandem (Brower-Toland et al. (2002)). Il utilise un dispositif de pinces optiques pour exercer une force de traction sur ce chapelet de nucléosomes (le dispositif est schématisé sur la figure 6.3(a)), cela lui permet de suivre l'extension bout-à-bout de la fibre en fonction de la force appliquée.

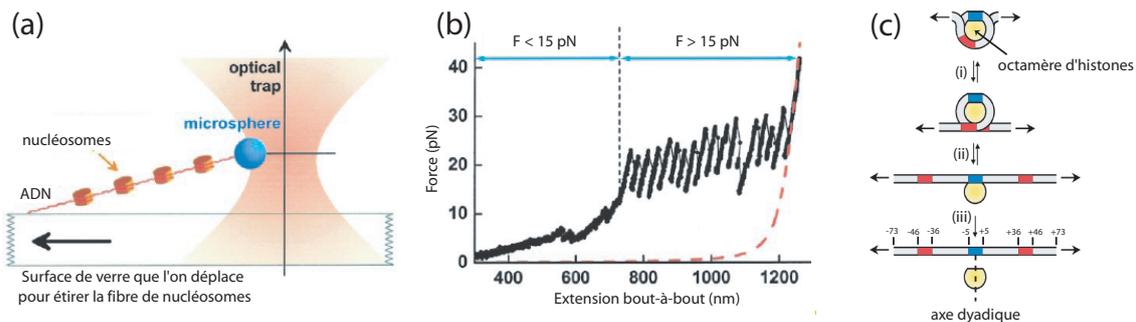


FIGURE 6.3 – (a) Schéma de principe de l'expérience du groupe de M. Wang. (b) Courbe typique obtenue pour un chapelet de 17 nucléosomes régulièrement positionnés sur un fragment d'ADN et représentant l'extension bout-à-bout de la fibre de nucléosomes en fonction de la force de traction appliquée. (c) Modèle en trois étapes proposé par ce groupe pour expliquer le détachement séquentiel d'un nucléosome : (i) détachement réversible des contacts ADN-histones de faible énergie situés entre les positions ± 46 et ± 73 pb par rapport au dyad, (ii) détachement à plus haute force ($F \geq 15$) des contacts ADN-histones situés entre ± 46 et ± 5 , (iii) rupture des derniers contacts ADN-histones et départ de l'octamère. D'après (Brower-Toland et al. (2002)).

Ce groupe observe deux régimes : à basse force (≤ 15 pN), la longueur de la fibre croît de manière continue. Ce régime est attribué au détachement simultané des fragments d'ADN nucléosomal situés entre ± 46 et ± 73 pb par rapport à l'axe dyadique (voir figure 6.3(b)), soit un détachement total de 76 pb par nucléosome. On parlera de la *boucle d'ADN nucléosomal extérieure* pour parler de ces bases-ci. Ces détachements sont réversibles : si on diminue la force, la fibre retrouve son extension initiale. A plus haute force (≥ 15 pN), on observe un profil périodique en dents de scie : ce régime correspond à la rupture soudaine des contacts ADN-histones plus robustes situés à ± 40 pb de l'axe dyadique. On parlera de la *boucle d'ADN nucléosomal intérieure* pour parler de ces bases-là. Ces détachements se font de manière discrète et correspondent au détachement de 82 pb de la surface de l'octamère. L'octamère ne tient alors

à l'ADN plus que par les bases comprises entre ± 5 pb par rapport au dyad, ce contact peut se rompre, l'octamère quitte alors l'ADN, empêchant définitivement le repliement de l'ADN autour de l'octamère lors d'une diminution ultérieure de la force (le modèle en trois étapes est schématisé sur la figure 6.3(c)).

Ce même groupe a renouvelé l'expérience avec des nucléosomes particuliers : dans un cas, il a ôté les queues non structurées des histones, dans un autre cas, il a acétylé ces mêmes queues (Brower-Toland et al. (2005)). L'absence des queues des histones de coeur entraîne une diminution de l'affinité des histones pour l'ADN : la boucle d'ADN nucléosomal extérieure est 60 % plus courte indiquant que se sont les queues des histones qui assurent en grande partie l'affinité de cette partie extérieure de l'ADN nucléosomal avec l'octamère d'histones, les forces nécessaires pour rompre la boucle intérieure sont plus faibles. L'acétylation des queues des histones permet de moduler l'affinité de l'ADN nucléosomal pour l'octamère d'histones : une augmentation du taux d'acétylation des queues des histones va de pair avec une diminution de l'affinité de l'ADN nucléosomal avec les octamères.

Cette expérience donne des informations très précises concernant le comportement d'une fibre de nucléosomes sous l'effet d'une force. On s'attend à ce que le départ des nucléosomes modifie la topologie de la molécule d'ADN dont les deux extrémités seraient fixées. Une information sur le comportement en torsion d'une telle fibre serait très pertinente et complèterait ces premiers résultats. Malheureusement, le dispositif en pince optique ne permet pas facilement d'appliquer une contrainte torsionnelle sur la fibre de chromatine, cette expérience a par contre été réalisée en pinces magnétiques par l'équipe de J.-L. Viovy.

6.1.4 Réponse en torsion d'une répétition régulière de nucléosomes

Jusqu'à présent, seule la réponse élastique des fibres de chromatine avait été sondée. L'équipe de J.-L. Viovy a complété cette étude par l'analyse de la réponse en torsion de fibres régulières de nucléosomes (Bancaud et al. (2006)), (Bancaud et al. (2007)).

A. Bancaud utilise pour cela un fragment d'ADN constitué de la répétition de 36 séquences 5S en tandem sur lesquelles sont positionnés des nucléosomes sans histone de liaison. Cette fibre régulière de nucléosomes est fonctionnalisée aux extrémités pour pouvoir d'une part, se lier à une surface de verre et, d'autre part, à une bille magnétique (voir Figure 6.4(a)) et l'intégrer ainsi à un dispositif de pinces magnétiques. Une force comprise entre 0,1 et 15 pN peut être appliquée à la fibre en déplaçant verticalement un couple d'aimants permanents placé au-dessus de l'échantillon, une contrainte de torsion peut être appliquée à la fibre en faisant tourner les aimants autour d'un axe vertical, ils entraînent ainsi la bille magnétique dans leur mouvement de rotation ce qui a pour effet de tordre la fibre de chromatine sur elle-même. Lorsque A. Bancaud tire sur une fibre de chromatine à force constante (7,7 pN), il observe des allongements successifs de 25 nm de la longueur bout-à-bout de la fibre, ce qui est cohérent avec ce qu'obtient M. Wang (Brower-Toland et al. (2002)) (voir figure 6.4(b)), ces allongements peuvent éventuellement être réversibles. Leur observation se fait ici à plus basse force (7,7 pN contre 15 pN pour M. Wang), certainement parce que ce groupe ne travaille pas dans les mêmes conditions ioniques que M. Wang et qu'il réalise ses expériences en présence de NAP-1 qui peut interagir avec les histones de coeur et sans doute faciliter leur départ de l'ADN (Bancaud et al. (2006)).

La réponse en torsion de la fibre de chromatine (Figure 6.4(c), courbes bleue et verte) est très différente de celle de l'ADN nu (Figure 6.4(c), courbe rouge). Pour réaliser cette comparaison, A. Bancaud enregistre, à basse force ($F \sim 0,5$ pN), l'extension bout-à-bout de la fibre en fonction du nombre de tours introduits par la rotation des aimants (courbe bleue), il provoque ensuite le départ des nucléosomes de la fibre en

6.1. RÉPONSE MÉCANIQUE D'UNE FIBRE DE NUCLÉOSOMES

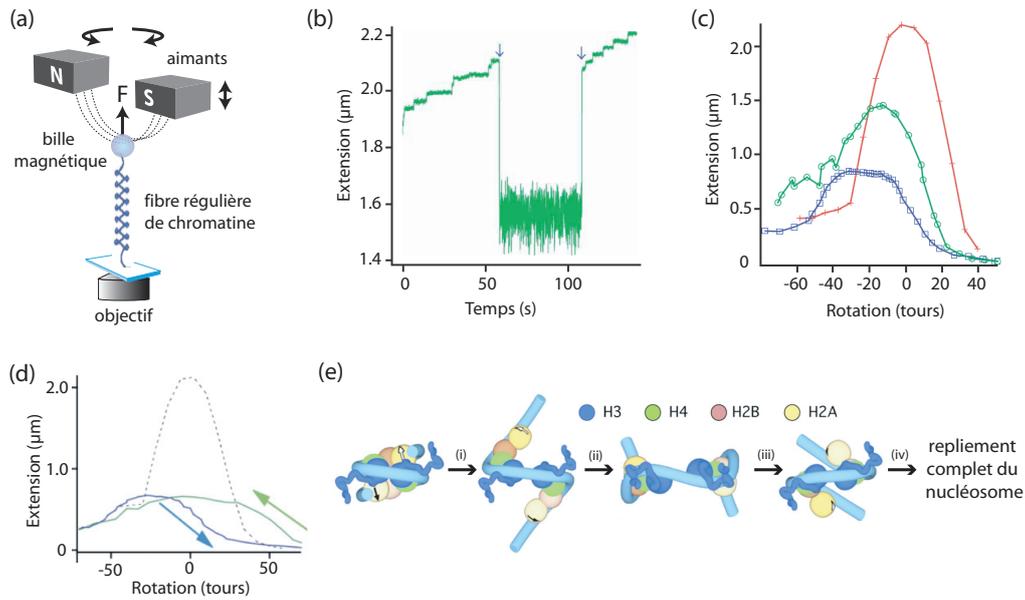


FIGURE 6.4 – (a) Schéma de principe de l'expérience. (b) Enregistrement temporel des détachements successifs des nucléosomes à force constante (7.7 pN). Entre les deux flèches, la force est temporairement portée à 0.67 pN . Un nucléosome se réattache durant cet intervalle de temps, montrant le caractère éventuellement réversible du détachement. (c) Courbes représentant l'extension des fibres en fonction de la rotation : pour une fibre de chromatine intacte (courbe bleue), pour l'ADN après départ de tous les nucléosomes (courbe rouge), pour une fibre intermédiaire après avoir éjecté quelques nucléosomes en tirant sur la fibre à 7.7 pN (courbe verte). (d) Courbes représentant l'extension d'une fibre de chromatine en fonction de la rotation. On applique à une fibre de chromatine sous-enroulée, un grand nombre de tours positifs (courbe bleue), lorsqu'on applique cette fois des tours négatifs, on observe un hystérésis de la courbe de réponse (courbe verte). La courbe en pointillée correspond à la réponse de l'ADN correspondant, lorsqu'on a ôté tous les nucléosomes de la fibre de chromatine initiale. C'est à partir de cette courbe qu'est défini le zéro de rotation. (e) Scénario envisagé pour expliquer l'hystérésis présenté en (d) : l'application d'une contrainte positive force les nucléosomes à modifier leur structure : (i) les deux dimères (H2A-H2B) se détachent de la surface du tétramère (H3-H4)₂, (ii) le tétramère central subit une transition chirale, (iii) les deux dimères (H2A-H2B), restés attachés à l'ADN, se réassocient au tétramère central, (iv) l'ADN nucléosomal finit de se réorganiser pour former le *réversome*. D'après (Bancaud et al. (2006)), (Bancaud et al. (2007)).

rinçant celle-ci avec de l'héparine, puis enregistre à nouveau une *courbe en chapeau* (courbe verte après le départ de quelques nucléosomes, courbe rouge après le départ de tous les nucléosomes). L'extension maximale de la fibre est plus petite que celle de l'ADN nu : la fibre est compactée du fait de la présence des nucléosomes. Les maxima de ces deux courbes sont décalés l'un par rapport à l'autre, indiquant que le départ d'un nucléosome modifie la topologie de la molécule d'ADN dont les deux extrémités sont fixes. A. Bancaud montre qu'une compaction de 50 nm de la fibre (correspondant à l'accrochage d'un nucléosome) correspond à un tour négatif ($\Delta L_k = -1$ par nucléosome). La courbe en chapeau obtenue pour la fibre est plus large et plus plate, la fibre de nucléosomes est plus flexible en torsion que ne l'est l'ADN nu : les auteurs suggèrent que ceci est le résultat d'un équilibre dynamique entre trois conformations distinctes du nucléosome, selon la façon dont sont croisés les ADN en entrée et en sortie de la particule de coeur (Bancaud et al. (2006)).

Si on impose maintenant un grand nombre de tours positifs à la fibre de chromatine (au delà d'une extension bout-à-bout de la molécule quasi nulle), puis que l'on revienne à la valeur de rotation initiale, on parcourt alors deux courbes en chapeaux qui ne se superposent plus (Figure 6.4(d), courbe bleue lorsqu'on impose des tours positifs, courbe verte lorsqu'on impose des tours négatifs). On observe un très net hystérésis (Bancaud et al. (2007)) qui révèle que la fibre a été capable d'emmagasiner un certain nombre de tours positifs lorsqu'elle parcourt la courbe verte. Ceci peut se faire en altérant la structure individuelle des nucléosomes, ceux-ci subissent alors une transition chirale pour former ce que les auteurs ont appelé le *réversome* (voir figure 6.4(e)). Dans cette structure, les deux dimères (H2A-H2B) se désolidarisent de la surface du tétramère (H3-H4)₂ tout en restant accrochés à l'ADN, le tétramère central subit alors une transition chirale et l'ensemble se réassemble pour former le *réversome*, structure du nucléosome qui a pu emmagasiner de la torsion positive.

Les pinces magnétiques montrent ici l'un de leur principal atout : la possibilité d'obtenir facilement une information en torsion sur les molécules analysées. Néanmoins, la réponse du substrat choisi reste, comme le montre ces études, très complexe du fait de la grande flexibilité (en traction et en torsion) d'une fibre aussi longue et contenant autant de nucléosomes. Même si ces études nous permettent d'avoir accès à des informations au niveau d'un seul nucléosome, il est tentant de vouloir procéder à une simplification du substrat en se limitant par exemple à un unique nucléosome précisément positionné sur un court fragment d'ADN. C'est ce qu'a proposé l'équipe de C. Bustamante.

6.1.5 Vers un système plus simple : le mononucléosome

L'équipe de C. Bustamante est allée vers un système plus simple pour obtenir des informations à l'échelle d'un unique nucléosome et se défaire de potentielles interactions nucléosome-nucléosome (Mihardja et al. (2006)).

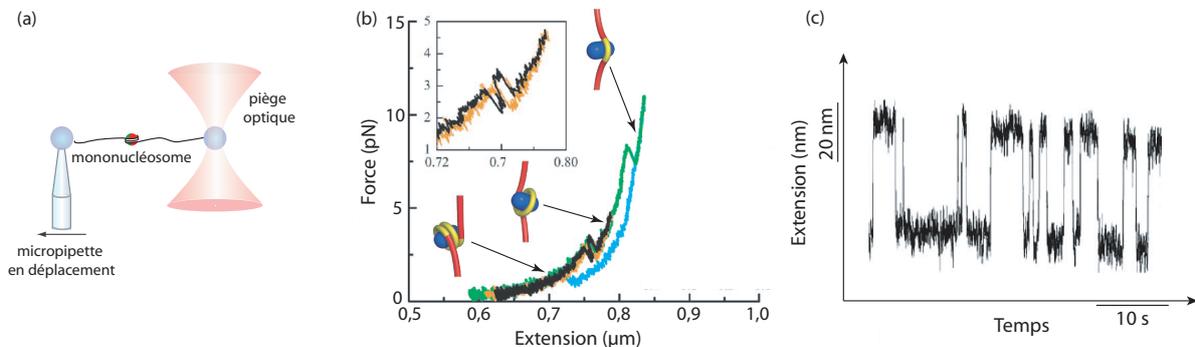


FIGURE 6.5 – (a) Schéma de principe de l'expérience. (b) Courbe force-extension typique d'un mononucléosome. Les courbes noire et verte correspondent à un étirement de la fibre, les courbes orange et bleu correspondent à une relaxation de la fibre. (c) Signaux *télégraphiques* correspondant à l'enregistrement, à force constante au voisinage de la première transition, de l'extension bout-à-bout de la molécule en fonction du temps.

Le groupe utilise un fragment d'ADN de 3547 pb contenant une séquence positionnante (la séquence 601 de J. Widom) au niveau de laquelle se positionne un nucléosome. Par un dispositif de pinces optiques, il applique une force sur le substrat et suit son extension bout-à-bout (voir figure 6.5(a)). Lorsqu'il étire

puis relaxe le substrat, deux transitions notoires apparaissent (voir figure 6.5(b)) : le premier enroulement d'ADN nucléosomal autour de l'octamère se détache vers 2-3 pN et a un comportement dynamique : si on se maintient à une force constante proche de la transition, on observe un signal de type *télégraphique* (voir figure 6.5(c)) résultant du décrochage puis de l'accrochage réversible de ce premier enroulement d'ADN. La deuxième transition se produit à 8-9 pN et ne présente pas ce caractère dynamique, on l'attribue au détachement du deuxième enroulement d'ADN nucléosomal de la surface de l'octamère. Ces transitions sont sensibles aux conditions ioniques : si on augmente la force ionique du tampon, la transition à basse force est toujours réversible mais les signaux ne présentent plus deux niveaux clairs comme précédemment : l'augmentation de la force ionique a diminué la coopérativité du processus de détachement et d'attachement du premier enroulement d'ADN. La seconde transition est moins perturbée, elle apparaît simplement à des forces moindres.

6.2 Premières expériences faites sur des facteurs de remodelage de la chromatine, à l'échelle de la molécule unique

Les dispositifs de visualisation et de micromanipulation se prêtent bien à l'étude des facteurs de remodelage de la chromatine. Plusieurs expériences ont été réalisées jusqu'alors, sondant leurs activités soit sur l'ADN nu, soit sur des fibres de chromatine. Ces études ont presque exclusivement porté sur des complexes de la sous-famille Swi2/Snf2, à savoir RSC et ySWI/SNF.

6.2.1 Activité des facteurs de remodelage de la chromatine, sondée par des techniques d'AFM conventionnelles

Plusieurs études en AFM ont été réalisées avec des facteurs de remodelage de la chromatine sur des fragments d'ADN nus ou des fibres de chromatine (Schnitzler et al. (2001)), (Montel et al. (2007)), (Lia et al. (2008)) : la réaction de remodelage est menée en solution, les molécules remodelées sont ensuite déposées sur des surfaces afin d'être imagées. On compare ensuite différentes molécules avant et après remodelage et on attribue les éventuelles différences observées, à l'action des facteurs de remodelage. Présentons l'un des résultats les plus récents obtenus, à savoir le suivi de l'activité du complexe SWI/SNF par l'équipe de C. Faivre-Moskalenko.

F. Montel a utilisé l'AFM sur de courts fragments d'ADN (255 ou 356 pb) sur lesquels se trouvait un nucléosome positionné précisément (grâce à la présence d'une séquence 601). Il étudie d'une part, la différence de structure du nucléosome lorsque celui-ci contient des variants d'histones et il sonde, d'autre part, l'activité de remodelage de SWI/SNF (Montel et al. (2007)). Pour ces deux analyses, il mesure à la fois le positionnement précis du nucléosome (ΔL représente la position du nucléosome par rapport au centre de la séquence d'ADN) et la longueur d'ADN organisée autour de l'octamère (L_c) et trace les histogrammes à deux dimensions $L_c/\Delta L$.

6.2.1.1 Perturbations de la structure interne du nucléosome en présence de variants d'histones

F. Montel met en évidence le fait que les nucléosomes contenant le variant H2A.Bbd organisent moins d'ADN nucléosomal autour de leur coeur d'histones : ses données suggèrent que ~ 10 pb d'ADN à l'entrée et à la sortie de la particule de coeur sont détachées de la surface de l'octamère, formant ainsi une structure plus labile qu'en l'absence de variants. La technique utilisée ici permet donc l'accès à des informations très

6.2. PREMIÈRES EXPÉRIENCES FAITES SUR DES FACTEURS DE REMODELAGE DE LA CHROMATINE, À L'ÉCHELLE DE LA MOLÉCULE UNIQUE

finer sur la structure du nucléosome et permet d'en déduire des paramètres pertinents, comme une estimation de l'énergie de stabilisation du nucléosome (rapporté à un site de contact ADN-histones, qui sont au nombre de 14 pour un nucléosome conventionnel) : $E_{stab/site} = -0.479 \pm 0.045 k_B T$ pour les nucléosomes conventionnels, et $E_{stab/site} = -0.33 \pm 0.022 k_B T$ pour les variants.

6.2.1.2 Activité de remodelage de SWI/SNF

Concernant l'activité de SWI/SNF, il construit les mêmes histogrammes ($L_c/\Delta L$) en présence des mononucléosomes et de SWI/SNF, d'abord sans ATP (figure 6.6(c)) puis avec ATP après 20 min (figure 6.6(d)) et avec ATP après 1h (figure 6.6(e)). Partant d'un état α correspondant aux histones canoniques avant toute réaction, on voit apparaître plusieurs nouveaux types de complexes au cours du temps : un état β correspondant à des nucléosomes positionnés comme en α mais qui ont plus d'ADN complexés autour de l'octamère, cet état pourrait correspondre à la capture d'une boucle de 40 pb à l'intérieur de la particule de coeur sous l'action de SWI/SNF. Un état γ correspond à des nucléosomes qui ont glissé à une extrémité du fragment d'ADN, ils ont également un peu moins d'ADN autour de leur octamère. Un état δ correspond à des nucléosomes avec très peu d'ADN complexé ($L_c \sim 75$ pb), F. Montel associe cet état à des nucléosomes de l'état γ ayant perdu un enroulement d'ADN autour de leur particule de coeur.

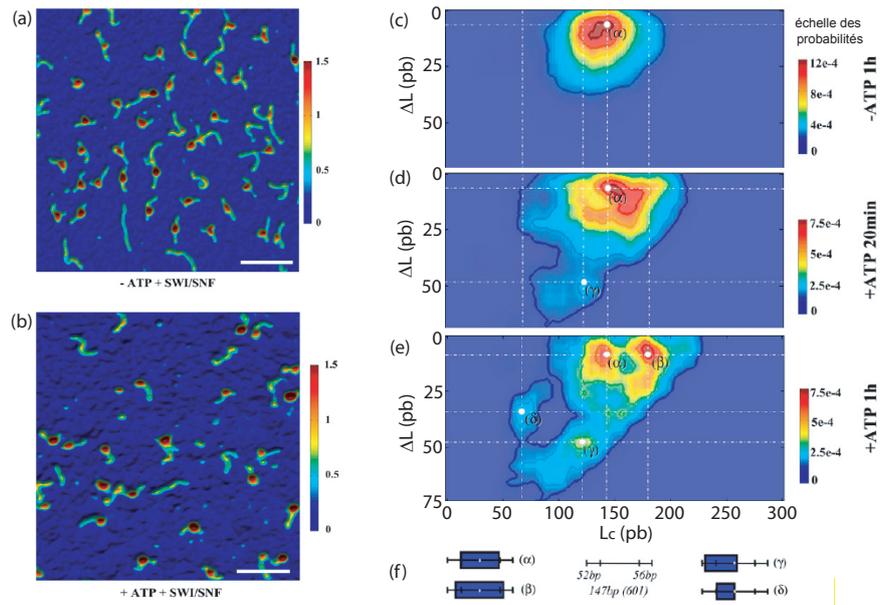


FIGURE 6.6 – Images en AFM des mononucléosomes positionnés sur un fragment de 255 pb contenant la séquence 601, incubés pendant 1 h à 29°C avec SWI/SNF (a) sans ATP, (b) avec ATP. L'échelle des couleurs varie de 0 à 1.5 nm. La barre des échelles en X et Y vaut 150 nm. Evolution de l'histogramme $\Delta L/L_c$ au cours de l'activité de remodelage de SWI/SNF. (c) Histogramme obtenu après 1h d'incubation des mononucléosomes avec SWI/SNF sans ATP, (d) avec ATP et 20 min d'incubation, (e) avec ATP et 1h d'incubation. (d) Représentation schématique des quatre états α , β , γ et δ positionnés sur les histogrammes 2D. D'après (Montel et al. (2007)).

L'interprétation que donne l'équipe est la suivante : comme on n'observe pas, durant l'activité de remo-

delage, un accroissement de positions intermédiaires occupées par le nucléosome ($20 \text{ pb} \leq \Delta L \leq 40 \text{ pb}$), il est probable que SWI/SNF déplace directement le nucléosome d'une position centrale vers une extrémité du fragment d'ADN. Soit SWI/SNF est un moteur très processif et on observe donc directement le nucléosome en la position la plus éloignée qu'il puisse atteindre sur le fragment d'ADN, soit SWI/SNF est très peu processif et effectue un pas élémentaire de l'ordre de 50 pb, entraînant, en une étape, le nucléosome à l'extrémité de l'ADN. Une dernière hypothèse serait d'imaginer que SWI/SNF ne fait que déstabiliser l'octamère et que celui, par diffusion, irait se positionner dans la configuration la plus stable thermodynamiquement, à savoir à l'extrémité du fragment d'ADN.

Bien que les résultats obtenus soient d'un grand intérêt, plusieurs limitations de l'approche peuvent être soulignées : les fragments sont très courts, il n'est pas exclu qu'il y ait un biais dans les expériences du fait de la proximité des extrémités d'ADN ; les fragments ne sont pas orientés donc une information manque sur la directionnalité du déplacement des nucléosomes ; l'étude de la dynamique de l'activité de remodelage passe par une étude statique de l'expérience à différents temps (0 min, + 20 min, et + 60 min). Cela ne donne qu'une information sur les quelques intermédiaires capturés sur les images. Si les durées sur lesquelles se fait l'activité de remodelage sont très courtes, il est difficile de réorganiser les différents intermédiaires observés entre eux pour en proposer une séquence temporelle d'apparition. Pour l'étude de la dynamique des complexes, on peut d'abord envisager de faire de l'AFM en solution, ou, encore mieux, d'avoir recours à des expériences de micromanipulation.

6.2.2 L'AFM en liquide permet de suivre l'activité de remodelage sur une même molécule

L'équipe de Lohr étudie également l'activité de remodelage de la chromatine par le complexe SWI/SNF, mais elle utilise une technique d'AFM en solution (Wang et al. (2004)), (Wang et al. (2005)). Elle prépare des fibres de chromatine *in vitro* contenant environ 4 nucléosomes positionnés de manière irrégulière. Elle pré-incube ces fibres avec hSWI/SNF dans des conditions inactives (i.e. sans ATP), dépose l'ensemble sur une surface de mica et image cet échantillon de chromatine, à l'intérieur d'une cellule microfluidique, grâce à un microscope à force atomique. Les nucléosomes sont immobiles sur la surface de mica alors que l'ADN est libre de bouger. Afin d'activer les complexes hSWI/SNF, de l'ATP est injecté dans la cellule et, après 30 min, l'échantillon de chromatine est à nouveau imagé. Cette technique présente plusieurs intérêts : (i) la déposition et l'imagerie des échantillons de chromatine se fait en phase liquide, on évite ainsi les problèmes de déshydratation de l'échantillon qui pourraient venir modifier l'allure des fibres de chromatine déposées, (ii) on est capable d'imager les mêmes molécules avant et après ajout d'ATP et donc de suivre l'activité de remodelage à l'échelle d'une unique molécule. Ceci est très différent des techniques classiques d'AFM où on étudie différentes molécules avant et après remodelage et on attribue les différences observées entre ces deux populations à l'activité de remodelage. Ce travail a permis de mettre en évidence des réarrangements significatifs et très hétérogènes des fibres de chromatine après ajout d'ATP : ces changements peuvent correspondre à des déplacements d'ADN ou de nucléosomes, au transfert d'un ADN vers une fibre voisine, au détachement d'un tour d'ADN nucléosomal de la surface de l'octamère d'histones... Ces changements peuvent être de grande ampleur et sont extrêmement variés. Les auteurs essaient de regrouper les différentes altérations subies en groupes pour les caractériser plus précisément. Cette étude reste néanmoins qualitative et ce pour plusieurs raisons : il est très difficile d'identifier les différentes molécules imagées (nucléosomes, SWI/SNF, BSA...), les altérations observées sont très hétérogènes et se font à grande échelle, la surface sur laquelle sont fixés les nucléosomes peut venir perturber l'expérience, il faut un certain temps pour imager chaque molécule, temps pendant lequel le complexe peut continuer d'agir... Cette étude confirme néanmoins que SWI/SNF altère la structure d'une fibre de chromatine et illustre un

6.2. PREMIÈRES EXPÉRIENCES FAITES SUR DES FACTEURS DE REMODELAGE DE LA CHROMATINE, À L'ÉCHELLE DE LA MOLÉCULE UNIQUE

certain nombre de changements qui sont liés à cette activité de remodelage. Maintenant, pour suivre effectivement la dynamique de cette activité, les techniques de micromanipulation s'imposent naturellement.

6.2.3 Un suivi en temps réel s'impose comme la meilleure alternative pour suivre la dynamique de l'activité de remodelage de ces facteurs

6.2.3.1 Le facteur de remodelage RSC forme des boucles d'ADN sur un substrat d'ADN nu

Au début de ma thèse, nous nous sommes intéressés à l'activité du facteur de remodelage de la chromatine γ RSC, de la famille Swi2/Snf2, sur un substrat d'ADN nu. Cette étude a été réalisée conjointement par G. Lia et moi-même : les résultats sont détaillés à la fois dans son manuscrit de thèse (Lia (2005)) et dans l'article paru à ce sujet (Lia et al. (2006)) (voir Annexe B). Nous allons nous contenter ici de rappeler nos principales observations.

Dans cette étude, l'activité de γ RSC n'a été testé que sur l'ADN nu. Ce substrat n'est pas le substrat naturel de cette enzyme. Néanmoins, il s'agit là d'une première investigation incontournable avant de tester son activité sur un substrat nucléosomal, donc plus complexe. Il nous permettra en effet de distinguer les signaux dus à des interactions ADN-protéines de ceux dus aux interactions nucléosomes-protéines.

On étudie l'activité de γ RSC, en pinces magnétiques, sur une molécule d'ADN nue (sensible ou insensible à la torsion), en faisant varier différents paramètres tels que la force, la concentration en ATP, le degré de surenroulement de la molécule d'ADN (dans le cas où celle-ci ne présente pas de *nick*).

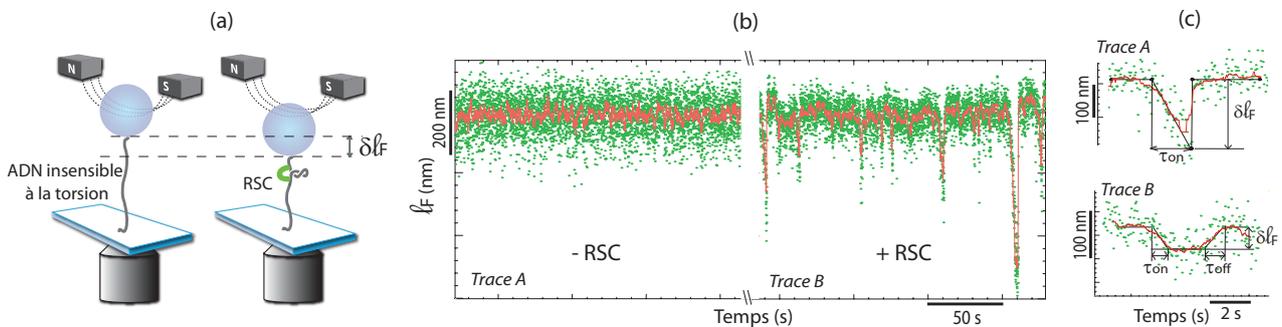


FIGURE 6.7 – (a) Schéma de principe de l'expérience. (b) Suivi de l'extension bout-à-bout d'une molécule d'ADN insensible à la torsion, à $F \sim 0.3$ pN et $100 \mu\text{M}$ ATP, en l'absence de RSC (Trace A) et en présence de RSC (Trace B). Les données brutes correspondent aux données vertes, les données rouges correspondent au signal brut moyenné sur 1 s. (c) Détail de deux événements de raccourcissement par RSC. L'ajustement polygonal (noir) des données moyennées (rouge) permet de déduire les valeurs de τ_{on} , τ_{off} et $\delta\ell_F$. La trace A montre un raccourcissement progressif de l'extension de l'ADN suivi d'une très courte pause avant un retour très rapide à l'extension initiale. La trace B montre un raccourcissement puis un allongement ayant des durées très similaires et entre lesquelles a lieu une pause de durée significative ($\sim 2\text{s}$).

On suit l'extension bout-à-bout d'une molécule d'ADN de $1.2 \mu\text{m}$ de long, insensible à la torsion, et sur laquelle on applique une force verticale de 0.3 pN (Figure 6.7(a)). En présence de γ RSC et d'ATP, l'extension de la molécule subit des réductions de longueur transitoires, ayant une taille moyenne de ~ 310

6.2. PREMIÈRES EXPÉRIENCES FAITES SUR DES FACTEURS DE REMODELAGE DE LA CHROMATINE, À L'ÉCHELLE DE LA MOLÉCULE UNIQUE

bp, à 0.3 pN et 100 μ M ATP (Figure 6.7(b), Trace B). On appelle τ_{on} (resp. τ_{off}) le temps de décroissance (resp. croissance) de l'extension de l'ADN pour chacun de ces évènements (Figure 6.7(c)). La taille de ces réductions croît avec la concentration en ATP, tandis que les temps τ_{on} et τ_{off} décroissent. Ceci suggère que ces réductions de longueur soient le résultat de la translocation du complexe RSC sur l'ADN : celui-ci aurait un point de fixation sur l'ADN et "pomperait" une boucle d'ADN en faisant progresser un deuxième point de contact le long de l'ADN. Les raccourcissements de longueur de l'ADN peuvent se résorber de deux manières : soit l'extension de la molécule retrouve "instantanément" sa longueur initiale (Figure 6.7(c), Trace A), soit elle retrouve sa longueur initiale en un temps τ_{off} similaire à τ_{on} (Figure 6.7(c), Trace B). Ce dernier cas suggère que la translocation de RSC sur l'ADN puisse être réversible : le complexe RSC peut changer de direction de translocation et défaire activement la boucle d'ADN. Notons enfin que la force affecte la formation de la boucle : aucune boucle n'a été observée au-delà de 3 pN, ceci suggère que la force contre laquelle le moteur doit travailler pour former une boucle d'ADN limite la processivité de l'enzyme (la taille des boucles décroît exponentiellement avec la force).

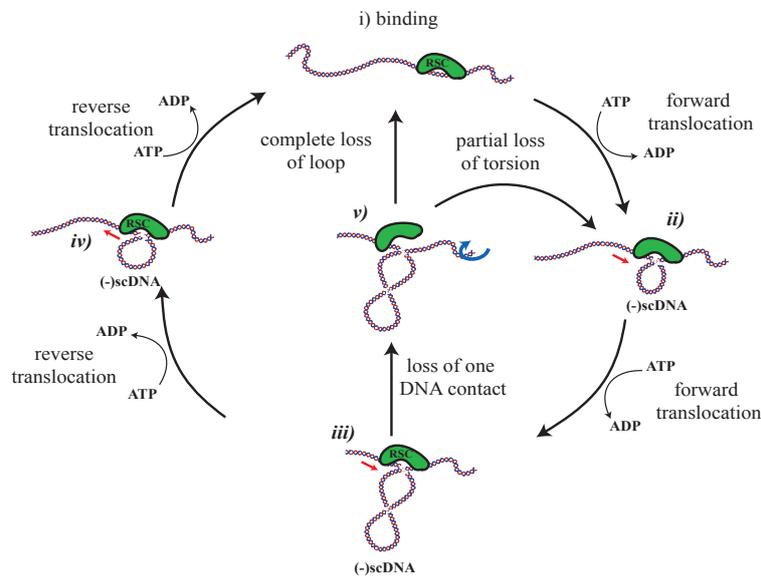


FIGURE 6.8 – Modèle de translocation de RSC sur l'ADN nu. Pour former une boucle d'ADN, RSC doit au moins avoir deux points de contact avec l'ADN. Si l'un de ces contacts est capable de se transloquer sur l'ADN tandis que l'autre reste fixe, l'ADN peut être "pompe" et former une boucle (flèches rouges) en présence d'ATP (passages (i) \rightarrow (ii) \rightarrow (iii)). Une fois formées, ces boucles d'ADN se résorbent majoritairement d'une manière ATP-dépendante qui pourrait correspondre à une translocation dans la direction inverse (passages (iii) \rightarrow (iv) \rightarrow (i)). Parfois, la boucle disparaît très rapidement : cela pourrait se produire à chaque fois que l'un des deux contacts avec l'ADN est rompu (passages (iii) \rightarrow (v) \rightarrow (i)). Dans cette dernière situation, il est possible que le contact se forme à nouveau à une autre position le long de l'ADN permettant ainsi à ce qu'une certaine quantité de contrainte de torsion, accumulée dans la boucle, soit relaxée. D'après (Lia et al. (2006)).

Des études complémentaires sur des molécules sensibles à la torsion, complétées par des expériences en volume, montrent que de la torsion négative est générée à l'intérieur de la boucle d'ADN formée. Par contre, le nombre de tours introduits dans le cas de l'ADN surenroulé positivement ou négativement, diffère : ceci peut être dû à un phénomène de relaxation partiel (*slippage*) du degré de surenroulement de la boucle

formée, phénomène dont l'amplitude pourrait dépendre de la topologie de l'ADN. Nous avons proposé un modèle de translocation de RSC sur l'ADN qui permet d'expliquer les différents types de signaux obtenus (Figure 6.8).

RSC est donc capable de former des boucles et d'introduire de la torsion dans une molécule d'ADN, il s'agit d'autant de moyens dont il peut disposer pour déplacer l'ADN de la surface des octamères d'histones et altérer ainsi la structure de la chromatine. Cette étude préliminaire sur un substrat d'ADN nu, nécessite d'être à présent enrichie par une étude similaire sur des fibres de chromatine. L'équipe de C. Bustamante a proposé un travail de ce type.

6.2.3.2 Les complexes RSC et SWI/SNF forment de larges boucles d'ADN sur un substrat nucléosomal

Pour compléter l'étude précédente, l'équipe de C. Bustamante a analysé l'activité des complexes RSC et SWI/SNF sur un substrat nucléosomal (Zhang et al. (2006)). Ce groupe manipule, à l'aide de pinces optiques, une molécule d'ADN contenant 4 ou 6 répétitions de la séquence 601 et sur laquelle sont positionnés quelques nucléosomes, et elle suit son extension bout-à-bout (voir figure 6.9(a)). L'expérience se conclut systématiquement par l'éjection complète des nucléosomes par application d'une force pour vérifier, *a posteriori*, le nombre de nucléosomes présents sur le substrat. Il travaille à force constante avec une force supérieure à 3 pN (dans ces conditions, il n'observe pas d'activité de ces deux complexes sur l'ADN nu, toute activité observée sera donc liée à la présence du nucléosome). L'ajout de SWI/SNF ou de RSC, en présence de 1 mM ATP, à la fibre de chromatine entraîne des réductions transitoires de son extension (voir figure 6.9(b)). Ces réductions peuvent aller de 20 pb à 1200 pb et le retour à l'extension initiale peut soit se faire de manière brutale, soit progressivement ; elles ont une durée de vie assez courte (≈ 15 s en moyenne) et leur formation est ATP-dépendante (vitesse moyenne de translocation : 12 pb/s). Il attribue ces événements à la formation d'une boucle d'ADN, initiée au niveau d'un nucléosome, et générée par la translocation processive des FaRC sur l'ADN. Il a sondé cette activité ATP-dépendante à plus haute force : jusqu'à 7 pN, le comportement est le même, cependant la fréquence de ces événements est moindre. Au delà de 7 pN, on déstabilise fortement le nucléosome qui se détache rapidement. Pour étudier la force maximale contre laquelle ces complexes peuvent travailler, le groupe travaille cette fois-ci à extension constante : la formation d'une boucle entraîne une augmentation de la force vue par le complexe : la force maximale contre laquelle il peut agir est de 12 pN.

Le groupe de C. Bustamante présente un modèle, cohérent avec ces résultats, proposant un mécanisme de remodelage basé sur la formation puis la propagation d'une large boucle d'ADN, initiée au niveau d'un nucléosome (voir Figure 6.9(c)) : le facteur de remodelage commencerait par se fixer sur la particule de coeur du nucléosome et son domaine de translocation se lierait à l'ADN proche de l'axe dyadique initiant la formation d'une petite boucle (passage de l'état (ii) à l'état (iii)). La poursuite de la translocation du complexe le long de l'ADN permettrait la formation d'une boucle plus importante à l'intérieur du nucléosome (état (iv)). Cette boucle pourrait se résorber de différentes façons : le domaine de translocation lié à l'ADN pourrait se détacher ce qui permettrait à la boucle de disparaître instantanément sans que la position du nucléosome soit modifiée (passage de (iv) à (iii)), l'activité de translocation pourrait changer de direction ce qui permettrait également le passage de l'état (iv) à l'état (iii) mais avec un retour plus lent (vitesse voisine de 12 pb/s), une dernière alternative serait que la boucle relaxe par l'autre extrémité de l'ADN contenu dans la particule de coeur (passage de (iv) à (v)) ce qui aurait pour effet le glissement du nucléosome par rapport à l'ADN.

6.2. PREMIÈRES EXPÉRIENCES FAITES SUR DES FACTEURS DE REMODELAGE DE LA CHROMATINE, À L'ÉCHELLE DE LA MOLÉCULE UNIQUE

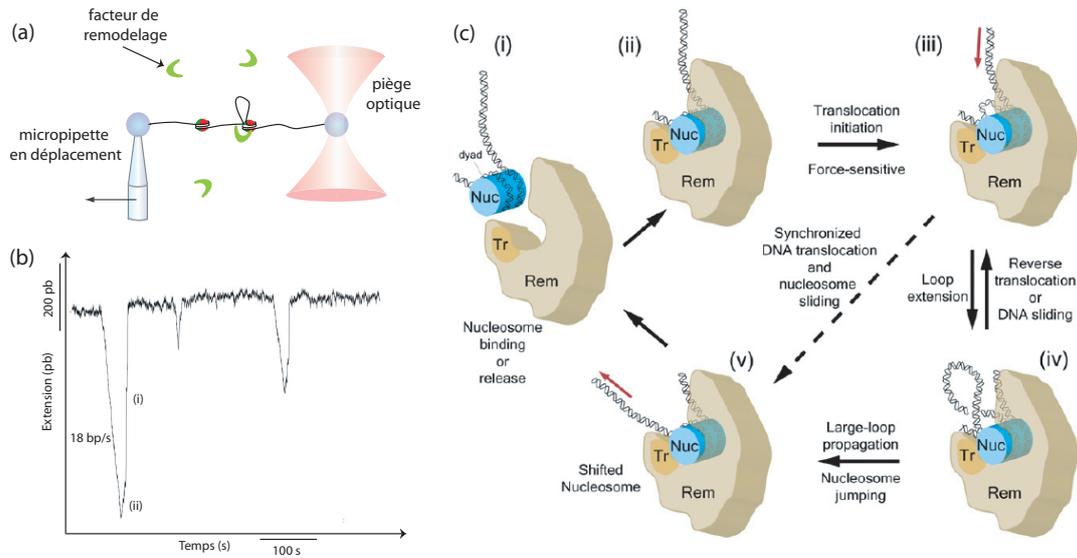


FIGURE 6.9 – (a) Schéma de principe de l'expérience. (b) Courbe typique représentant l'extension bout-à-bout de la fibre de chromatine en fonction du temps en présence du complexe SWI/SNF et de 1 mM ATP. (c) Modèle proposé pour l'activité de remodelage par les complexes Swi2/Snf2. D'après (Zhang et al. (2006)).

Ce modèle est à la fois cohérent avec les résultats obtenus par ce groupe et avec des résultats de biochimie montrant que les complexes de type Swi2/Snf2 peuvent augmenter l'accessibilité à l'ADN nucléosomal. Ceci peut effectivement se faire de deux manières, autorisées par le modèle proposé ci-dessus : soit l'octamère d'histones glisse le long de l'ADN (passage de (iv) à (v)), soit une boucle d'ADN (de plus de 20 pb) est formée de manière dynamique à l'intérieur de la particule de coeur (états (iii) ou (iv)).

Ces résultats présentent des différences par rapport à ceux établis par nos soins (les valeurs des vitesses, la processivité, la force à laquelle on observe les signaux différents). Plusieurs raisons peuvent être invoquées : dans le cas de l'expérience de C. Bustamante, les complexes pourraient reconnaître un trait spécifique aux nucléosomes (et que ne posséderait pas l'ADN nu) et y associer une activité de translocation spécifique dont les paramètres (vitesse, processivité,...) seraient différents de ceux déterminés pour l'ADN nu ; les conditions ioniques, différentes dans les deux expériences, pourraient également expliquer quelques écarts. Malgré l'apport significatif de ces résultats dans la compréhension du mécanisme de remodelage par les complexes SWI/SNF, deux principaux éléments échappent à leur étude : leur dispositif ne permet pas un accès facile à une information en torsion qui pourrait venir conforter ces prédictions ; d'autre part, les informations collectées ne permettent pas de mesurer un éventuel déplacement relatif des nucléosomes par rapport au fragment d'ADN sur lequel ils sont positionnés. Un substrat astucieux a permis de résoudre ce second point, c'est l'expérience que nous allons décrire maintenant.

6.2.3.3 Le complexe SWI/SNF ne modifie pas la structure globale d'un nucléosome et repositionne celui-ci sur l'ADN, avec un déplacement typique de 28 pb

Grâce à l'utilisation d'un dispositif de pinces optiques, l'équipe de M. Wang sépare les deux brins d'une molécule d'ADN double brin sur laquelle a été positionné un unique nucléosome au niveau d'une séquence 601 (voir figure 6.10(a)) (Shundrovsky et al. (2006)). Ce substrat lui permet de déterminer la position précise

6.2. PREMIÈRES EXPÉRIENCES FAITES SUR DES FACTEURS DE REMODELAGE DE LA CHROMATINE, À L'ÉCHELLE DE LA MOLÉCULE UNIQUE

du nucléosome sur le fragment d'ADN et de sonder la robustesse des interactions ADN-histones à l'intérieur d'un nucléosome unique. En plaçant ce substrat en présence de SWI/SNF et d'ATP, on peut espérer répondre à plusieurs questions : est ce que l'activité de remodelage produit une altération persistante de la structure du nucléosome ? quelle est la directionnalité du déplacement éventuel du nucléosome ? quelle est la distance caractéristique de ce déplacement ? quelle durée est nécessaire pour que le remodelage ait lieu ?

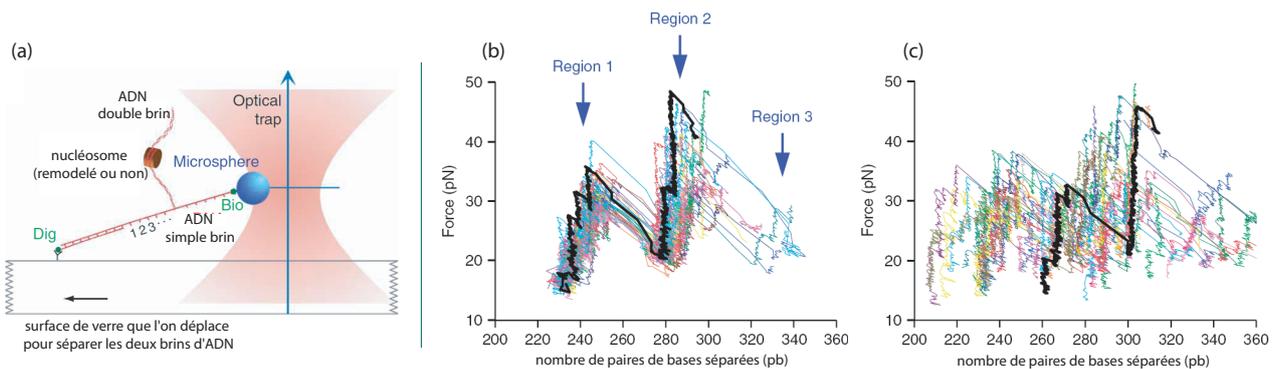


FIGURE 6.10 – (a) Schéma de principe de l'expérience. Séparation des deux brins d'une molécule d'ADN en présence d'un mononucléosome. (b) Force nécessaire à la séparation des brins en fonction du nombre de paires de bases séparées dans le cas d'un nucléosome non remodelé. (c) Même représentation dans le cas d'un nucléosome ayant subi au préalable l'action de remodelage de SWI/SNF en présence d'ATP. D'après (Shundrovsky et al. (2006)).

Le groupe tire d'abord sur de l'ADN nu, la force nécessaire pour séparer les deux brins d'ADN est voisine de 15 pN et dépend de la séquence ce qui entraîne de légères fluctuations autour de cette valeur. Un nucléosome, positionné sur l'ADN, rend plus difficile la séparation des deux brins : au niveau du nucléosome, on rompt les liaisons ADN-histones de manière séquentielle et les forces mises en jeu sont plus importantes que dans le cas de la séparation des deux brins d'ADN. La signature du départ du nucléosome est très reproductible : trois régions, pour lesquelles l'interaction ADN-histones est forte, sont précisément détectées sur le fragment d'ADN (voir figure 6.10(b)). La seconde région est celle où l'interaction est la plus forte et correspond à l'interaction entre l'ADN et les histones H3 et H4 au niveau du dyad du nucléosome. Les première et troisième régions de forte interaction se situent à environ 50 bp de part et d'autre du dyad et sont probablement dues aux interactions entre (H2A-H2B) et l'ADN. On retrouve les trois zones de fortes interactions déjà identifiées dans l'expérience présentée au paragraphe 6.1.3 (Brower-Toland et al. (2002)), ou dans des études cristallographiques (Luger and Richmond (1998a)).

Le groupe fait ensuite agir SWI/SNF en présence d'ATP sur ces substrats contenant un nucléosome avant de les introduire dans la chambre microfluidique et de procéder à nouveau à la séparation des brins de l'ADN grâce au dispositif de pinces optiques. La signature du détachement du nucléosome présente encore la même allure (présence de trois régions de plus forte interaction ADN-histones, nombre de bases d'ADN entre ces régions et forces mises en jeu pour rompre ces interactions identiques). Le groupe en déduit que SWI/SNF, dans leurs conditions expérimentales, ne perturbe pas la structure globale du nucléosome après remodelage. La conséquence majeure de l'action de SWI/SNF est le déplacement bidirectionnel du nucléosome par rapport à sa position initiale sur la séquence 601 (voir figure 6.10(c)), le nombre de nucléosomes effectivement déplacés par rapport à la position initiale augmente avec la concentration de SWI/SNF et

6.2. PREMIÈRES EXPÉRIENCES FAITES SUR DES FACTEURS DE REMODELAGE DE LA CHROMATINE, À L'ÉCHELLE DE LA MOLÉCULE UNIQUE

avec des temps de réaction plus longs (\gg 1 min).

Cette expérience fournit des informations essentielles concernant le produit de remodelage d'un nucléosome par le facteur SWI/SNF : celui-ci présente la même structure globale qu'un nucléosome intact, en particulier, l'action de SWI/SNF n'a pas entraîné la perte de dimères H2A-H2B. Le déplacement du nucléosome par rapport à sa position d'origine se fait dans les deux directions : le complexe SWI/SNF peut donc se lier dans n'importe quelle direction par rapport à l'ADN. Cette étude ne permet pas par contre d'isoler d'éventuels intermédiaires de réaction lors de l'activité de remodelage de SWI/SNF et ne permet donc pas de préciser le mécanisme responsable du déplacement de nucléosome (formation d'une boucle ? autre scénario ?).

Chapitre 7

Les motivations de ce travail de thèse

Sommaire

7.1	Elargissement du champ d'investigation des études en molécules uniques . . .	116
7.2	Préparation contrôlée d'un substrat mono-nucléosomal	116

Les chapitres précédents permettent d'avoir une vue d'ensemble de l'état des connaissances actuelles concernant la structure de la chromatine et le mode d'action des facteurs de remodelage. Les expériences de biochimie, associées à celles de visualisation et de micromanipulation de molécules uniques, ont permis de fournir une quantité de détails sur ces deux grands thèmes. Néanmoins, on est encore loin de pouvoir décrire précisément la façon dont les facteurs de remodelage agissent sur la structure de la chromatine. L'expérience proposée par C. Bustamante, présentée au paragraphe 6.2.3.2, est sans doute celle qui propose le mécanisme le plus complet. Néanmoins, des éléments manquent cruellement à cette étude et beaucoup de questions restent en suspens. L'ensemble des expériences réalisées jusqu'à présent nous a conduit à travailler dans deux principales directions que nous motivons ici.

7.1 Elargissement du champ d'investigation des études en molécules uniques

La très grande majorité des études faites, en molécules uniques, sur des facteurs de remodelage de la chromatine concernent les membres de la famille Swi2/Snf2. Il nous a semblé intéressant d'élargir cette étude à d'autres familles, c'est ce qui a guidé la première thématique développée au cours de cette thèse et que je présente dans la troisième partie de ce manuscrit. Nous avons principalement étudié deux nouveaux complexes sur l'ADN nu : γ ISW1a, membre de la famille Iswi (Chapitre 8) et γ CHD1, membre de la famille Nurd/Mi-2/Chd (Chapitre 9). Leur étude nous a permis de révéler des différences de comportement significatives sur lesquelles nous revenons au Chapitre 10.

7.2 Préparation contrôlée d'un substrat mono-nucléosomal

L'étude que nous avons faite de l'activité de RSC sur l'ADN nu (Lia et al. (2006)) est très similaire à celle menée par C. Bustamante sur un substrat nucléosomal (Zhang et al. (2006)), pourtant les résultats sont très différents. Ces deux études montrent que RSC est capable de former de larges boucles d'ADN, en présence d'ATP. Nous avons montré que RSC se transloque le long de l'ADN nu avec une vitesse moyenne de l'ordre de 200 pb/s et forme des boucles dont la taille moyenne est de l'ordre de 310 pb (à 0.3 pN et 100 μ M

ATP) et la durée de formation, de l'ordre de la seconde. La taille de ces boucles décroît exponentiellement avec la force et aucun signal de translocation n'est observé pour des forces supérieures à 3 pN. Dans le cas d'un substrat nucléosomal, C. Bustamante observe, quant à lui, des boucles de grande amplitude (de 20 à 1200 pb), formées avec une vitesse de l'ordre de 12 pb/s, pour des forces comprises entre 1 et 6 pN. La taille de ces boucles ne semble pas dépendre de la force et le complexe est capable, une fois la translocation initialisée, de travailler contre des forces voisines de 12 pN !

Ces résultats peuvent être rendus compatibles si l'on imagine que l'activité du complexe RSC est très sensible à un trait particulier du nucléosome. La présence d'un nucléosome pourrait activer ou moduler son activité et expliquer les grandes différences de comportement observées. Néanmoins, pour se convaincre de cela, on souhaiterait confirmer ces résultats en étudiant, avec notre dispositif de pinces magnétiques, le comportement de RSC sur un substrat nucléosomal contrôlé. Cela nous permettrait également d'enrichir les résultats obtenus par une étude en présence d'une contrainte de torsion. Remarquons enfin que certains aspects de l'expérience de C. Bustamante nous troublent :

1. On est par exemple surpris que l'équipe de C. Bustamante n'ait pas regardé ce qui se passait pour des forces inférieures à 1 pN : vu que le substrat qu'elle manipule comporte très peu de nucléosomes, des complexes RSC doivent également pouvoir agir sur l'ADN nu, il aurait été rassurant de retrouver le comportement que l'on a décrit dans (Lia et al. (2006)).

2. La façon dont ils préparent leurs substrats nucléosomaux ne permet pas d'être sûr du nombre de nucléosomes qu'ils ont sur leurs fibres, et ne permet donc pas de garantir l'homogénéité de leurs substrats. Ils utilisent de plus des octamères purifiés à partir d'érythrocytes de poulet, ils seront donc inhomogènes (présence de variants d'histones, de modifications post-traductionnelles) ce qui peut venir moduler l'activité de RSC d'une fibre à l'autre.

3. Ce même groupe a publié, trois semaines avant leur papier sur RSC, un article détaillant le comportement d'un mononucléosome soumis à une force de traction (Mihardja et al. (2006)). Il observait alors la respiration réversible du nucléosome pour des forces voisines de 3 pN et le départ irréversible de celui-ci pour des forces de l'ordre de 8-9 pN. Même si les conditions ioniques entre les deux expériences ne sont pas exactement les mêmes, il est surprenant qu'il ne soit pas fait mention de cet éventuel problème : il travaille exactement dans la gamme de forces où l'on est susceptible d'observer la respiration spontanée du nucléosome et parfois même son départ.

4. Enfin, RSC est un très gros complexe comportant 15 sous-unités. Les complexes, que nos deux équipes utilisent, proviennent de collaborations différentes. Même si les techniques de purification utilisées sont faites pour préserver l'intégrité de ces complexes, nous ne pouvons pas exclure que la différence de comportement que nous observons soit éventuellement liée à la perte d'une ou de plusieurs sous-unités.

Toutes ces raisons nous poussent à vouloir étudier RSC, dans les mêmes conditions que dans l'article (Lia et al. (2006)), mais sur un substrat nucléosomal. Pour que les résultats soient indiscutables, il nous faut être en mesure de préparer un substrat extrêmement bien contrôlé ou, à défaut, de posséder un test permettant de le caractériser. Pour être sûr enfin de pouvoir facilement analyser les résultats, on a souhaité manipuler le substrat nucléosomal le plus simple qui soit, à savoir un mononucléosome. Ceci a motivé le second thème que j'ai développé au cours de ma thèse et que je présente dans la quatrième partie de ce manuscrit : j'ai mis au point un protocole permettant de préparer des substrats mono-nucléosomaux de manière contrôlée (Chapitre 12). J'ai ensuite recherché un test simple me permettant d'être sûre de manipuler, en pinces magnétiques, un mononucléosome (Chapitre 14). Je montre que cette caractérisation nécessite de prendre

7.2. PRÉPARATION CONTRÔLÉE D'UN SUBSTRAT MONO-NUCLÉOSOMAL

de multiples précautions pour être sûr de la nature des signaux que l'on observe (Chapitre 13). Bien sûr, l'étape suivante sera de profiter de la préparation contrôlée de ce substrat pour étudier le comportement de divers facteurs de remodelage.

Troisième partie

Etude comparée de l'activité de divers
facteurs de remodelage de la chromatine
sur l'ADN nu, en pinces magnétiques

Chapitre 8

Action du facteur de remodelage de la chromatine γ ISW1a sur l'ADN nu

Sommaire

8.1 Réalisation d'une expérience typique	121
8.2 En l'absence d'ATP, le complexe γISW1a se lie à l'ADN de manière coopérative	121
8.2.1 La réduction de longueur des molécules d'ADN est le résultat de l'accrochage de plusieurs complexes γ ISW1a	122
8.2.2 L'accrochage des complexes γ ISW1a sur l'ADN est réversible	122
8.2.3 L'accrochage des complexes γ ISW1a est coopératif	123
8.3 La coopérativité de l'accrochage de γISW1a peut être modulée par différents paramètres expérimentaux	124
8.3.1 Influence de la force de traction sur la coopérativité de l'accrochage de γ ISW1a	124
8.3.2 La coopérativité dépend drastiquement des conditions ioniques	125
8.3.3 L'accrochage de γ ISW1a peut être déplacé par ajout d'ADN compétiteur	126
8.4 Caractérisation d'évènements d'accrochage uniques	127
8.4.1 L'accrochage d'un unique complexe γ ISW1a sur l'ADN provoque le raccourcissement de celui-ci de ~ 30 nm	127
8.4.2 Gamme de forces pour laquelle on détecte des évènements isolés	129
8.4.3 Energie associée à l'accrochage d'un complexe γ ISW1a sur un ADN double brin	130
8.5 L'accrochage du complexe γISW1a est sensible à la présence de plectonèmes	132
8.5.1 Accrochage préférentiel de γ ISW1a en présence de plectonèmes positifs	132
8.5.2 Affinité de l'accrochage de γ ISW1a en présence de plectonèmes négatifs	134
8.6 Les complexes γISW1a sont capables de ponter deux molécules d'ADN double brin	135
8.6.1 Comportement, en rotation, de deux molécules d'ADN double brin attachées entre une même bille et la surface	135
8.6.2 Les complexes γ ISW1a sont capables de <i>pont</i> er deux molécules d'ADN	136
8.6.3 Activité de γ ISW1a en présence d'ATP	137
Résumé des principaux résultats obtenus avec γISW1a sur l'ADN nu	140

Ce chapitre présente les résultats obtenus, en pinces magnétiques, sur le complexe γ ISW1a de la levure. Ce complexe est purifié par le groupe de T. Owen-Hughes avec lequel nous collaborons.

8.1 Réalisation d'une expérience typique

On procède comme on l'a précisé dans la Partie 2, Chapitre 5. On incube d'abord, dans la chambre microfluidique, des molécules d'ADN (de $0.86 \mu\text{m}$ (2519 pb) ou de $1.2 \mu\text{m}$ (3508 pb), selon les cas) attachées, à une extrémité, à une bille magnétique de $1 \mu\text{m}$ de diamètre. Les billes sédimentent et certaines d'entre elles s'ancrent, par l'autre extrémité libre de la molécule d'ADN, à la surface en verre de cette chambre. On choisit alors un champ de vue dans lequel on repère une ou plusieurs billes reliées à la surface de verre par un lien que l'on caractérise : selon l'expérience envisagée, on peut être à la recherche d'une molécule d'ADN insensible à la torsion (i.e. présentant un *nick*), d'une molécule sensible à la torsion ou alors de deux molécules d'ADN attachées simultanément entre une même bille magnétique et la surface de la chambre. Ce repérage se fait généralement directement dans le tampon que l'on utilise ensuite pour caractériser l'activité de la protéine. Lorsqu'on est amené à étudier différents complexes, on change de chambre microfluidique pour s'assurer qu'il n'y a plus de protéines restant de la précédente expérience. Lorsqu'on est amené à changer de tampon entre deux expériences, on rince lentement et abondamment (typiquement avec un volume de 4 mL de tampon, soit presque 200 fois le volume de la chambre microfluidique utilisée).

8.2 En l'absence d'ATP, le complexe γ ISW1a se lie à l'ADN de manière coopérative

On étudie, dans un premier temps, l'accrochage du complexe γ ISW1a sur une molécule d'ADN sensible à la torsion, en l'absence d'ATP. Le tampon utilisé pour cette expérience a la composition suivante : 10 mM Tris-Acétate pH ~ 7.9 , 50 mM KCl, 0.1 mM DTT, 0.2 % BSA, la température de l'échantillon est de 29°C .

On suit, en parallèle, l'extension bout-à-bout de deux molécules d'ADN sensibles à la torsion (Figure 8.1(a) et (b)). En l'absence de γ ISW1a, les extensions de ces deux molécules varient très peu autour d'une valeur moyenne qui dépend de la force appliquée sur ces molécules. On tire alors relativement fort sur les molécules (autour de 3 pN) puis on introduit, dans la chambre microfluidique, le complexe γ ISW1a (les concentrations typiquement utilisées sont voisines de 0.2 nM) : les extensions de ces molécules restent inchangées à haute force comme le montrent les enregistrements (i) et (ii) de la figure 8.1(c). On réduit F : lorsqu'on atteint une force de 0.7 pN, on enregistre une première réduction brutale de l'extension de la molécule 1, de 360 nm en 1 seconde, puis une réduction séquentielle plus lente de 430 nm en l'espace de 3 min. L'extension bout-à-bout fluctue enfin autour d'une extension moyenne de 400 nm (Figure 8.1(c), zone (iii)). La situation de la bille 2, pourtant proche spatialement de la précédente, est très différente : même pour une force de 0.7 pN, l'extension de la molécule ne varie pas, hormis une réduction transitoire très rapide de 120 nm en moins d'une seconde : cette réduction a été agrandie dans l'encart de la figure 8.1(c).

Ces réductions de longueur n'ayant lieu qu'en présence de γ ISW1a dans le milieu, on les associe à l'accrochage de ces complexes sur les molécules d'ADN nues. Ceci est cohérent avec des expériences de biochimie qui ont montré que les complexes ISWI étaient capables de se lier à l'ADN en l'absence d'ATP (Whitehouse et al. (2003)), (Vary et al. (2003)).

8.2. EN L'ABSENCE D'ATP, LE COMPLEXE YISW1A SE LIE À L'ADN DE MANIÈRE COOPÉRATIVE

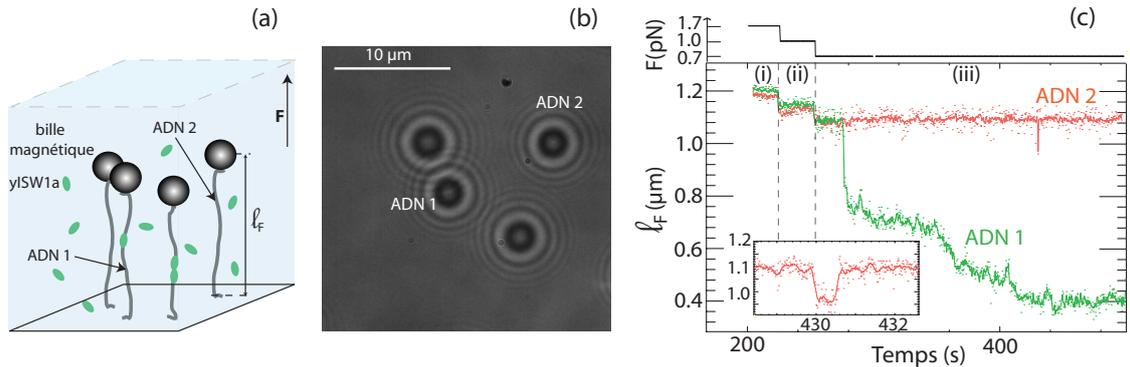


FIGURE 8.1 – (a) Représentation schématique de l'expérience réalisée : dans le champ de vue, on suit l'extension bout-à-bout ℓ_F de deux molécules d'ADN sensibles à la torsion (notées ADN 1 et ADN 2) et dont les points d'ancrage à la surface sont espacés de $10 \mu m$ environ, en l'absence puis en présence de yISW1a, à différentes forces. (b) Champ de vue de l'expérience correspondante. (c) On enregistre, en présence de yISW1a, l'extension ℓ_F des deux molécules d'ADN : à haute force, pas de modification de ℓ_F (zones (i) et (ii)), à 0.7 pN (zone (iii)), la molécule 1 subit une forte réduction de sa longueur bout-à-bout en présence de yISW1a, la molécule 2 ne subit qu'une réduction transitoire de son extension, celle-ci est agrandie dans l'encart en bas à gauche de la figure.

8.2.1 La réduction de longueur des molécules d'ADN est le résultat de l'accrochage de plusieurs complexes yISW1a

Les réductions de longueur des molécules d'ADN sous l'action des complexes yISW1a résultent d'un mécanisme *passif* puisque l'on n'a pas ajouté d'ATP dans le milieu. Le complexe yISW1a a un poids moléculaire voisin de 240 kDa , il a donc une taille caractéristique proche de 15 nm . Il paraît difficile d'imaginer qu'un seul complexe puisse raccourcir, par étapes, la molécule d'ADN 1 de plus de 700 nm par un mécanisme passif^a. On attribue donc le raccourcissement de cette molécule à l'action simultanée de plusieurs complexes yISW1a. Pour la molécule d'ADN 2, la réduction est de plus petite ampleur, nettement moins de complexes doivent être impliqués.

8.2.2 L'accrochage des complexes yISW1a sur l'ADN est réversible

Le raccourcissement de la molécule d'ADN est réversible : le signal détecté sur la molécule 2 montre que, après réduction de l'extension ℓ_F de la molécule due à l'accrochage de yISW1a sur l'ADN, celle-ci peut retrouver sa valeur initiale. Les complexes yISW1a, soit se détachent de la molécule d'ADN et retournent à l'état de complexes libres en solution, soit restent liés à l'ADN mais dans une configuration qui n'entraîne pas de réduction de longueur de l'ADN.

a. Pour raccourcir la molécule d'ADN de 700 nm , à 0.7 pN , yISW1a devrait être en mesure de fournir, par un mécanisme passif, une énergie de l'ordre de $\sim 490 \text{ pN.nm}$ soit $\sim 120 k_B T$!

8.2.3 L'accrochage des complexes γ ISW1a est coopératif

8.2.3.1 Coopérativité de l'accrochage de γ ISW1a, en pinces magnétiques

Les comportements très différents obtenus pour les molécules d'ADN 1 et 2 suggèrent que l'accrochage de γ ISW1a est coopératif : alors que de nombreux complexes s'accrochent en cascade sur la molécule 1, seuls de rares complexes se lient à la molécule 2, pourtant entourée d'autant de complexes γ ISW1a libres en solution. L'accrochage d'un ou de quelques complexes sur la molécule 1 semble favoriser l'accrochage des suivants.

8.2.3.2 Confirmation de ce comportement coopératif, en microscopie électronique

On a souhaité visualiser l'accrochage de γ ISW1a sur l'ADN pour comprendre les observations obtenues en pinces magnétiques. Ce travail a été effectué par A. De Cian et O. Pièturement (IGR, Villejuif).

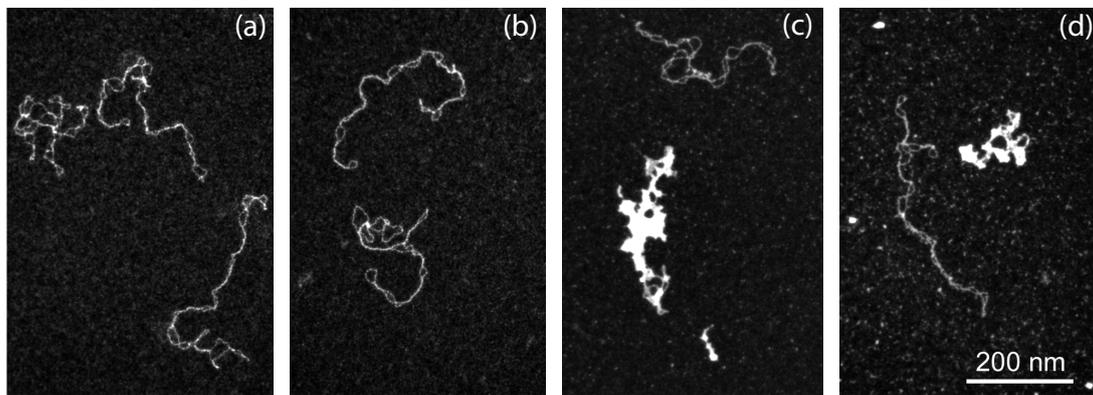


FIGURE 8.2 – (a) et (b) : Contrôles. Visualisation du plasmide pBR322 ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$) dans 10 mM Tris-Acétate pH ~ 7.9 , 100 mM KCl, 3 mM MgOAc, 1 mM DTT + $0.5 \mu\text{L}$ de tampon de dialyse dans $10 \mu\text{L}$, en l'absence (a) et en présence (b) de 2 mM ATP. (c) et (d) : Coopérativité de l'accrochage de γ ISW1a sur l'ADN. Visualisation du plasmide pBR322 ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$) dans 10 mM Tris-Acétate pH ~ 7.9 , 100 mM KCl, 3 mM MgOAc, 1 mM DTT + $0.5 \mu\text{L}$ dans $10 \mu\text{L}$ de γ ISW1a, dialysée contre son tampon de dilution sans Tween-20, en absence (c) et en présence (d) de 2 mM ATP.

Pour pouvoir observer en microscopie électronique le comportement de γ ISW1a sur l'ADN, il a tout d'abord fallu dialyser^b le stock de protéines pour se débarrasser du Tween-20, surfactant qui entre dans la composition du tampon de conservation de γ ISW1a, mais qui pollue la visualisation des plasmides en microscopie électronique. Deux contrôles ont ensuite été faits : on a imagé le plasmide pBR322 surenroulé négatif, dans 10 mM Tris-Acétate pH 7.9, 100 mM KCl, 3 mM MgOAc, 1 mM DTT auquel on a ajouté $0.5 \mu\text{L}$ de tampon de dialyse dans $10 \mu\text{L}$ final, sans ATP (Figure 8.2(a)) et avec 2 mM ATP (Figure 8.2(b))^c.

b. Tampon de dialyse : 20 mM Hepes pH ~ 7.5 , 350 mM NaCl.

c. Pour l'observation en microscopie électronique, les préparations ont été diluées 10 fois dans 10 mM Tris-Acétate pH ~ 7.9 , 100 mM KCl, 3 mM MgOAc et $5 \mu\text{L}$ de cette dilution ont été déposés, pendant 1 min, sur des grilles de cuivre 600 mesh (Delta Microscopies) recouvertes d'un fin film de carbone et fonctionnalisées positivement dans un plasma de pentylamine (Beloïn et al. (2003)), suivi d'une coloration à l'acétate d'uranyle 2 %. Observation sur le microscope électronique à transmission LEO 902 (Zeiss) en champ sombre annulaire filtré sur le pic sans perte d'électrons, au grossissement x85000. Acquisition d'image

8.3. LA COOPÉRATIVITÉ DE L'ACCROCHAGE DE yISW1A PEUT ÊTRE MODULÉE PAR DIFFÉRENTS PARAMÈTRES EXPÉRIMENTAUX

Les contrôles sont très propres, les plasmides pBR322 sont relativement vrillés du fait de la présence de magnésium dans les tampons. On image ensuite le plasmide pBR322 dans les mêmes conditions que précédemment à l'exception près qu'on lui ajoute yISW1a (on incube la protéine et le plasmide pendant 8 min) : la figure 8.2(c) correspond au cas sans ATP, la figure 8.2(d) correspond au cas avec 2 mM ATP. On observe cette fois-ci des plasmides très denses, entièrement recouverts de yISW1a : on a très peu de bruit sur le fond des grilles donc très peu de protéines yISW1a restent libres en solution. yISW1a semble donc avoir une grande affinité pour l'ADN double brin. Très souvent, on trouve les plasmides entièrement recouverts de yISW1a à côté de plasmides vierges de toutes protéines, c'est tout à fait ce que l'on observait en pinces magnétiques : l'accrochage de quelques complexes yISW1a favorise les suivants ce qui permet de trouver, dans une même préparation, des ADN nus et des ADN totalement condensés par yISW1a : l'accrochage de yISW1a sur l'ADN nu est coopératif. Les observations sont les mêmes en présence de 2 mM ATP.

En pinces magnétiques, dans le régime où l'accrochage de yISW1a est coopératif, les signaux obtenus sont très difficiles à décrire précisément : on observe généralement une première phase où l'extension de la molécule d'ADN est brusquement raccourcie, ensuite l'extension de la molécule d'ADN présente souvent de très larges fluctuations, résultant sans doute de l'accrochage et du décrochage simultané de plusieurs complexes yISW1a. Pour caractériser plus finement ce processus d'accrochage, nous avons essayé de trouver des conditions pour lesquelles on arrive à observer des événements uniques. Nous avons identifié pour cela un certain nombre de paramètres permettant de moduler la coopérativité de l'accrochage de yISW1a.

8.3 La coopérativité de l'accrochage de yISW1a peut être modulée par différents paramètres expérimentaux

On peut jouer sur plusieurs paramètres pour moduler la coopérativité de l'accrochage : travailler à plus haute force, augmenter la force ionique du tampon, ou encore ajouter de l'ADN compétiteur libre en solution, peuvent nous permettre de nous rapprocher de conditions pour lesquelles on observe l'accrochage unique d'un complexe yISW1a.

8.3.1 Influence de la force de traction sur la coopérativité de l'accrochage de yISW1a

La force de traction que l'on impose à la molécule d'ADN travaille contre une réduction de longueur de celle-ci, induite par l'accrochage de yISW1a.

La figure 8.3(a) présente une situation classique obtenue lorsque l'on suit l'activité de yISW1a : on suit l'extension ℓ_F d'une molécule d'ADN (de 860 nm) insensible à la torsion en présence de yISW1a, sans ATP. Pour des forces comprises entre 3.8 et 1.0 pN, cette extension reste constante autour d'une valeur moyenne (qui dépend de la force). Lorsque l'on atteint 1.0 pN, on observe d'abord deux petites réductions réversibles très rapides de l'extension de la molécule (taille ~ 27 nm, durée $< 0,5$ s), puis une réduction irréversible de ~ 90 nm, avant que d'autres réductions ne se produisent jusqu'à ce que l'extension de la molécule fluctue très largement autour de 340 nm (soit une réduction de près de 180 nm par rapport à sa longueur sans accrochage, 520 nm). On peut suivre les premiers accrochages/décrochages des complexes puis, à partir de 150s, la situation devient plus confuse. La longueur de l'ADN fluctue de manière très dynamique autour d'une valeur bien inférieure à sa valeur initiale : ceci est sans doute le résultat d'accrochages et de décrochages simultanés de plusieurs complexes agissant de concert.

avec une caméra numérique format 1024x1024 (Megaview III), et logiciel iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions).

8.3. LA COOPÉRATIVITÉ DE L'ACCROCHAGE DE YISW1A PEUT ÊTRE MODULÉE PAR DIFFÉRENTS PARAMÈTRES EXPÉRIMENTAUX

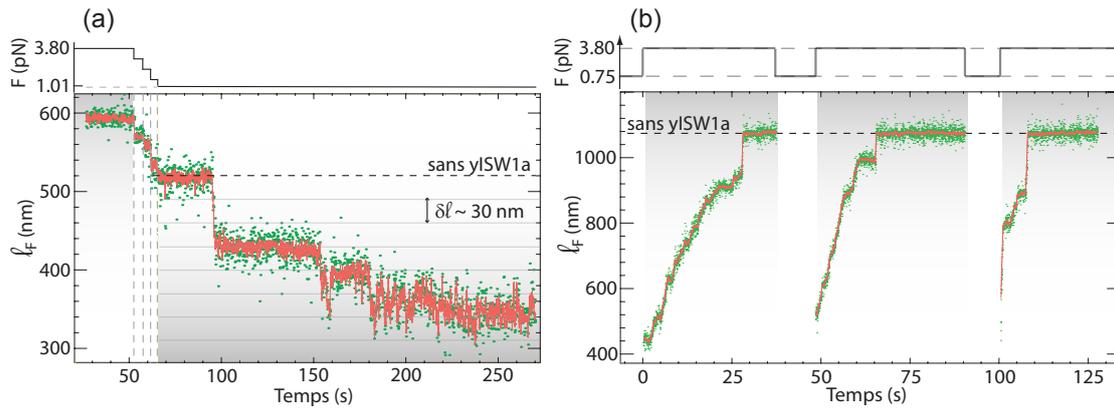


FIGURE 8.3 – Suivi de l’extension d’une molécule d’ADN insensible à la torsion, en présence de yISW1a sans ATP. (a) On diminue la force pas à pas : à 1.0 pN, on assiste à une réduction de longueur de la molécule d’ADN due à yISW1a. (b) On laisse des complexes yISW1a réduire la longueur de la molécule d’ADN à basse force (0,75 pN) puis on augmente brusquement la force (3,8 pN), la molécule retrouve, par étapes, son extension initiale.

La figure 8.3(b) illustre le cas où l’on tire fort sur une molécule d’ADN sur laquelle se sont accrochés de multiples complexes yISW1a. Partant d’une situation à basse force (< 1 pN) où la longueur de l’ADN est très réduite du fait de l’accrochage de multiples complexes, on tire brusquement à plus haute force (3,8 pN), la molécule d’ADN retrouve alors, par paliers, son extension initiale (Figure 8.3(b)). Une telle force permet ainsi de détacher séquentiellement les complexes yISW1a de la molécule.

Ces exemples montrent que l’on peut moduler l’accrochage des complexes yISW1a sur l’ADN en jouant sur la force avec laquelle on tire sur l’ADN.

8.3.2 La coopérativité dépend drastiquement des conditions ioniques

On étudie l’accrochage de yISW1a dans trois conditions de tampon différentes : on ajoute, à une base commune (10 mM Tris-Acétate pH ~ 7.9 , 0.1 mM DTT et 0.2 % BSA), 50, 100 ou 150 mM KCl.

Dans le tampon à 50 mM KCl, la coopérativité est très forte : dès que l’on atteint une force voisine de 0.7 pN, des accrochages multiples de complexes yISW1a entraînent une réduction rapide et significative de l’extension de la molécule (figure 8.4 (à gauche)). Si on suit cette même molécule, en présence de yISW1a et 100 mM KCl, on observe soit des bouffées d’accrochages et de décrochages de yISW1a, la longueur de la molécule retournant rapidement à sa valeur initiale (durée caractéristique des bouffées \leq min), soit pas d’activité du tout sur de longues périodes de temps (figure 8.4(droite)). A 150 mM KCl, la même molécule, en présence de yISW1a, ne subit plus aucune réduction de sa longueur.

L’augmentation de la force ionique du tampon a pour effet d’écranter les interactions de type électrostatique : on affaiblit les interactions ADN-protéine d’une part, et protéine-protéine d’autre part. En diminuant ces interactions, on diminue également le comportement collectif observé pour l’accrochage des complexes yISW1a sur l’ADN. La dépendance, en les conditions ioniques, de la constante d’association des protéines avec l’ADN, est drastique comme le montrent les travaux de M. Wang (Koch et al. (2002)).

8.3. LA COOPÉRATIVITÉ DE L'ACCROCHAGE DE YISW1A PEUT ÊTRE MODULÉE PAR DIFFÉRENTS PARAMÈTRES EXPÉRIMENTAUX

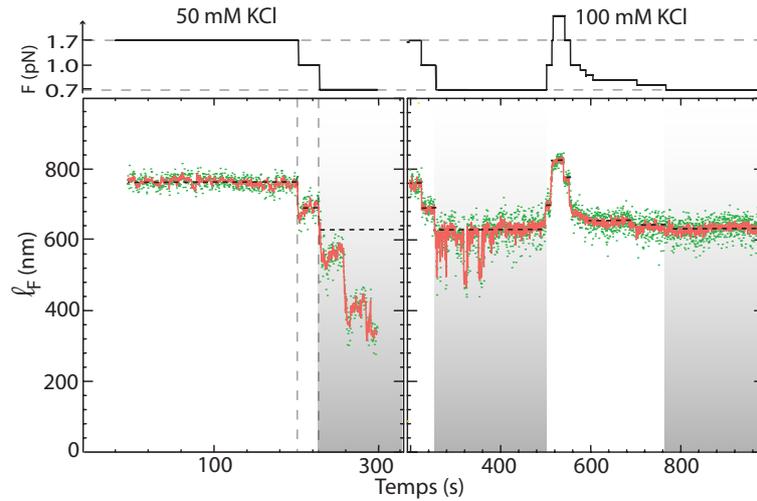


FIGURE 8.4 – Suivi, en fonction du temps, de l'extension d'une molécule d'ADN insensible à la torsion en présence de yISW1a, sans ATP. Le tampon utilisé pour l'expérience est 10 mM Tris-Acétate pH ~ 7.9 , 0.1 mM DTT, 0.2 % BSA et (à gauche) 50 mM KCl, (à droite) 100 mM KCl. La coopérativité est forte à 50 mM KCl, modérée à 100 mM KCl et on n'observe plus d'évènements d'accrochage de yISW1a sur l'ADN en présence de 150 mM KCl.

Pour observer des signaux uniques d'accrochage/décrochage de yISW1a, avec des fréquences d'apparition pas trop petites, on travaillera dans des tampons contenant une concentration en KCl intermédiaire, de l'ordre de 75 mM.

8.3.3 L'accrochage de yISW1a peut être déplacé par ajout d'ADN compétiteur

Si on ajoute, dans la chambre microfluidique, de l'ADN libre en solution, on va pouvoir déplacer l'équilibre d'accrochage/décrochage du complexe yISW1a. La figure 8.5(gauche) montre une situation où quelques complexes sont liés simultanément à une même molécule d'ADN. Après ajout d'ADN compétiteur (Figure 8.5(droite)), on favorise le départ de quelques complexes pour aboutir à une situation où l'extension oscille entre deux longueurs qui diffèrent de 30 nm, du fait de l'accrochage et du décrochage d'un unique complexe.

Remarquons qu'il n'est pas toujours facile de doser la quantité d'ADN compétiteur à ajouter : on ne connaît pas très précisément la concentration en complexes intacts avec laquelle on travaille (nos collaborateurs nous fournissent une concentration moyenne en complexes et une mesure de l'activité ATPase de ceux-ci, déduite d'expériences en *bulk*). On a souvent une réponse tout-ou-rien : on passe généralement d'une situation où l'ajout d'ADN compétiteur n'empêche pas la grande coopérativité de l'accrochage de yISW1a, à une situation pour laquelle les complexes se dissocient très rapidement de l'ADN, sans pouvoir observer, après coup, une réassociation. La situation présentée en figure 8.5 est assez rare. Le contrôle de la coopérativité par ajout d'ADN compétiteur s'avère plus délicat que par la modification des conditions ioniques des tampons utilisés.

L'intensité de la force de traction, l'ajout d'ADN compétiteur, la modification des conditions ioniques sont autant de paramètres sur lesquels on peut jouer pour rendre plus difficile l'accrochage de plusieurs complexes et s'approcher de l'observation d'évènements uniques. On va présenter, dans le paragraphe qui

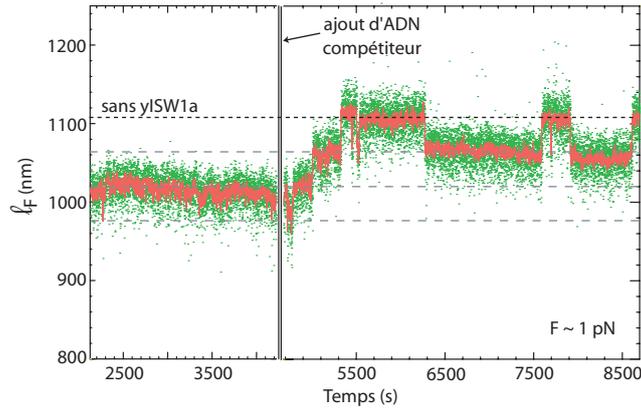


FIGURE 8.5 – Suivi, en fonction du temps, de l’extension d’une molécule d’ADN insensible à la torsion en présence de yISW1a, sans ATP. (à gauche) Les conditions dans lesquelles l’expérience est menée permettent à plusieurs complexes yISW1a de se fixer sur la molécule. L’ajout d’ADN compétiteur dans le tampon de travail utilisé permet le départ de plusieurs de ces complexes : (droite) on se retrouve dans une situation où l’on arrive à suivre l’accrochage ou le décrochage d’un complexe yISW1a isolé.

suit, les caractéristiques des évènements uniques que l’on a pu isoler sur différentes molécules d’ADN. Notons néanmoins que la coopérativité est tellement forte qu’il est plus facile d’avoir un signal tout-ourien : soit aucun signal, soit une cascade d’accrochages entraînant de larges fluctuations de l’extension de la molécule, signal malheureusement difficilement exploitable.

8.4 Caractérisation d’évènements d’accrochage uniques

*Note : dans les paragraphes qui suivent, on distinguera deux types de variations de longueur obtenues pour une force F donnée : on notera δl_F la variation de longueur effectivement **mesurée** en pinces magnétiques à cette force F , et δl la taille **réelle** (cristallographique) correspondant à cette variation, en tenant compte du facteur de force λ_{WLC} issu du Worm-like chain model : $\delta l = \frac{\delta l_F}{\lambda_{WLC}}$. Ce facteur de force vaut $\sim 0,796$ pour $F = 0,5$ pN et $0,856$ à 1 pN. Sauf indication explicite, on parlera toujours en taille réelle (δl) pour pouvoir comparer les signaux obtenus à différentes forces.*

8.4.1 L’accrochage d’un unique complexe yISW1a sur l’ADN provoque le raccourcissement de celui-ci de ~ 30 nm

On suit, à une force de 1 pN, l’extension de différentes molécules d’ADN insensibles à la torsion, dans des conditions où un unique (ou quelques) complexe(s) se lie(nt) à l’ADN. La figure 8.6(b) montre quelques traces de ces accrochages/décrochages isolés. La plus petite variation de longueur réversible détectée est de l’ordre de 30 nm, on l’attribue à l’accrochage d’un unique complexe yISW1a. On interprète les trois traces de la figure 8.6(b) de la manière suivante : la trace verte correspond à trois accrochages réversibles du complexe yISW1a, puis à l’accrochage successif de deux complexes yISW1a ; la trace rouge part d’un état où 5 complexes yISW1a sont associés à l’ADN, l’un de ces complexes se détache et s’attache très rapidement, puis 4 complexes se détachent simultanément, 2 s’associent à nouveau pour se dissocier peu de temps après. Enfin, la trace orange montre, de la même façon, des variations de l’extension de l’ADN

8.4. CARACTÉRISATION D'ÉVÈNEMENTS D'ACCROCHAGE UNIQUES

par pas de 30 nm résultant de l'accrochage d'un complexe γ ISW1a sur l'ADN.

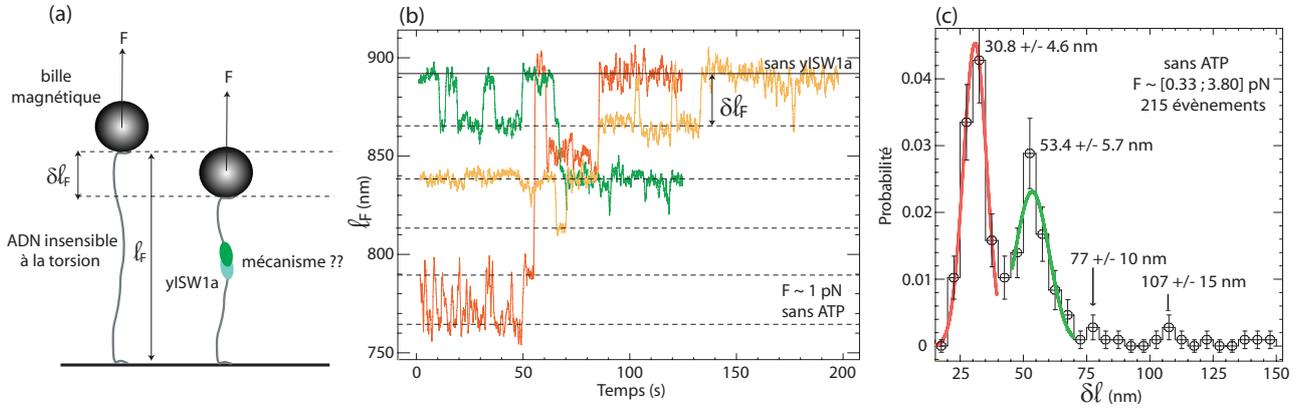


FIGURE 8.6 – (a) Illustration de l'expérience. (b) Traces (moyennées sur 0.5s) représentant l'extension de trois molécules d'ADN, insensibles à la torsion, en présence de γ ISW1a, sans ATP. L'expérience est menée à 1 pN. On observe des allongements ou réductions successifs de l'extension de l'ADN, leur taille est multiple de 30 nm environ. On attribue les variations d'extension δl à l'accrochage ou au décrochage de un ou plusieurs complexes γ ISW1a. (c) Distribution de taille de δl pour 215 évènements détectés, pour des forces comprises entre 0.33 et 3.8 pN.

La taille détectée pour ces pas élémentaires ne dépend pas de la force, on a construit l'histogramme de leur taille (215 évènements ont été traités, ils ont été obtenus à différentes forces, allant de 0.3 à 3.8 pN) (Figure 8.6(c)) : la taille de ces évènements δl_F , mesurée en pince magnétique, est corrigée par le facteur de force pour obtenir la taille réelle δl de ces réductions. Cet histogramme révèle plusieurs tailles caractéristiques : la plus petite, $\delta l = 30.8 \pm 4.6$ nm correspond à l'accrochage d'un unique complexe γ ISW1a, un second pic très net apparaît pour une taille $\delta l = 53.4 \pm 5.7$ nm. On l'associe à l'action simultanée de deux complexes (soit d'un dimère préformé en solution, soit de deux complexes liés entre eux et à l'ADN et qui basculent conjointement dans une configuration où ils réduisent l'extension bout-à-bout de l'ADN de 60 nm environ). On devine enfin sur l'histogramme deux plus petits pics correspondant à l'accrochage simultané de 3 et 4 complexes.

La figure 8.6(b) montre que l'on peut avoir des évènements d'accrochage ou de décrochage de 60 nm, ou même de 120 nm (trace rouge). Ceci est consistant avec l'accrochage ou le décrochage simultané de 2 ou de 4 complexes γ ISW1a respectivement. Cette interprétation a été confirmée par plusieurs enregistrements semblables à celui présenté sur la figure 8.7 : on suit l'extension d'une molécule d'ADN insensible à la torsion en présence de γ ISW1a et sans ATP. On tire sur la molécule à une force de 1,0 pN, force à laquelle l'accrochage de complexes est possible. On observe quelques rares signaux d'accrochages réversibles de γ ISW1a puis plus rien pendant 16 min. On abaisse légèrement la force (à 0,5 pN) : c'est l'enregistrement proposé en figure 8.7.

Après 4 min sans aucun signal particulier, un raccourcissement réversible de $\delta l = 110 \pm 1,8$ nm en 2 secondes se produit. Deux secondes plus tard, on observe un raccourcissement de $58 \pm 0,6$ nm qui persiste pendant 35 s. Avant que le raccourcissement ait eu le temps de se résorber, on augmente la force jusqu'à 1 pN : on observe 7 décrochements réversibles de $27 \pm 0,3$ nm en 6 min, puis un décrochement irréversible

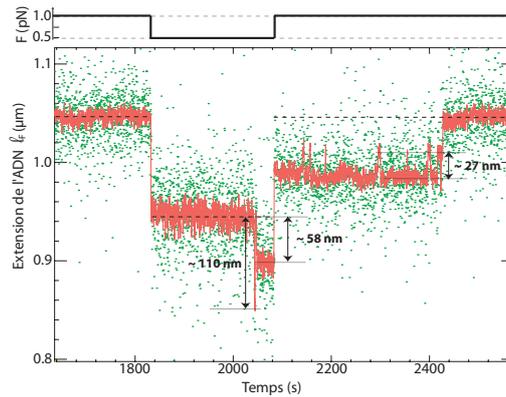


FIGURE 8.7 – Suivi de l'extension d'une molécule d'ADN insensible à la torsion de $1,2 \mu\text{m}$ en présence de γISW1a , sans ATP : les données brutes (points verts) ont été moyennées sur $0,5 \text{ s}$ (ligne continue rouge). L'extension naturelle de la molécule (sans accrochage de complexes γISW1a) est donnée par les lignes en pointillé. La force est rappelée en haut de la figure.

de la même taille suivi de peu par un dernier décrochement : l'ADN retrouve alors sa longueur initiale sans γISW1a , aucun signal n'est ensuite détecté pendant plus de 30 min. La concentration des complexes est, dans ces expériences, très faible et la fréquence des événements est très petite : il est donc fort improbable que deux ou plusieurs complexes, agissant de manière non coordonnée, raccourcissent au même instant la molécule d'ADN, provoquant une réduction globale de la molécule d'ADN par une taille, multiple de 30 nm. Les complexes responsables des réductions de taille par des multiples de 30 nm agissent donc de manière cohérente. On attribue donc ces signaux à un même ensemble de quatre complexes d'abord, provoquant la réduction réversible de près de 120 nm, deux complexes se dissocient sans doute de manière irréversible : il reste donc deux complexes qui se lient ensemble à l'ADN (réduction de 60 nm à $0,5 \text{ pN}$) puis se dissocient l'un après l'autre (pas élémentaires de 27 nm).

Les complexes γISW1a peuvent probablement rester associés à l'ADN sans qu'il y ait variation de longueur : en effet, hormis les signaux présentés dans la figure 8.7, aucun signal n'a été détecté durant près d'une heure d'acquisition. Les signaux alors mesurés sont parfois réversibles (avec des temps caractéristiques de raccrochage très courts comme dans le cas des signaux réversibles de 27 nm à 1 pN de la figure 8.7) : il ne paraît pas envisageable qu'un complexe se décroche de l'ADN et qu'un second vienne le remplacer si rapidement. Il s'agit plutôt du même complexe qui s'attache et se détache réversiblement. Celui-ci reste donc sans doute lié à l'ADN de façon à ce que ce lien ne provoque pas de modifications mesurables (en pinces magnétiques) de l'extension de l'ADN et que le complexe soit très vite disponible pour basculer dans une configuration où il provoquera une réduction de longueur de 30 nm. Par la suite, lorsque l'on parlera d'*accrochage*, on fera référence à la configuration pour laquelle on observe une réduction de longueur de 30 nm (le *décrochage* fera référence à la restitution de ces 30 nm, le complexe pouvant vraisemblablement rester lié à l'ADN).

8.4.2 Gamme de forces pour laquelle on détecte des événements isolés

Comme on l'a vu précédemment, la force de traction avec laquelle on tire sur la molécule joue énormément sur l'accrochage des complexes γISW1a . On peut préciser la gamme de forces pour laquelle on observe des signaux individualisés. Partant de hautes forces ($\sim 3 \text{ pN}$), on diminue, par pas successifs,

8.4. CARACTÉRISATION D'ÉVÈNEMENTS D'ACCROCHAGE UNIQUES

la force. Les évènements d'accrochage uniques ont toujours lieu pour des forces voisines de 1 pN (Figure 8.8(a)). De même, un complexe yISW1a étant attaché à l'ADN, on augmente pas à pas la force jusqu'à voir la dissociation du complexe : la force maximale que l'on puisse atteindre avant dissociation du complexe est voisine de 4 pN (Figure 8.8(b)).

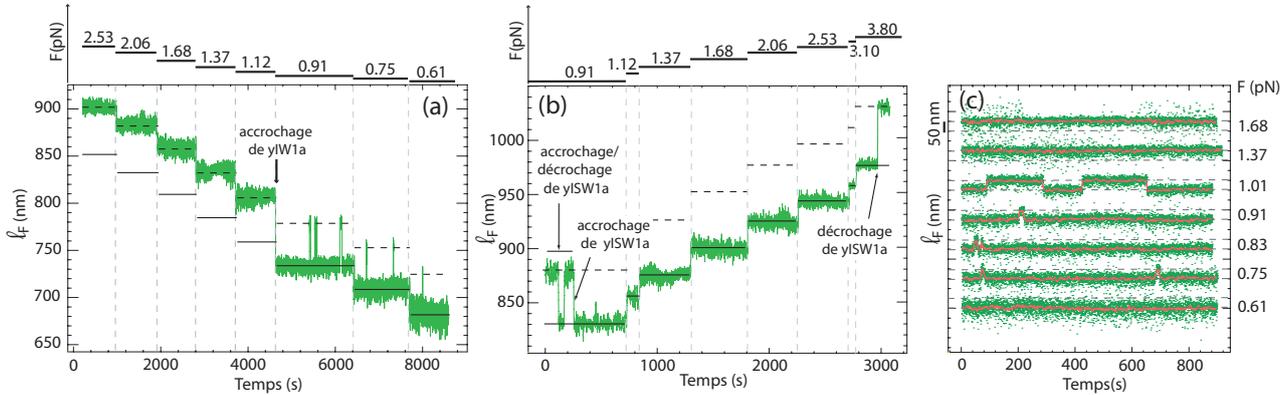


FIGURE 8.8 – (a) et (b) : Traces, moyennées sur 0,5 s, de l'extension en fonction du temps d'une molécule d'ADN en présence de yISW1a sans ATP. (a) On suit l'extension de l'ADN en commençant par tirer dessus à haute force (2,5 pN) puis en diminuant la force graduellement. L'accrochage d'un complexe yISW1a a lieu à 0,9 pN. (b) On suit une molécule d'ADN sur laquelle est fixé un unique complexe yISW1a à basse force. On augmente graduellement la force, le complexe se détache à 3,8 pN. (c) On suit l'extension de la molécule d'ADN sur laquelle est fixé un complexe yISW1a pour différentes forces comprises entre 0,6 et 1,7 pN. Les données vertes correspondent aux données brutes, les rouges, aux données brutes moyennées sur 0,5s.

Lorsqu'un complexe s'associe à l'ADN, il existe une gamme de forces relativement étroite pour laquelle on observe des évènements d'accrochage/décrochage successifs. La figure 8.8(c) présente la variation de l'extension d'une molécule d'ADN, en présence de yISW1a sans ATP, à différentes forces entre 0,6 et 1,7 pN. Pour une force intermédiaire (~ 1 pN), on a une alternance d'accrochage et de décrochage d'un complexe yISW1a. Si on appelle τ_{on} la durée d'un évènement où yISW1a est accroché, et τ_{off} la durée d'un évènement où yISW1a est décroché de l'ADN, on a, pour cette force $\tau_{on} \sim \tau_{off}$. Pour des forces supérieures ($F > 1,2$), on a $\tau_{on} \ll \tau_{off}$, pour des forces inférieures ($F < 0,9$), on a $\tau_{on} \gg \tau_{off}$.

C'est autour de cette gamme de forces que l'on travaille afin d'acquérir le maximum d'évènements. Ce régime va également nous permettre d'évaluer l'énergie associée à l'accrochage d'un complexe yISW1a sur l'ADN.

8.4.3 Energie associée à l'accrochage d'un complexe yISW1a sur un ADN double brin

On se place à 1 pN et on enregistre une succession d'évènements d'accrochage et de décrochage d'un complexe yISW1a (Figure 8.9(a)). L'histogramme correspondant à cette trace permet de déterminer la variation de la longueur de l'ADN associée à l'accrochage de yISW1a : $\delta\ell_F = 25,8 \pm 0,3$ nm (Figure 8.9(a), encart). On peut également tracer les histogrammes des temps τ_{on} et τ_{off} caractérisant respectivement

8.4. CARACTÉRISATION D'ÉVÈNEMENTS D'ACCROCHAGE UNIQUES

la durée moyenne de l'état accroché et de l'état décroché de yISW1a (Figure 8.9(b)) : leurs distributions décroissent de manière exponentielle, avec des temps caractéristiques valant $\tau_{on} = 63,1 \pm 26,8$ s (45 évènements analysés) et $\tau_{off} = 69,1 \pm 18,6$ s (44 évènements analysés).

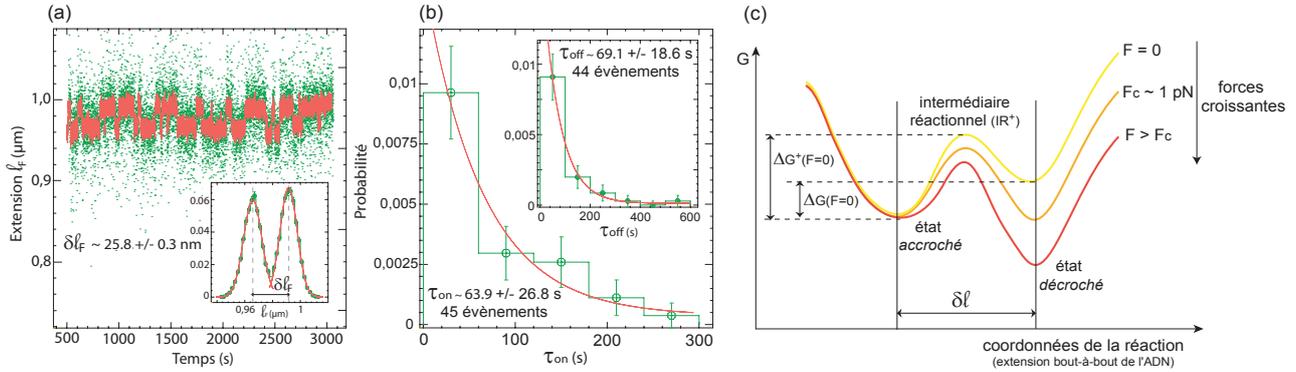


FIGURE 8.9 – (a) Extension d'une molécule d'ADN double brin en présence de yISW1a, sans ATP, à 1.0 pN. Les données brutes sont en vert, la trace rouge correspond à un moyennage sur une fenêtre glissante de 0,5 s. On a un signal à deux niveaux distants de 25.8 +/- 0.3 nm. (b) Histogrammes des temps correspondant à un état où yISW1a est accroché à l'ADN ($\tau_{on} = 63.9 \pm 26.8$ s, 45 évènements), ou à un état où yISW1a s'est décroché de l'ADN ($\tau_{off} = 69.1 \pm 18.6$ s, 44 évènements analysés). (c) Représentation schématique de l'enthalpie libre d'un système à deux états correspondant à un état où yISW1a est attaché à l'ADN (avec réduction de longueur de $\delta\ell$) et un second état où yISW1a est décroché de l'ADN.

La thermodynamique nous permet d'écrire la variation d'énergie d'un système comme la somme de deux composantes : l'une correspond au transfert de chaleur du système avec le milieu environnant, l'autre correspond au travail fournit par le système. Lorsque les changements d'énergie se font suffisamment lentement pour que le système reste à l'équilibre quasi-statique, ces quantités prennent la forme d'un échange de chaleur et d'un travail réversibles :

$$dE = dq_{rev} + dw_{rev}$$

$$dE = (TdS) + (-PdV + \int F.d\ell)$$

Dans nos expériences, la température et la pression sont les bonnes variables indépendantes à prendre en compte, on travaille donc préférentiellement avec l'enthalpie libre G qui vérifie : $G = E - TS + PV$. On peut également écrire : $dG = -SdT + VdP + Fd\ell$. A température et pression constantes, le travail nécessaire, dans notre cas, pour faire varier l'extension bout-à-bout de la molécule d'ADN d'une valeur $\delta\ell$ s'écrit :

$$W = \int_{\ell_0 - \delta\ell}^{\ell_0} F.d\ell$$

Si la variation d'extension est réalisée suffisamment lentement pour que le système reste à l'équilibre quasi-statique, le travail décrit par l'équation précédente est réversible et est égal à la variation d'enthalpie libre du système :

$$\Delta G_{stretch}(\delta\ell) = \int_{\ell_0 - \delta\ell}^{\ell_0} F.d\ell$$

8.5. L'ACCROCHAGE DU COMPLEXE YISW1A EST SENSIBLE À LA PRÉSENCE DE PLECTONÈMES

L'effet d'une force de traction sur une réaction impliquant le passage du système d'un état A_{on} (état où yISW1a est *accroché*) à un état A_{off} (état où yISW1a est *décroché*) est illustré sur le schéma de la figure 8.9(c). Les états A_{on} et A_{off} sont deux états distincts occupant des minima d'enthalpie libre, séparés d'une distance $\delta\ell$ le long du chemin réactionnel. A force nulle, l'enthalpie libre entre les deux états vaut simplement :

$$\Delta G(F = 0) = \Delta G^\circ + k_B T \ln \frac{[A_{off}]}{[A_{on}]}$$

où ΔG° est l'enthalpie libre standard, et $[A_{on}]$ et $[A_{off}]$ représentent, pour des expériences en molécule unique, la probabilité que le système se retrouve respectivement dans l'état A_{on} ou A_{off} . En première approximation, l'application d'une force ajoutée, à l'enthalpie libre, un terme linéaire en la variation d'extension de la molécule $\delta\ell$, de telle sorte que :

$$\Delta G(F) = \Delta G^\circ + k_B T \ln \left(\frac{\tau_{off}}{\tau_{on}} \right) - F \delta\ell$$

A l'équilibre : $\Delta G(F) = 0$, et il vient donc :

$$\Delta G^\circ = k_B T \ln \frac{(\tau_{on})_{eq}(F)}{(\tau_{off})_{eq}(F)} + F \delta\ell$$

On définit la force critique F_c comme étant la force pour laquelle $(\tau_{on})_{eq}(F_c) = (\tau_{off})_{eq}(F_c)$. Ainsi, $\Delta G^\circ = F_c \delta\ell$. On peut réécrire l'équation précédente de la manière suivante :

$$(F_c - F) \delta\ell = k_B T \ln \frac{(\tau_{on})_{eq}(F)}{(\tau_{off})_{eq}(F)}$$

On voit sur cette expression que l'on peut déplacer l'équilibre, vers un état ou l'autre, en modifiant la force de traction imposée à la molécule d'ADN (Bustamante et al. (2004)). Si $F \gg F_c$, $(\tau_{on})_{eq}(F) \ll (\tau_{off})_{eq}(F)$ ce qui est bien cohérent avec l'expérience : à haute force, on favorise l'état pour lequel yISW1a est décroché de l'ADN. A l'inverse, si $F \ll F_c$, $(\tau_{on})_{eq}(F) \gg (\tau_{off})_{eq}(F)$ et l'état accroché de yISW1a est favorisé. Dans notre cas, $F_c \sim 1$ pN.

En prenant les valeurs correspondant à notre problème ($\tau_{on} = 63.9 \pm 26.8$ s. (45 évènements), $\tau_{off} = 69.1 \pm 18.6$ s. (44 évènements) donc $F_c = 1.0 \pm 0.1$ pN et $\delta\ell = 25.8 \pm 0.3$ nm), on trouve $\Delta G^\circ \approx 25.8$ pN.nm (soit $6.3 k_B T$).

Cette valeur est cohérente avec des transitions, entre deux états, observables à cette échelle de temps (de l'ordre de quelques secondes). On peut la comparer à l'énergie libérée par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP, soit $20 k_B T$. Une mesure d'énergie similaire a été faite pour la fixation des complexes GalR et HU sur un fragment d'ADN contenant deux sites de fixation pour GalR espacés de 38 nm. Ces complexes pontent ces deux sites distants, formant ainsi une boucle d'ADN. L'énergie associée à la fixation de ces complexes GalR/HU a été estimée à $-12 k_B T$ (Lia et al. (2003)).

8.5 L'accrochage du complexe yISW1a est sensible à la présence de plectonèmes

8.5.1 Accrochage préférentiel de yISW1a en présence de plectonèmes positifs

On suit en parallèle 5 molécules d'ADN de $1,2 \mu\text{m}$, deux d'entre elles présentent un *nick* dans leur squelette sucro-phosphate et seront donc insensibles à la torsion, les trois autres sont intactes et seront,

8.5. L'ACCROCHAGE DU COMPLEXE YISW1A EST SENSIBLE À LA PRÉSENCE DE PLECTONÈMES

elles, sensibles à la torsion (la figure 8.10(a) schématise l'expérience dans le cas des molécules surenroulables auxquelles on a imposé des tours positifs et la figure 8.10(b) montre les courbes en chapeau obtenues pour l'une des molécules d'ADN sensibles à la torsion, à 0.5 et 1.1 pN.).

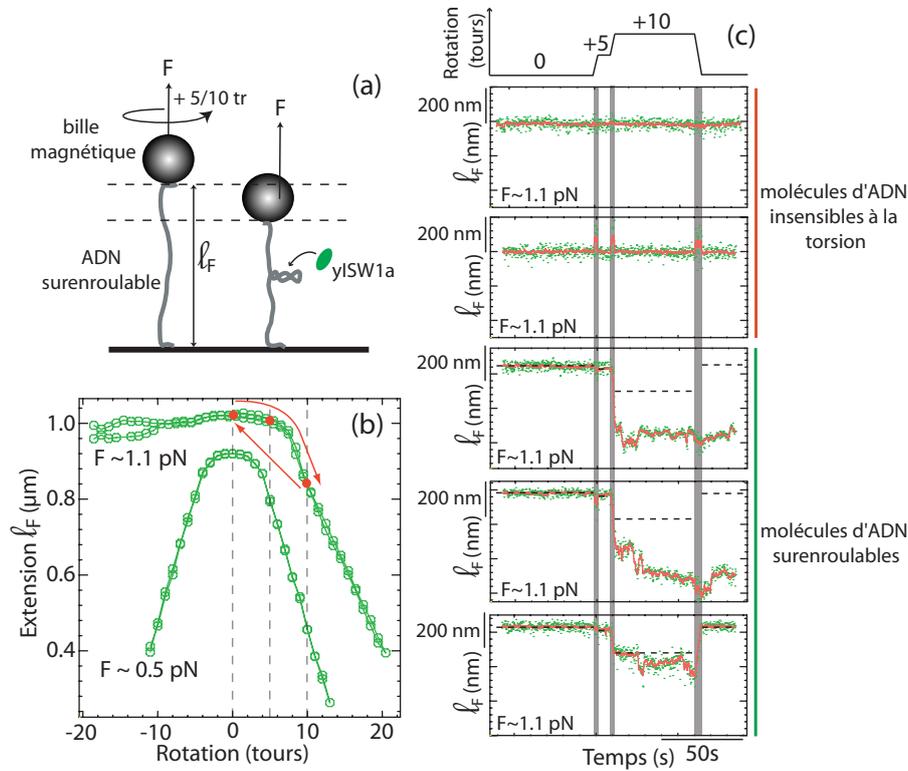


FIGURE 8.10 – (a) Illustration de l'expérience dans le cas d'une molécule d'ADN surenroulable : on suit l'extension bout-à-bout l_F d'une molécule d'ADN surenroulable, en présence de yISW1a, sans ATP, à une force de 1.1 pN, avec ou sans contrainte de torsion. Lorsqu'on applique des tours positifs (ici +10), l'extension se réduit du fait de l'apparition de plectonèmes. La présence de plectonèmes favorise l'accrochage de yISW1a. (b) Courbes donnant l'extension bout-à-bout de la molécule d'ADN en fonction de la rotation imposée à la molécule en l'absence de yISW1a, à 0.5 et 1.1 pN. La courbe à basse force est symétrique et nous permet de s'assurer de la position du centre de rotation de la molécule suivie. La courbe à 1.1 pN montre que l'ADN est dénaturé en négatif et présente des plectonèmes en positif. Les flèches rouges résument l'expérience présentée en (c) où on va successivement appliquer +5, puis +10 tours aux molécules et revenir à 0 rotation. (c) Traces obtenues, à 1.1 pN, dans le cas de deux molécules insensibles à la torsion (en haut), et de trois molécules sensibles à la torsion (en bas). Les lignes en pointillé indiquent la longueur attendue pour ces molécules en l'absence de yISW1a.

On suit l'extension bout-à-bout de ces 5 molécules d'ADN en présence de yISW1a sans ATP, à 1.1 pN (Figure 8.10(c)) : sans introduction de torsion, on n'observe pas d'accrochage de complexes durant les premières minutes de l'expérience. On ajoute alors +5 puis +10 tours aux molécules d'ADN : aucune activité n'est enregistrée sur les deux molécules insensibles à la torsion, tandis que l'on a immédiatement une réduction de longueur conséquente sur les trois molécules présentant une structure plectonémique (remarquons que la réduction de longueur est à la fois due à la formation des plectonèmes et à l'action

8.5. L'ACCROCHAGE DU COMPLEXE yISW1a EST SENSIBLE À LA PRÉSENCE DE PLECTONÈMES

des complexes yISW1a, les lignes en pointillé sur la figure 8.10(c) représentent l'extension de la molécule attendue en présence de plectonèmes seulement). On revient ensuite à 0 tour, deux des molécules surenroulables restent plus courtes (les complexes persistent à réduire l'extension de l'ADN) tandis que la dernière retrouve sa longueur initiale, indiquant que les complexes se sont décrochés de l'ADN. L'affinité des complexes pour les molécules enroulées avec 10 tours positifs est évidente, reste à savoir quel est le trait que ces complexes détectent et qui favorise leur accrochage : ils pourraient soit reconnaître une structure d'ADN *twistée* (une structure d'ADN ayant un pas hélical plus petit) ou bien reconnaître les structures plectonémiques qui apparaissent lorsque l'on applique suffisamment de tours positifs à la molécule (au delà du couple limite de flambage Γ_f (voir Partie 2, Chapitre 5)). Pour répondre à cette question, on reproduit l'expérience précédente en ajoutant graduellement des tours positifs pour voir quand se déclenche l'accrochage préférentiel des complexes yISW1a.

On reproduit l'expérience précédente à ajoutant, un par un, les tours positifs. On fait l'expérience à 0.5 pN et à 1.1 pN (voir figure 8.11(a) et (b)) : dans les deux cas, l'accrochage préférentiel des complexes yISW1a apparaît au moment de la transition de flambage de la molécule d'ADN (+5 tours à 0.5 pN et +6 tours à 1.1 pN), c'est-à-dire de l'apparition de la première boucle de plectonème, cela suggère que l'accrochage des complexes yISW1a est favorisé par leur présence. Il est vraisemblable que ces complexes aient besoin, pour réduire l'extension de la molécule d'ADN, de contacter la molécule d'ADN par au moins deux sites distincts, la formation naturelle d'une boucle dans l'ADN pourrait faciliter leur accrochage. Une autre interprétation possible serait la suivante : si l'on imagine que les complexes yISW1a restent fixés le long de l'ADN (cf remarque faite au paragraphe 8.4.1), la formation de plectonèmes pourrait faciliter l'interaction entre complexes, pourtant éloignés le long de l'ADN, et initier ainsi la coopérativité de l'accrochage.

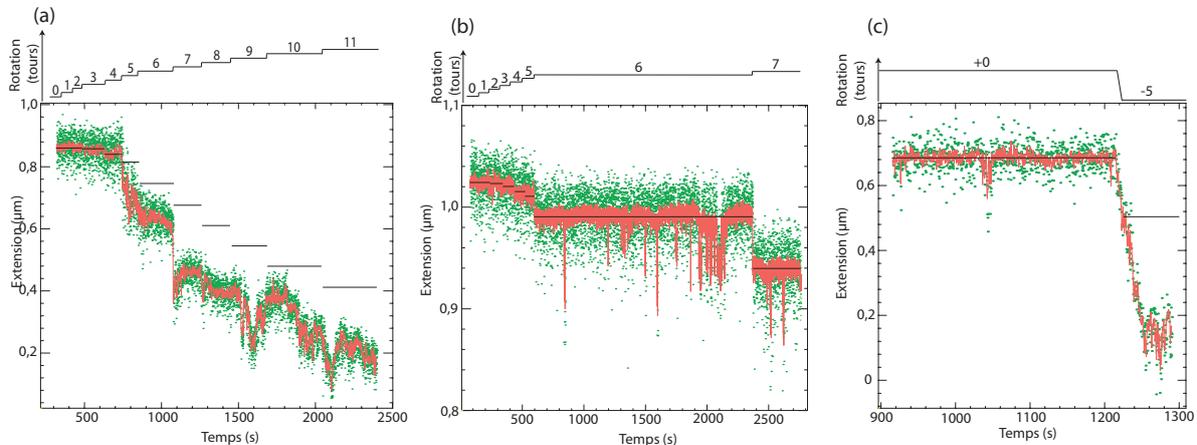


FIGURE 8.11 – Extension d'une molécule d'ADN surenroulable en présence de yISW1a, sans ATP, pour différentes valeurs de rotation : (a) pour des valeurs de rotation positives à 0.5 pN, (b) pour des valeurs de rotation positives à 1.1 pN, (c) pour une valeur de rotation négative à 0.5 pN. Les lignes pleines noires indiquent l'extension de la molécule d'ADN en l'absence d'accrochage de yISW1a.

8.5.2 Affinité de l'accrochage de yISW1a en présence de plectonèmes négatifs

Cette étude est plus difficile à mener car les forces pour lesquelles on observe des structures plectonémiques négatives sont basses (inférieures ou égales à 0.5 pN). Or, à de telles forces, l'accrochage de yISW1a

est aisé même sans ajout de torsion. On a cependant réussi à obtenir, pour plusieurs molécules, des signaux semblables à ceux présentés en figure 8.11(c) : on suit l'extension d'une molécule d'ADN sensible à la torsion en présence de yISW1a, sans ATP, à une force de 0.5 pN. Sans torsion, on a quelques signes d'accrochage (mais les bouffées d'accrochage observées n'excèdent pas 100 nm et ne durent pas plus de 20 s). Dès lors que l'on applique -5 tours, l'extension de la molécule décroît brutalement de 400 nm en moins de 40 s et fluctue alors autour d'un niveau significativement plus faible que sa longueur initiale. On assiste donc à des accrochages multiples dès qu'on a imposé un couple négatif à la molécule, suffisant pour former des plectonèmes.

Les expériences précédentes nous permettent de faire la remarque suivante : que l'on impose une contrainte de torsion positive ou négative à l'ADN, l'accrochage de yISW1a induit systématiquement une réduction de longueur de l'ADN (voir figure 8.11(b) et (c)). Si l'accrochage de yISW1a était accompagné de l'introduction de torsion au sein de la molécule d'ADN (introduction de n tours positifs ou négatifs), la variation de longueur (positive ou négative) de l'extension de l'ADN, notée $\delta\ell_\sigma$, vaudrait :

$$\delta\ell_\sigma = \delta\ell_{\sigma=0} + n\ell_p$$

où $\delta\ell_{\sigma=0}$ est le raccourcissement (négatif) mesuré à $\sigma = 0$ et ℓ_p , la pente de la courbe en chapeau pour la valeur de σ à laquelle on travaille ($\ell_p > 0$ pour $\sigma < 0$ et $\ell_p < 0$ pour $\sigma > 0$). Dans notre cas, on a systématiquement $\delta\ell_\sigma < 0$ quelque soit le signe de σ^d , on en déduit que $|\delta\ell_{\sigma=0}| \gg |n\ell_p|$. Dans notre cas, $|\ell_p| = 67$ nm/tr pour $F = 0.5$ pN, donc $n \ll 1$. En conclusion, s'il y a introduction de torsion lors de l'accrochage de yISW1a sur l'ADN, celle-ci est très modeste. Ceci est très différent de ce que l'on observait pour la formation d'une boucle d'ADN par RSC (en présence d'ATP) : l'extension de l'ADN augmentait pour des valeurs de $\sigma < 0$ et diminuait pour des $\sigma > 0$, ce qui était cohérent avec l'introduction de torsion négative dans la boucle d'ADN formée.

La facilité qu'ont les complexes yISW1a à s'accrocher à l'ADN en présence de plectonèmes pourrait indiquer qu'ils ont besoin, soit d'avoir un ADN relativement courbé pour s'accrocher à celui-ci, soit de contacter, en au moins deux sites, un ADN double brin ce qui est facilité lorsqu'une boucle est préformée, soit encore d'être rapprochés les uns des autres afin d'interagir ensemble et de pouvoir initier un comportement collectif. On a effectué un test supplémentaire allant dans le sens de ces deux dernières interprétations : on a travaillé avec un substrat un peu particulier pour tester si ces complexes sont capables de se lier simultanément à deux molécules d'ADN double brin (soit par l'intermédiaire d'un unique complexe montrant que l'accrochage de yISW1a se fait en contactant deux double brins d'ADN, soit par l'intermédiaire de plusieurs complexes montrant la force des interactions entre complexes). C'est ce que nous présentons dans le paragraphe suivant.

8.6 Les complexes yISW1a sont capables de ponter deux molécules d'ADN double brin

8.6.1 Comportement, en rotation, de deux molécules d'ADN double brin attachées entre une même bille et la surface

Pour réaliser une expérience en pinces magnétiques, on incube au préalable des billes magnétiques avec les molécules d'ADN avec lesquelles on souhaite travailler. On utilise généralement des ratios ADN/bille tels qu'au plus une molécule d'ADN se liera à une bille magnétique. Dans certains cas cependant, il peut être intéressant de manipuler deux molécules accrochées entre une même bille magnétique et la surface

d. Et les amplitudes des réductions d'extension $\delta\ell_p$ semblent comparables quelque soit le signe de σ .

8.6. LES COMPLEXES YISW1A SONT CAPABLES DE PONTER DEUX MOLÉCULES D'ADN DOUBLE BRIN

(voir Figure 8.12(a)).

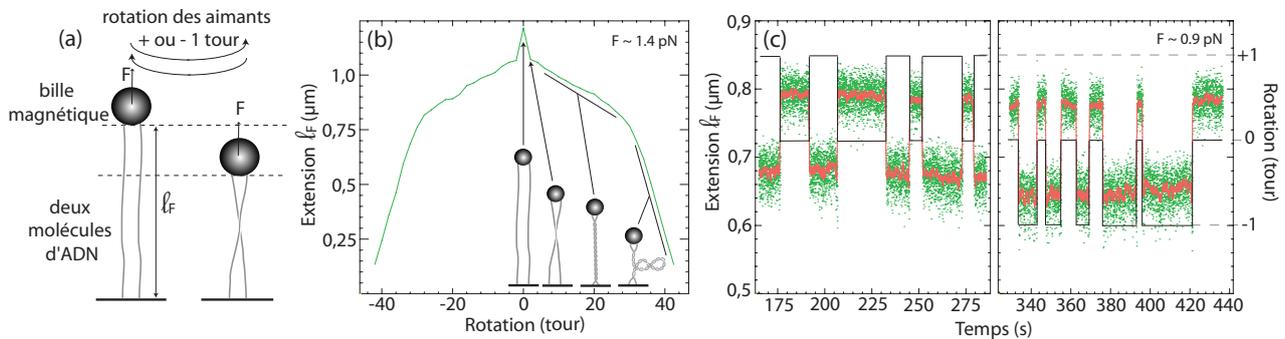


FIGURE 8.12 – (a) Illustration de la réduction de la longueur ℓ_F induite par la rotation d'un tour (positif ou négatif) du couple d'aimants : les deux molécules d'ADN, reliées entre la surface et une même bille, se croisent l'une l'autre. (b) Courbe extension-rotation caractéristique de deux molécules d'ADN reliées entre une surface de verre et une même bille, à $F \sim 1.4 \text{ pN}$. Lorsque, partant d'une contrainte de rotation nulle, on ajoute un tour (positif ou négatif) au système, on observe une brusque réduction de la longueur ℓ_F du fait du croisement des deux molécules. L'ajout de tours supplémentaires induit une diminution plus lente de la longueur ℓ_F , les deux molécules s'enroulant l'une autour de l'autre. Dans un troisième temps, l'ajout de nouveaux tours entraîne le flambage de cette structure vrillée et la réduction de l'extension ℓ_F est plus rapide. (c) Enregistrement de l'extension ℓ_F en fonction du temps pour différentes valeurs de rotation, à 0.9 pN : (à gauche) passage de la rotation 0 à +1, (à droite) passage de la rotation 0 à -1.

Pour favoriser cette configuration, on incube, avec les billes magnétiques, une quantité légèrement supérieure d'ADN (une augmentation d'un facteur 2 à 4 suffit pour augmenter les chances d'observer de telles configurations). On teste la présence d'une telle configuration en exploitant la courbe *en chapeau* de couples de molécules : celle-ci présente une forme bien particulière comme le montre la figure 8.12(b). Quelque soit la force, lorsqu'on applique le premier tour de rotation à la bille, on croise les deux molécules l'une autour de l'autre, il en résulte une grande variation de longueur (qui dépend de la distance entre les points d'attache des deux molécules sur la surface et sur la bille (Charvin et al. (2003))), les tours suivants raccourcissent encore l'extension bout-à-bout du couple de molécules mais plus graduellement puisque les deux molécules ne font que s'enrouler l'une autour de l'autre. La courbe obtenue est symétrique quelque soit la force. Si l'on enregistre l'extension de ce couple d'ADN en imposant tantôt 0, tantôt +1 tour (resp. -1 tour), on obtient les signaux présentés sur la figure 8.12(c) : l'extension du couple de molécule diminue brusquement lorsque l'on passe de 0 à +1 tour (resp. -1 tour) et retrouve instantanément sa valeur dès que l'on revient à 0 tour. Ce type de substrat a été mis à profit pour l'étude de l'activité des Topoisomères (enzymes capables de résoudre un noeud entre deux molécules d'ADN) (Charvin et al. (2003)). Nous allons utiliser ce substrat pour tester l'éventuelle capacité de yISW1a à ponter deux molécules d'ADN.

8.6.2 Les complexes yISW1a sont capables de ponter deux molécules d'ADN

On a répété l'expérience précédente, où l'on impose alternativement 0 et +1 (resp. -1) tour à un couple d'ADN, en présence de yISW1a, sans ATP. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 8.13(a) et (b).

Lorsqu'on induit des croisements positifs (passage de 0 à +1 tour) ou négatifs (0 à -1 tour) entre les deux molécules d'ADN, l'extension ℓ_F diminue instantanément. Lorsque l'on revient par contre à 0 tour,

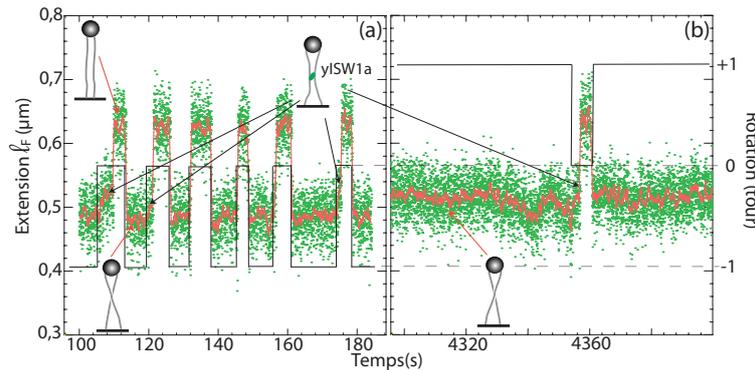


FIGURE 8.13 – Enregistrement de l'extension ℓ_F de deux molécules d'ADN reliées entre une surface de verre et une même bille magnétique, en présence de yISW1a, sans ATP, à $F \sim 0.9$ pN. (a) On applique soit 0, soit -1 tour. (b) On applique soit 0, soit +1 tour. En présence de yISW1a, on a parfois des retards lors du retour à la longueur maximale, à 0 rotation.

l'extension ℓ_F met, dans de nombreux cas, un certain temps avant de retrouver sa valeur initiale (ces retards sont indiqués par des flèches noires sur la figure 8.13). Ceci n'a jamais été observé en l'absence de yISW1a (voir Figure 8.12(c)). Sur 43 croisements négatifs testés, 20 présentent un retard ; sur 31 croisements positifs testés, 5 présentent un retard. Ces retards sont généralement de courte durée (< 1 s) mais peuvent parfois durer jusqu'à plusieurs secondes (le premier retard de la figure 8.13(a) dure près de 7 s.). Le croisement semble donc persister alors que les molécules d'ADN sont décroisées. Deux interprétations sont possibles : (1) un complexe yISW1a est capable de se fixer au niveau du croisement et de se lier à chacune des deux molécules. Lorsque l'on décroise les deux molécules d'ADN, yISW1a maintient, pendant un temps, les deux molécules d'ADN liées, puis se dissocie rapidement d'au moins l'une d'entre elles. (2) Deux complexes yISW1a sont liés, chacun, à une molécule d'ADN au niveau du croisement. Des interactions protéine-protéine, entre ces deux complexes, leurs permettent de ponter les deux molécules d'ADN.

On a fait un dernier test avec ces couples de molécules d'ADN, on a introduit un certain nombre de tours (positifs ou négatifs) afin d'obtenir une "tresse" de deux molécules d'ADN (appelée *braid*) pour voir si cette structure facilitait l'accrochage de complexes yISW1a. On n'a pas observé d'accrochage préférentiel sur ce type de substrat ce qui peut sembler surprenant, à première vue, lorsque l'on sait que les plectonèmes facilitent l'accrochage de yISW1a. En fait, les structures des plectonèmes et de ces braids sont assez différentes : alors que les plectonèmes forment des boucles assez larges, les braids correspondent à une "tresse" de deux molécules d'ADN très structurée et resserrée. Ceci peut gêner l'accrochage des complexes yISW1a.

8.6.3 Activité de yISW1a en présence d'ATP

Les résultats présentés jusqu'alors ont tous été obtenus en l'absence d'ATP. On a souhaité voir si la présence d'ATP modifiait le comportement de yISW1a. On a procédé comme précédemment : on a suivi l'extension de molécules d'ADN insensibles à la torsion, en présence de yISW1a (typiquement 0.2-1 nM), dans le tampon suivant : 10 mM Tris-Acétate pH ~ 7.9 , 3 mM MgOAc, 50 mM KCl, 0.1 mM DTT, 0.2 % BSA auquel on a ajouté 100 μM ATP.

L'extension des molécules d'ADN suivies, en présence de yISW1a et de 100 μM ATP, évolue de ma-

8.6. LES COMPLEXES YISW1A SONT CAPABLES DE PONTER DEUX MOLÉCULES D'ADN DOUBLE BRIN

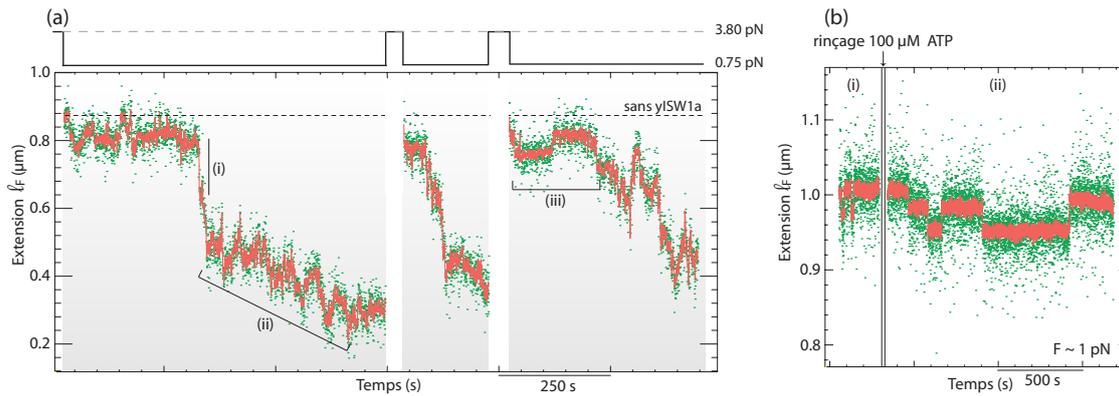


FIGURE 8.14 – (a) Extension, en fonction du temps, d’une molécule d’ADN insensible à la torsion en présence de yISW1a et de $100 \mu\text{M}$ ATP : on observe, à 0.75 pN , une réduction significative de la longueur bout-à-bout de la molécule d’ADN. Cette réduction peut se faire brutalement (i), ou plus progressivement (ii). Ces réductions peuvent également être réversibles (iii). On a fait figurer, en pointillé, l’extension attendue pour la molécule d’ADN en l’absence de tout complexe accroché. (b) Extension, en fonction du temps, d’une molécule d’ADN insensible à la torsion en présence de yISW1a, à $F \sim 1 \text{ pN}$. Trace (i) : en l’absence d’ATP, trace (ii) à $100 \mu\text{M}$ ATP.

nière très similaire à ce que l’on a déjà reporté en l’absence d’ATP. Nous décrivons ici le cas d’une de ces molécules dont le comportement est tout à fait typique (Figure 8.14(a)). A haute force (au delà de 2 pN), l’extension de la molécule d’ADN fluctue, du fait du mouvement brownien, autour d’une valeur moyenne constante^e : dans cette gamme de force, l’extension des molécules d’ADN se comporte comme en l’absence de yISW1a. Dès que l’on porte la force à 0.75 pN , on observe une réduction rapide de l’extension de la molécule d’ADN (Figure 8.14(a)). Cette réduction se fait de manière séquentielle : on observe soit des réductions brutales de l’extension de la molécule ((i) : réduction de 160 nm en 1 s), soit, au contraire, des raccourcissements progressifs de son extension ((ii) : réduction de 350 nm en 320 s). On attribue à nouveau ces réductions de longueur à l’accrochage coopératif de plusieurs complexes yISW1a. L’accrochage de ces complexes est, comme précédemment, réversible comme le montre les événements (iii) : l’extension de la molécule d’ADN oscille entre deux valeurs espacées de $57 \pm 1 \text{ nm}$. Lorsque l’on augmente brutalement la force (typiquement à 4 pN) à partir d’une situation où de nombreux complexes sont accrochés à l’ADN, on observe une augmentation séquentielle de la longueur de l’ADN que l’on attribue au départ des complexes yISW1a, facilité par l’application d’une force de traction élevée^f. L’ensemble de ces comportements est très similaire à ce que l’on observait en l’absence d’ATP (voir la figure 8.1 à titre de comparaison).

Nous avons testé la dépendance des événements individuels en fonction de l’ATP. Comme en l’absence d’ATP, il s’est avéré difficile d’isoler des événements d’accrochage/déaccrochage individuels : la coopérativité de ce comportement est encore très forte en présence d’ATP. Nous avons néanmoins réussi à en isoler quelques uns en procédant de la manière suivante : nous nous sommes d’abord placé en l’absence d’ATP et nous avons cherché des conditions pour lesquelles nous observions, pour une molécule d’ADN particulière, des événements d’accrochage et de décrochage individuels de complexes yISW1a (Figure 8.14(b), Trace (i)), nous avons ensuite rincé abondamment la chambre microfluidique par le même tampon^g auquel

e. Données non présentées ici.

f. Traces non présentées mais très similaires à celles présentées dans la figure 8.3(b).

g. Il s’agissait ici du tampon suivant : 10 mM Tris-Acétate $\text{pH} \sim 7.9$, 50 mM KCl, 3 mM MgOAc, 0.1 mM DTT, 0.2%

nous avons ajouté 100 μM ATP. Les signaux obtenus alors sont présentés dans la trace (ii) de la figure 8.14(b). L'allure des signaux obtenus est très similaire à ce que nous observons sans ATP : l'extension de la molécule d'ADN oscille principalement entre deux niveaux espacés de 32 ± 1 nm lors de l'accrochage ou du décrochage d'un complexe yISW1a. Les réductions de longueur constatées en présence d'ATP sont similaires à celles obtenues en l'absence d'ATP. La dynamique de cet équilibre accrochage/décrochage de yISW1a ne semble pas non plus dépendre de la présence d'ATP : les temps τ_{on} , τ_{off} pendant lesquels le complexe est accroché, respectivement décroché, sont du même ordre de grandeur qu'en l'absence d'ATP.

Nos expériences ne nous ont pas permis de mettre en évidence des différences de comportement de yISW1a sur une molécule d'ADN (sensible ou non à la torsion) en présence ou en l'absence d'ATP. Ceci est en fait cohérent avec des expériences, réalisées en volume, qui montrent que l'activité ATPase de yISW1a (comme celle de yISW1b, yISW2 (Tsukiyama et al. (1999)), CHRAC (Varga-Weisz et al. (1997)) et NURF (Tsukiyama and Wu (1995))) n'est pas stimulée par l'ADN nu ni par des histones en solution. Il semble que ces complexes aient à reconnaître un trait particulier des nucléosomes pour que leur activité ATPase soit stimulée. Cette remarque montre encore une fois tout l'intérêt de mettre au point des protocoles permettant de travailler, en pinces magnétiques, avec des fibres de chromatine (au lieu de molécules d'ADN nues) pour pouvoir sonder cette fois l'activité ATPase de yISW1a.

Résumé des résultats obtenus avec yISW1a sur l'ADN nu

En l'absence d'ATP, et pour des forces ~ 1 pN, yISW1a s'accroche à l'ADN de manière coopérative : l'accrochage de premiers complexes sur une molécule d'ADN facilite l'accrochage des suivants. La coopérativité peut être modulée en jouant sur la force, les conditions ioniques ou en utilisant de l'ADN compétiteur.

L'accrochage d'un complexe yISW1a est réversible et réduit la longueur bout-à-bout de l'ADN de ~ 30 nm. Si une contrainte de torsion est introduite dans la molécule d'ADN suite à l'accrochage de yISW1a, celle-ci est très faible (très inférieure à un tour par événement d'accrochage).

Cet accrochage est facilité par la présence de structures plectonémiques : (1) soit la courbure de l'ADN, dans la région plectonémique, est favorable à l'accrochage de yISW1a, (2) soit les boucles de plectonèmes, rapprochant les brins d'ADN les uns des autres, favorisent l'accrochage de yISW1a en au moins deux sites sur l'ADN, (3) soit les boucles de plectonèmes facilitent les interactions entre plusieurs complexes déjà positionnés le long de l'ADN.

yISW1a est capable de ponter deux molécules d'ADN : (1) soit yISW1a est capable de se lier simultanément à deux molécules d'ADN double brin, (2) soit deux complexes yISW1a, fixés sur chacune des deux molécules, interagissent fortement pour les maintenir pontées.

Le comportement de yISW1a, en présence d'ATP, est très similaire à celui observé sans ATP. Ceci est cohérent avec les expériences de biochimie qui montrent que l'activité ATPase de yISW1a n'est pas stimulée en présence d'ADN nu.

Chapitre 9

Action du facteur de remodelage de la chromatine CHD1 sur l'ADN nu

Sommaire

9.1	Action du complexe CHD1 sur une molécule d'ADN insensible à la torsion	142
9.1.1	En l'absence d'ATP, le complexe CHD1 se lie à l'ADN et induit une diminution de son extension bout-à-bout de l'ordre de 55 nm.	142
9.1.2	Confrontation avec les résultats obtenus en microscopie électronique	143
9.1.3	CHD1 consomme de l'ATP lors d'un processus qui n'implique pas de déformation détectable de la molécule d'ADN	146
9.2	Action du complexe CHD1 sur des molécules sensibles à la torsion	149
9.2.1	L'utilisation de molécules sensibles à la torsion peut nous permettre de préciser la nature de l'interaction entre l'ADN et le complexe CHD1	149
9.2.2	Accrochage de CHD1, en l'absence d'ATP, sur une molécule d'ADN surenroulable, à $\sigma=0$.	149
9.2.3	L'étape d'accrochage de CHD1 sur l'ADN, en l'absence d'ATP, se fait sans génération de torsion détectable.	153
9.2.4	Les études menées en présence d'ATP, sur des molécules d'ADN sensibles à la torsion n'ont pas été très concluantes.	155
	Résumé des principaux résultats obtenus avec CHD1 sur l'ADN nu	156

Le complexe CHD1 de la levure, appartenant à la famille Nurd/Mi-2/Chd, est un facteur de remodelage nettement moins étudié que les précédents auxquels nous nous sommes intéressés (RSC et γ ISW1a). Contrairement à RSC ou aux complexes ISWI de la levure, CHD1 se présente sous la forme d'un monomère. Ceci pourra s'avérer d'un grand intérêt pour l'étude de sa fonction de remodelage : il sera en effet plus facile d'obtenir des mutants de cette protéine unique et de sonder ainsi le rôle fonctionnel des différents domaines de CHD1. Pour sonder l'action de CHD1 sur l'ADN nu, nous avons procédé d'une manière très similaire à ce qui a déjà été présenté pour le complexe γ ISW1a : on a testé son action sur des molécules d'ADN insensibles et sensibles à la torsion, en l'absence et en présence d'ATP.

Nous allons, dans ce chapitre, présenter les principaux résultats obtenus pour CHD1. Malheureusement, il s'est avéré très délicat de travailler avec ce complexe en pinces magnétiques : comme dans le cas de γ ISW1a, CHD1 présente une activité coopérative marquée. On obtient facilement des signaux caractéristiques de la présence de CHD1, par contre, ils sont le plus souvent très difficiles à interpréter proprement. Les données brutes que l'on a pu analyser sans ambiguïté restent, elles, peu nombreuses. Nous avons choisi de présenter l'ensemble des résultats obtenus, même s'il ne nous est pas possible d'en avoir une interpré-

tation globale pour le moment.

9.1 Action du complexe CHD1 sur une molécule d'ADN insensible à la torsion

9.1.1 En l'absence d'ATP, le complexe CHD1 se lie à l'ADN et induit une diminution de son extension bout-à-bout de l'ordre de 55 nm.

On suit l'extension de molécules d'ADN, insensibles à la torsion, que l'on met en présence du complexe CHD1 en l'absence d'ATP (Figure 9.1(a)). Le tampon habituel dans lequel nous menons les expériences est le suivant : 10 mM Hepes pH~7.3, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT et 0.2 % BSA. L'expérience est réalisée à 29°C. En l'absence de CHD1, la valeur moyenne de l'extension de la molécule d'ADN reste constante à force fixée, l'extension de la molécule ne faisant que fluctuer, à cause du mouvement brownien, autour de cette valeur moyenne constante. Lorsque l'on ajoute le facteur de remodelage CHD1 (typiquement 10 nM), la situation est toute autre : à haute force (> 1.5 pN), la valeur moyenne de l'extension de la molécule reste constante, par contre, dès que l'on diminue suffisamment la force, l'extension bout-à-bout de la molécule diminue très rapidement. La figure 9.1(b) montre une trace typique obtenue après avoir ajouté CHD1, en l'absence d'ATP, et après avoir abaissé brutalement la force à 0.8 pN. L'extension de la molécule d'ADN reste d'abord constante (zone (i)), puis des complexes CHD1 s'accrochent en cascade (zone (ii)) : on observe une réduction totale de 420 nm environ en un peu plus de 7 min. La bille arrive ensuite à proximité de la surface du capillaire. Ici, des interactions non spécifiques collent rapidement la bille sur la surface du capillaire et les fluctuations browniennes de la bille sont alors significativement réduites (zone (iii)). Ce comportement est très semblable à celui déjà décrit pour le complexe yISW1a où l'on assistait à un accrochage coopératif des complexes sur les molécules d'ADN.

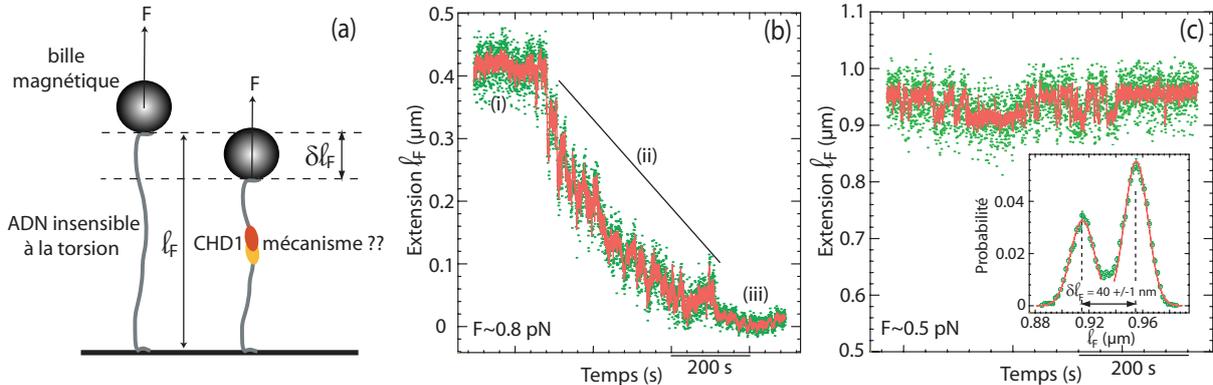


FIGURE 9.1 – (a) Représentation schématique de l'expérience réalisée : on suit l'extension bout-à-bout l_F d'une molécule d'ADN insensible à la torsion en présence de CHD1 et en l'absence d'ATP. (b) Trace typique obtenue lorsque l'on suit l'extension l_F d'une molécule d'ADN insensible à la torsion, à 0.8 pN, en présence de CHD1 sans ATP. L'extension de la molécule est brutalement réduite jusqu'à ce que la bille finisse par se coller sur la surface du capillaire. (c) Trace typique obtenue lorsqu'on arrive à se placer dans des conditions pour lesquelles on observe des signaux individualisés. Ici, la force vaut 0.5 pN et les conditions de tampon sont les suivantes : 10 mM Hepes pH~7.3, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT et 0.2 % BSA. L'extension de la molécule d'ADN oscille entre deux niveaux distants de $\delta l_F = 40 \pm 1$ nm.

Comme pour le complexe yISW1a, nous avons souhaité obtenir des signaux d'accrochage/déaccrochage individualisés afin de pouvoir caractériser plus précisément ce phénomène. Nous avons procédé comme pour yISW1a : nous avons joué sur les conditions de tampon, sur la force de traction, nous avons ajouté de l'ADN compétiteur, réduit au maximum la quantité de CHD1 introduite dans la chambre microfluidique. Ceci nous a permis d'obtenir des signaux individualisés dont nous présentons une trace typique dans la figure 9.1(c). Précisons encore une fois que l'obtention de tels signaux est rare et délicate. Tous les signaux individuels obtenus avec CHD1, en l'absence d'ATP, sont semblables à ceux présentés dans la figure 9.1(c) : on observe, à force constante (ici 0.5 pN), une succession de brusques réductions de l'extension de la molécule d'ADN suivies de retours, tout aussi brusques, vers l'extension ℓ_F de départ. Dans le cas du signal présenté, on a construit la distribution de l'extension de la molécule d'ADN (présentée dans l'encart de la figure 9.1(c)), on identifie ainsi deux tailles caractéristiques distantes de $\delta\ell_F=40\pm 1$ nm. Nous avons construit de telles distributions pour l'ensemble des signaux individuels recueillis avec CHD1, sans ATP, à $F\sim 0.5$ pN. Après correction par le facteur de force λ_{WLC} , ceci nous a permis de déterminer la taille caractéristique $\delta\ell$ des réductions de l'extension bout-à-bout d'une molécule d'ADN, insensible à la torsion, consécutivement à l'accrochage de CHD1, à $F\sim 0.5$ pN : on trouve une taille de $\delta\ell=53\pm 4$ nm^a (pour 20 distributions analysées, semblables à celle présentée dans l'encart de la figure 9.1(c)).

Les expériences pour lesquelles nous avons obtenu des signaux individualisés, pour des ADN insensibles à la torsion, en l'absence d'ATP, n'ont été menées qu'à une seule force ($F \sim 0.5$ pN) : il ne nous est donc pas possible de prédire une éventuelle dépendance en force de ces signaux, dans ces conditions. Nous avons, par contre, obtenu des signaux pour des forces variées, en présence d'ATP ou sur des molécules surenroulables. Nous y reviendrons par la suite.

9.1.2 Confrontation avec les résultats obtenus en microscopie électronique

Nous avons souhaité conforter ces résultats par l'observation directe de l'accrochage du complexe CHD1 sur l'ADN en l'absence d'ATP, en microscopie électronique. Les clichés de microscopie électronique ont été réalisés par C. Lavelle, à l'IGR (Villejuif). Les résultats présentés ici sont malheureusement trop peu nombreux pour pouvoir proposer des statistiques indiscutables caractérisant le comportement de CHD1 sur l'ADN en l'absence d'ATP^b. Nous avons cependant pris le parti de les présenter, car ils permettent de prévoir quelques tendances qu'il faudra bien sûr confirmer par la suite, en multipliant les clichés de microscopie pour affiner les résultats.

9.1.2.1 Contrôle de l'homogénéité de taille des fragments d'ADN de 357 pb utilisés pour l'étude de l'accrochage de CHD1

On va étudier l'accrochage de CHD1, en l'absence d'ATP, sur de petits fragments d'ADN de 357 pb. On réalise d'abord un contrôle en imageant les fragments d'ADN seuls, dans le tampon que l'on utilisera par la suite lorsqu'on travaillera avec CHD1^c : la figure 9.2(a) présente un des clichés obtenus. La mesure des contours des molécules d'ADN permet de tracer la distribution de taille de ces fragments d'ADN : la figure 9.2(b) représente les tailles de 103 molécules d'ADN imagées, l'encart fournit la distribution de ces

a. La taille caractéristique trouvée avant correction par le facteur de force vaut $\delta\ell_F=42\pm 3$ nm. Le facteur de correction, à $F=0.5$ pN, vaut $\lambda_{WLC}=0.796$, on obtient donc la valeur proposée : $\delta\ell=53\pm 4$ nm.

b. Le chercheur avec lequel nous collaborions étroitement, C. Lavelle, a été recruté sur un poste CNRS à Lille au cours de cette étude, et il nous a été, à partir de ce moment, plus difficile de travailler ensemble sur ce projet de microscopie.

c. Le tampon utilisé ici pour étudier l'accrochage de CHD1 et pour l'étalement des échantillons sur la grille de carbone a la composition suivante : 50 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, 3 mM MgCl₂.

tailles. On obtient une distribution gaussienne relativement piquée, centrée autour de la valeur moyenne 357 ± 2 pb. Les fragments d'ADN de cette préparation sont très homogènes en taille.

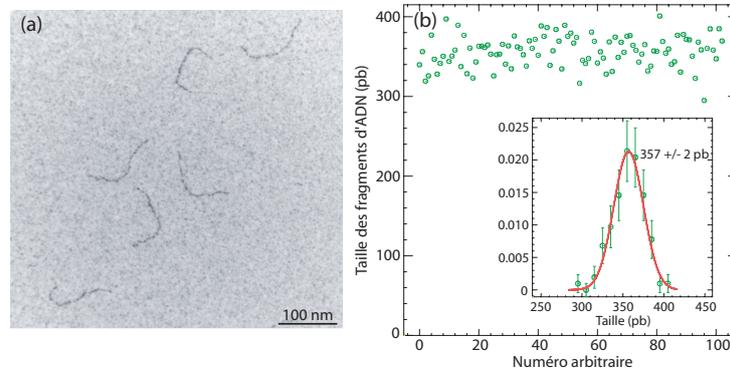


FIGURE 9.2 – (a) Cliché de microscopie électronique (grossissement $\times 85000$) de fragments d'ADN de 357 pb étalés dans le tampon : 50 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, 3 mM $MgCl_2$. (b) Taille et distribution de taille de ces fragments d'ADN : leur taille moyenne vaut 357 ± 2 pb.

9.1.2.2 Accrochage de CHD1 sur de courts fragments d'ADN double brin

Obtention, en microscopie électronique, de conditions *ad hoc* pour lesquelles on observe un seul complexe CHD1 par fragment d'ADN. Nous avons mis en présence 4 ng d'ADN (fragments de 357 pb) avec 0.1 μg de CHD1 dans 5 μL final (tampon de réaction : 50 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, 3 mM $MgCl_2$). On laisse incuber 3 minutes le mélange puis on étale la préparation sur une grille de carbone, après une dilution au 1/5ème dans le tampon de réaction. Les figures 9.3(a) et (b) présentent quelques clichés typiques obtenus.

Les clichés obtenus lors de cette expérience révèlent la présence d'un fond relativement propre (très peu de complexes restent libres) sur lequel on détecte, soit des molécules d'ADN vierges de tout complexe, soit, au contraire, des fragments d'ADN sur lesquels se trouve un amas dense aux électrons, que l'on identifie à CHD1 (Figures 9.3(a) et (b)). Les fragments d'ADN possédant plus d'un complexe sont très rares. Ceci contraste nettement avec ce que l'on observe, en pinces magnétiques, à savoir un accrochage coopératif des complexes CHD1 sur l'ADN. Il faut garder à l'esprit que les conditions expérimentales entre ces deux techniques diffèrent : le ratio ADN/CHD1 est très différent entre les deux expériences (on travaille typiquement avec la même quantité de CHD1, mais ici, la quantité d'ADN est près de 1000 fois supérieure à celle que l'on estime dans le dispositif des pinces magnétiques) et ce ratio est plus facile à contrôler en microscopie électronique : on peut travailler avec des concentrations assez élevées et dans de petits volumes lors de la mise en présence des partenaires (ADN/CHD1), facilitant ainsi une éventuelle interaction entre les deux partenaires, on dilue ensuite de manière significative la préparation avant de l'observer. Cette étape de dilution peut venir déstabiliser partiellement les interactions qui s'étaient naturellement formées à plus haute concentration. Enfin, les fragments d'ADN que l'on étudie en microscopie ne sont pas dans le même état (ils sont ici libres en solution et aucune force ne s'applique sur ceux-ci) mais ce dernier argument aurait plutôt tendance à justifier un effet inverse, la force travaillant contre l'accrochage des complexes CHD1.

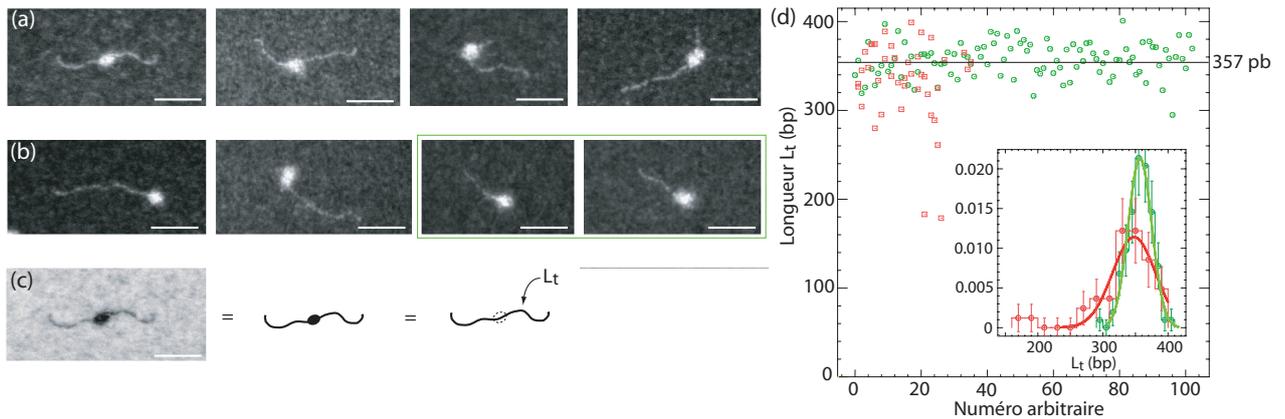


FIGURE 9.3 – Clichés de microscopie électronique de fragments d’ADN de 357 pb mis en présence de CHD1, sans ATP. (a) Le complexe CHD1 occupe une position centrale sur le fragment d’ADN. La barre correspond à 50 nm. (b) Le complexe CHD1 est localisé aux extrémités du fragment d’ADN. La barre correspond à 50 nm. (c) On schématise la façon dont on mesure la longueur de contour L_t en présence du complexe CHD1. (d) Mesures des longueurs L_t en l’absence de complexe CHD1 (ronds verts) et en présence de CHD1 (carrés rouges). L’encart présente les distributions de taille de L_t en l’absence de CHD1 (courbe verte) et en présence de CHD1 (courbe rouge).

CHD1 n’adopte pas de position privilégiée le long de l’ADN. En présence de CHD1 sans ATP, nous observons deux types de substrats majoritaires : des fragments d’ADN nus de 357 pb semblables à ceux étudiés lors du contrôle, et des fragments d’ADN sur lesquels est positionné un unique amas dense aux électrons et que l’on associe à un complexe CHD1. Il est difficile d’assurer avec certitude que cet amas correspond à un unique facteur CHD1 : en effet, les tailles de protéines que l’on pourrait mesurer sur des clichés obtenus en microscopie électronique peuvent s’avérer trompeuses (l’allure d’une protéine, en microscopie électronique, dépend fortement de la façon dont celle-ci fixe l’acétate d’uranyle).

Ces amas occupent soit une position centrale sur les fragments d’ADN (Figure 9.3(a), 33 sur 41 clichés, soit près de 80 %), soit sont localisés aux extrémités (Figure 9.3(b), 8 sur 41 clichés étudiés, soit près de 20 %). Ceci est cohérent avec un positionnement aléatoire du facteur CHD1 le long du fragment d’ADN : en effet, le facteur de remodelage CHD1 a un poids moléculaire voisin de 240 kDa, il a donc une taille caractéristique de l’ordre de 15 nm. S’il se positionne de manière aléatoire le long du fragment d’ADN, il aura une probabilité voisine de $2 \cdot \frac{15}{122} \sim 0.24$ de se trouver aux extrémités d’un fragment d’ADN de 357 pb (soit 122 nm). On aura donc autour de 25 % de chance de trouver CHD1 à une extrémité et 75 % de chance de le trouver dans une position centrale, ce qui est cohérent avec les observations réalisées.

La majorité des complexes CHD1 accrochés sur l’ADN ne provoquent pas de raccourcissement significatif de sa longueur bout-à-bout. On a mesuré ensuite le contour, noté L_t , des fragments d’ADN sur lesquels se trouvait CHD1 de la manière indiquée sur la figure 9.3(c) : on suit le contour du fragment d’ADN visible, et on lui ajoute le diamètre du complexe CHD1. La figure 9.3(d) présente les mesures réalisées dans ces conditions : les carrés rouges correspondent aux longueurs L_t des fragments d’ADN portant un complexe CHD1 ; à titre de comparaison, on a fait également figurer les longueurs mesurées dans le cas de fragments d’ADN seuls (ronds verts). Le nombre de clichés analysés, dans le cas des fragments complexés avec CHD1, est modeste : nous ne disposons malheureusement que de 41 images.

Nous ne pouvons, dans ces conditions, proposer des résultats définitifs. Nous pouvons néanmoins faire quelques remarques (qu'il faudrait vérifier en augmentant le nombre d'images traitées) : la distribution de longueur L_t , en présence de CHD1, est centrée sur une valeur proche de celle obtenue pour des ADN nus (voir l'encart de la figure 9.3(d)). Le fait que les valeurs moyennes des distributions coïncident suggère que le complexe CHD1 peut se lier à l'ADN d'une façon qui ne perturbe pas l'extension bout-à-bout du fragment d'ADN : dans cette configuration, il pourrait se lier à l'ADN par un site de fixation unique et ne pas provoquer de perturbation significative du chemin emprunté par l'ADN. L'adoption d'une telle configuration n'est pas détectable en pinces magnétiques puisqu'elle n'entraîne pas de variation de la longueur bout-à-bout de l'ADN.

De très rares images suggèrent que le complexe CHD1 peut éventuellement piéger autour de 60 nm d'ADN lors de son accrochage à l'ADN. Notons cependant que certaines longueurs L_t sont significativement plus courtes que toutes celles mesurées en l'absence de complexe CHD1, et sortent nettement de la distribution principale centrée au voisinage de 357 pb. Les deux molécules d'ADN, encadrées en vert dans la figure 9.3(b), ont des longueurs L_t voisines de 180 pb, soit une réduction de l'ordre de 60 nm par rapport à la situation sans CHD1. Aucune molécule de cette longueur n'a été identifiée dans la préparation sans CHD1, mais nous ne saurions affirmer que ces deux molécules représentent un comportement significatif^d. Aux vues des résultats obtenus en pinces magnétiques, il serait tentant de faire correspondre ces deux situations à l'adoption, par CHD1, d'une configuration dans laquelle le complexe piège 60 nm d'ADN, induisant une réduction de la longueur bout-à-bout du fragment d'ADN. On s'attend à ce que l'observation d'une telle configuration soit rare vu la difficulté que l'on a, en pinces magnétiques, à l'observer. Encore une fois, nous souhaitons rester prudent sur ces quelques résultats : rien ne peut être avancé avec certitude sans obtenir davantage d'images à analyser.

9.1.3 CHD1 consomme de l'ATP lors d'un processus qui n'implique pas de déformation détectable de la molécule d'ADN

9.1.3.1 Une étude en volume indique que l'activité ATPase de CHD1 est stimulée par la présence d'ADN nu

L'équipe de T. Owen Hughes, avec laquelle nous collaborons et qui nous fournit les facteurs de remodelage que nous analysons, a étudié en volume la stimulation de l'activité ATPase du facteur CHD1 et de plusieurs de ses mutants (Figure 9.4(a)), en fonction de différents substrats. Elle a montré que l'activité ATPase de CHD1 était davantage stimulée par un substrat nucléosomal que par de l'ADN nu. La stimulation de l'activité ATPase de CHD1 par l'ADN nu est, elle, modeste mais aisément détectable : l'expérience consiste à mettre en présence des molécules d'ADN nues et des complexes CHD1, en présence de 1 mM d'ATP radioactif. On mesure ensuite la quantité de phosphate radioactif libérée par l'hydrolyse de l'ATP, ce qui nous donne directement une mesure de l'activité ATPase du complexe en solution. L'histogramme présenté sur la figure 9.4(b) présente la quantité de phosphate radioactif ainsi libéré, en présence (bleu) ou en l'absence (rouge) d'ADN, lorsque l'on met le complexe CHD1 ou différents de ses mutants en présence de 1 mM ATP. L'activité ATPase de CHD1 est stimulée par un facteur deux en présence d'ADN nu. Remarquons qu'il pourrait être avantageux de travailler avec certains mutants de CHD1 (notamment $\Delta N176$ ou $\Delta N261$) pour étudier leur comportement en présence d'ATP vu que leur activité ATPase est

d. D'autant plus que, pour ces deux exemples, le complexe CHD1 est localisé à l'une des extrémités du fragment d'ADN. On ne peut complètement exclure un comportement singulier du complexe CHD1 du fait de la présence des extrémités du fragment d'ADN.

bien mieux stimulée que celle de CHD1 en présence d'ADN nu (par un facteur proche de 5 pour le mutant $\Delta N261$).

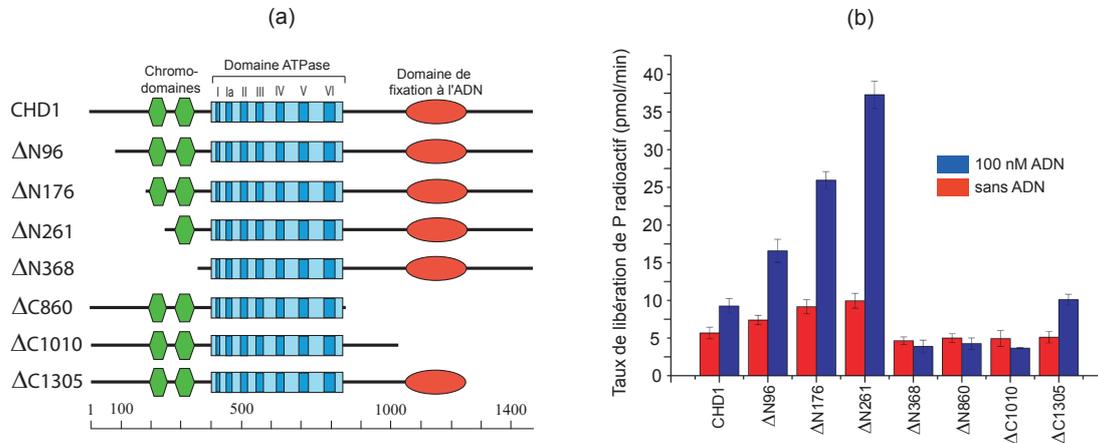


FIGURE 9.4 – (a) Mutants de CHD1 purifiés dans l'équipe de T. Owen Hughes : les mutants de CHD1 sont obtenus par troncation de certains domaines fonctionnels de la protéine sauvage. (b) Mesure de l'activité ATPase de CHD1 et de quelques uns de ses mutants, en présence d'ADN nu, à 1 mM ATP. Expériences faites par l'équipe de T. Owen Hughes.

Nous allons essayer de voir si nous sommes capables de détecter l'activité ATPase de CHD1 sur l'ADN nu, en pinces magnétiques. Pour que cela soit possible, il faut que le processus qui consomme l'ATP, entraîne une déformation de la molécule d'ADN suffisante pour que la variation de son extension bout-à-bout soit détectable.

9.1.3.2 La présence d'ATP ne modifie pas les signaux observés précédemment, à savoir une réduction transitoire de l'extension d'une molécule d'ADN insensible à la torsion

On a souhaité voir si la présence d'ATP perturbait l'allure des signaux obtenus précédemment. On suit donc l'extension bout-à-bout d'une molécule d'ADN insensible à la torsion, en présence de CHD1, dans le même tampon que précédemment^e auquel on a ajouté 1 mM ATP. Comme en l'absence d'ATP, dès que l'on diminue la force jusqu'à une valeur voisine de 1 pN, on observe une réduction très importante de la longueur bout-à-bout de la molécule d'ADN. Cette réduction se fait d'une manière très similaire à la trace présentée sur la figure 9.1(b). Dans certains cas, on arrive à isoler, comme précédemment, des signaux individualisés correspondant à un raccourcissement transitoire de la longueur bout-à-bout de la molécule d'ADN. La figure 9.5(a) présente une telle trace, obtenue à $F=1.3$ pN et à 1 mM ATP. On peut construire l'histogramme donnant la distribution de longueur de la molécule d'ADN pour cet extrait (encart de la Figure 9.5(a)) : la taille caractéristique du raccourcissement induit par l'accrochage de CHD1, après correction par le facteur de force, vaut $\delta\ell=49.1\pm 2.9$ nm^f. Cette valeur est très similaire à celles mesurées en l'absence d'ATP. On a multiplié les acquisitions à différentes forces comprises entre 0.6 et 1.6 pN et différentes concentrations d'ATP (0, 10 et 1000 μ M). Dans toutes les conditions explorées, l'allure

e. 10 mM Hepes pH~7.3, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT et 0.2 % BSA

f. $\delta\ell_F=42.9\pm 2.5$ nm et $\lambda_{WLC}=0.874$ à $F=1.3$ pN.

9.1. ACTION DU COMPLEXE CHD1 SUR UNE MOLÉCULE D'ADN INSENSIBLE À LA TORSION

des signaux individualisés est toujours la même : la mesure de la taille des réductions $\delta\ell$ pour différentes valeurs de force n'a pas permis de détecter une éventuelle dépendance en la force, au moins dans la gamme 0.6-1.6 pN (Figure 9.5(b)), de même, une mesure de $\delta\ell$, pour des concentrations en ATP de 0, 10 et 1000 μM n'a pas révélé une dépendance significative avec la concentration en ATP (Figure 9.5(c)).

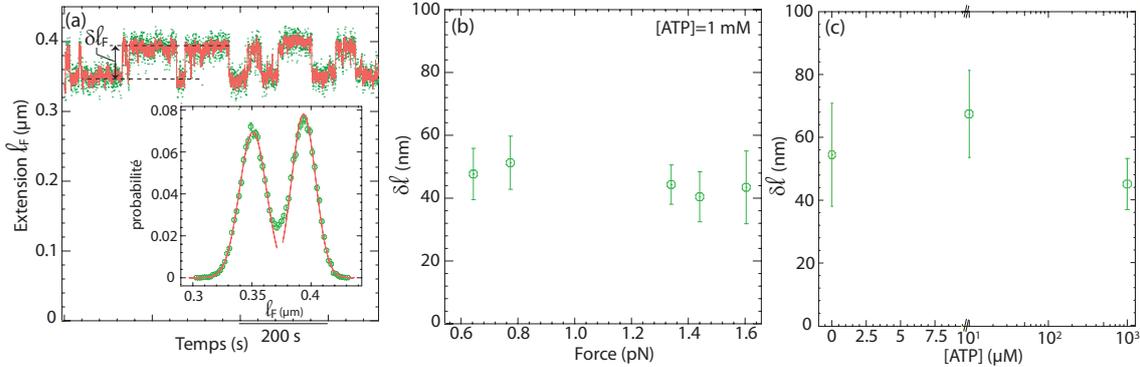


FIGURE 9.5 – (a) Suivi de l'extension d'une molécule d'ADN insensible à la torsion, à $F=1.3$ pN, en présence de CHD1 et de 1 mM ATP. Les données vertes correspondent aux données brutes, la courbe rouge aux données moyennées sur 0.25 s. L'extension de l'ADN alterne entre deux longueurs distantes de $\delta\ell_F=42.9\pm 2.5$ nm comme l'indique la distribution de taille représentée dans l'encart. (b) Taille $\delta\ell$ de la réduction de la longueur bout-à-bout de la molécule d'ADN, après correction par le facteur de force λ_{WLC} , en fonction de la force à 1 mM ATP. $\delta\ell$ ne dépend pas de la force. (c) Taille $\delta\ell$ de la réduction de la longueur bout-à-bout de la molécule d'ADN, après correction par le facteur de force λ_{WLC} , à 0, 10 et 1000 μM ATP. Note : l'échelle des abscisses est d'abord linéaire puis logarithmique.

L'ensemble de ces premiers résultats nous permet de formuler une conclusion partielle :

Les expériences de microscopie électronique révèlent que CHD1 peut se lier à l'ADN, en l'absence d'ATP, sans déformer celui-ci de manière détectable. En pinces magnétiques, on montre que CHD1 peut basculer, de manière réversible, dans une configuration dans laquelle il réduit l'extension d'une molécule d'ADN, insensible à la torsion, de ~ 55 nm^g. Ce processus est très coopératif : l'allure des signaux généralement observés en pinces magnétiques (pour $F\sim 1$ pN) correspond à une réduction séquentielle et de grande amplitude de l'extension de l'ADN du fait de l'accrochage successif de plusieurs complexes CHD1. En présence d'ATP, l'ensemble de ces observations reste vérifié, et on n'observe pas de manifestations supplémentaires propres à la présence d'ATP, lorsque l'on suit l'extension bout-à-bout d'une molécule d'ADN en présence de CHD1. Le processus qui consomme de l'ATP, dans les expériences de biochimie, n'implique donc pas de déformations de la molécule d'ADN insensible à la torsion, qui soient détectables en pinces magnétiques.

g. Tout du moins pour des forces comprises entre 0.5 et 1.6 pN.

9.2 Action du complexe CHD1 sur des molécules sensibles à la torsion

9.2.1 L'utilisation de molécules sensibles à la torsion peut nous permettre de préciser la nature de l'interaction entre l'ADN et le complexe CHD1

Les pinces magnétiques permettent d'appliquer une contrainte de torsion sur une molécule d'ADN intacte. Ceci peut s'avérer ici d'un grand intérêt pour préciser le mécanisme d'action de CHD1 sur l'ADN : les images de microscopie électronique suggèrent que le complexe s'associe d'abord à l'ADN sans provoquer de déformation notable de celui-ci. Ceci pourrait être la première étape de reconnaissance de l'ADN par le complexe CHD1. Le dispositif des pinces magnétiques complète cette vue en montrant que CHD1 est capable de déformer la molécule d'ADN par un mécanisme passif, entraînant une réduction voisine de 55 nm de sa longueur bout-à-bout, à 0.5 pN. Des expériences en volume montrent que de l'ATP est consommé par CHD1 en présence d'ADN, sans qu'il soit possible de détecter des variations supplémentaires de l'extension de la molécule d'ADN. Le processus associé à la consommation d'ATP n'est pas détectable sur des molécules insensibles à la torsion, en pinces magnétiques. Néanmoins, si le complexe est capable de générer de la torsion, soit au cours de l'étape qui réduit la longueur bout-à-bout de l'ADN, soit au cours du processus ATP-dépendant, on peut espérer le détecter en travaillant à présent sur des molécules surenroulables.

9.2.2 Accrochage de CHD1, en l'absence d'ATP, sur une molécule d'ADN surenroulable, à $\sigma=0$.

On suit l'extension d'une molécule d'ADN de 1,2 μm de long, sensible à la torsion, dans le même tampon que précédemment^h. On commence par construire les courbes en chapeau (extension-rotation) pour repérer le centre de rotation de la molécule d'ADN que l'on étudie : la figure 9.6(a) présente un jeu de courbes en chapeau, obtenu pour l'une des molécules que l'on suit par la suite. On se place à une valeur de rotation nulle ($\sigma = 0$), on tire fort sur la molécule ($F > 2$ pN) et on introduit, dans la chambre microfluidique, environ 10 nM de CHD1. On suit alors l'extension de la molécule d'ADN lorsqu'on abaisse peu à peu la force. Comme dans le cas des molécules insensibles à la torsion, les signaux que l'on a le plus fréquemment correspondent à une réduction significative de l'extension de la molécule, réduction que l'on associe à l'accrochage successif de multiples complexes. La figure 9.6(b) présente une telle trace, obtenue pour $\sigma = 0$, sans ATP et $F = 0.35$ pN : dans ce cas, la longueur de la molécule d'ADN est réduite de 490 nm en l'espace de 20s, la bille est alors proche du sol et le mouvement brownien de celle-ci est réduit.

Plus rarement, on a réussi à se placer dans des conditions où les signaux étaient individualisés ce qui nous a permis d'en faire une étude plus quantitative. Encore une fois, la fréquence d'apparition de tels signaux est faible, mais leur allure est tout à fait caractéristique : il s'agit, comme dans le cas des molécules insensibles à la torsion, de brusques réductions de longueur suivies d'un retour à la longueur de départ, tout aussi rapide. Nous avons fait 137 mesures de la taille $\delta\ell$ de ces réductionsⁱ. La dynamique du passage de l'état décroché à l'état accroché est très variable : pour une même molécule d'ADN que l'on suit dans des conditions données (ici, $F \sim 0.45$ pN et sans ATP), nous avons obtenu aussi bien des passages très lents d'un état à l'autre, comme le montre la figure 9.6(c) (on peut rester plusieurs minutes dans un état avant de rebasculer vers l'autre), que des signaux fluctuants extrêmement rapidement entre ces deux états, comme le montre la figure 9.6(d) (ici, on reste typiquement quelques secondes avant de rebasculer). Le nombre modeste d'évènements que nous observons ne nous permet pas de dire quoique ce soit de fiable quant à une dépendance éventuelle de la dynamique d'accrochage de CHD1 avec la force ou la concentration en

h. 10 mM Hepes pH \sim 7.3, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.2% BSA, 0.1 mM DTT.

i. Obtenus pour 8 molécules différentes. Nous avons obtenu des signaux sur un nombre bien supérieur de molécules, mais seules ces traces présentaient un nombre conséquent de signaux mesurables proprement.

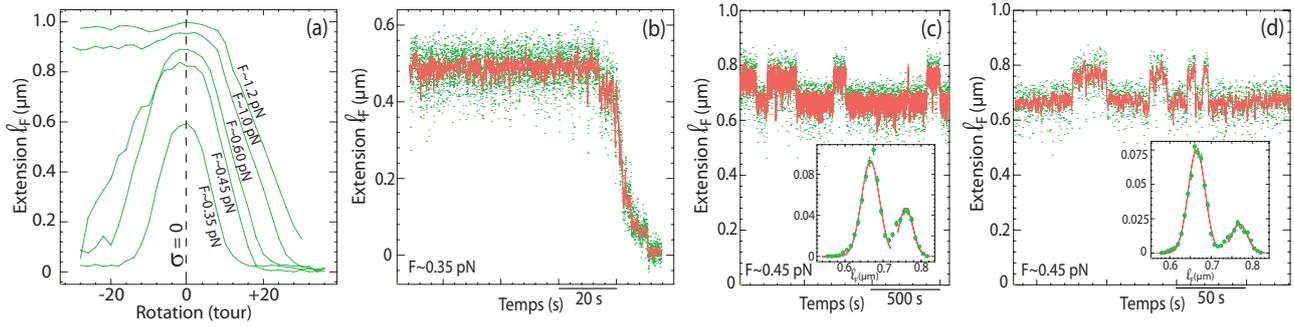


FIGURE 9.6 – (a) Jeu de courbes en chapeau obtenu pour une molécule d’ADN de $1,2 \mu\text{m}$, pour des forces comprises entre $0,35$ et $1,2 \text{ pN}$. (b) Suivi de l’extension bout-à-bout d’une molécule d’ADN surenroulable, à $\sigma=0$ et $F=0,35 \text{ pN}$, en présence de CHD1, sans ATP : la longueur ℓ_F est réduite très rapidement du fait de l’accrochage de multiples complexes CHD1. (c) et (d) Extension d’une même molécule d’ADN surenroulable ($\sigma=0$) en présence de CHD1, sans ATP : celle-ci oscille entre deux valeurs, soit avec une assez longue constante de temps (cas (c)), soit plus rapidement (cas (d)). Les histogrammes montrent que la différence de longueur entre les deux niveaux est la même dans les deux cas ($\delta\ell_F \sim 95 \text{ nm}$).

ATP.

Ces 137 mesures correspondent à différentes conditions de force, on a donc, au final, peu de mesures à force donnée. Nous avons choisi de présenter les résultats bruts que nous obtenons même si leur interprétation reste délicate : la figure 9.7(b) montre toutes les mesures des longueurs $\delta\ell^j$ faites à différentes forces sur des molécules sensibles à la torsion, à $\sigma=0$ et sans ATP.

9.2.2.1 Difficultés de l’interprétation de ces mesures

Les trois forces pour lesquelles nous avons obtenu le plus de données sont comprises entre $0,4$ et $0,6 \text{ pN}$, soit un très petit intervalle de forces. Les mesures faites ici sont relativement dispersées : la valeur moyenne des mesures vaut $113 \pm 27 \text{ nm}$ à $0,4 \text{ pN}$ (37 mesures), $87 \pm 11 \text{ nm}$ à $0,55 \text{ pN}$ (36 mesures), et $63 \pm 10 \text{ nm}$ à $0,6 \text{ pN}$ (39 mesures). Ces informations ainsi que la dispersion générale des mesures de $\delta\ell$ en fonction de la force (Figure 9.7(b)) pourraient laisser penser qu’il y a ici une dépendance de la taille $\delta\ell$, avec la force : la figure 9.7(b) suggère que la valeur de $\delta\ell$ décroît avec la force. Cependant, une telle possibilité est difficile à vérifier par l’analyse de nos données et ce, pour plusieurs raisons :

1. Nous possédons trop peu de données pour calculer, sur un intervalle de force suffisant, la valeur moyenne de $\delta\ell$ à force donnée. En effet, les données les plus fiables (c’est-à-dire les valeurs de force pour lesquelles nous avons le plus de mesures de $\delta\ell$) sont concentrées dans un très petit intervalle de forces ($0,4\text{-}0,6 \text{ pN}$), et, pour les valeurs de force les plus extrêmes, pour lesquelles nous observons toujours des signaux, nous ne disposons que de 3-4 mesures qui, en plus, sont très dispersées.

2. Les molécules que nous utilisons pour cette étude sont des molécules courtes (ici $1,2 \mu\text{m}$). Il ne nous est pas possible de calibrer proprement la force pour chacune des molécules étudiées^k. En pratique,

j. Toutes les mesures faites ont été corrigées par le facteur de force λ_{WLC} afin de pouvoir comparer l’amplitude de ces réductions de taille, à différentes forces.

k. Pour que la mesure de force soit correcte, il faut que le spectre lorentzien des fluctuations transverses de la bille

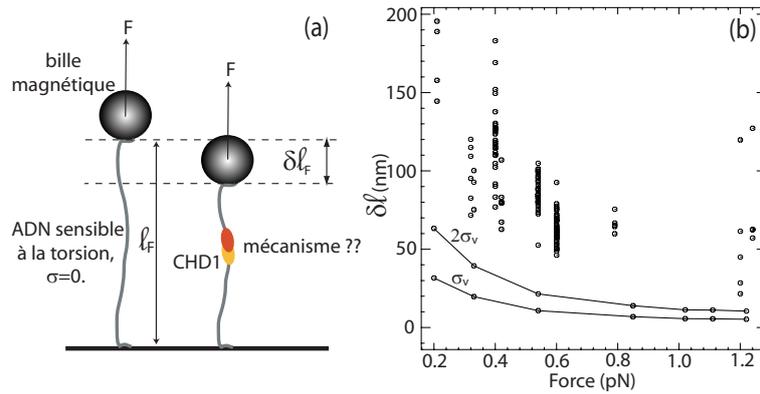


FIGURE 9.7 – (a) Illustration schématique de l'étude de l'accrochage de CHD1 sur une molécule d'ADN sensible à la torsion, à $\sigma=0$, en pinces magnétiques. (b) Ensemble des 137 mesures de $\delta\ell$ faites sur des molécules d'ADN sensibles à la torsion, à $\sigma=0$, en présence de CHD1 et en l'absence d'ATP. On fait également figurer la valeur de la variance σ_v (et du double de celle-ci, $2\sigma_v$) des données moyennées sur 0.25 s à partir desquelles nous détectons une éventuelle réduction de longueur de la molécule du fait de l'accrochage de CHD1.

on détermine la relation qui lie la force F (appliquée à une bille de taille donnée) à la distance $d_{aimants}$ entre les aimants et la chambre microfluidique, sur une dizaine de billes reliées par des molécules d'ADN longues (typiquement $16\ \mu\text{m}$). Cela nous permet d'estimer la force F appliquée à la bille que l'on suit, en ne se basant que sur la connaissance de $d_{aimants}$. Malheureusement, les billes magnétiques que l'on utilise ne sont pas strictement identiques, leur contenu magnétique varie d'une bille à l'autre, ce qui entraîne des disparités de la force appliquée, pour une distance $d_{aimants}$ fixée. Il ne nous est donc pas possible de connaître la force F que l'on applique à mieux que 15-20 %.

Ceci n'est pas trop ennuyeux lorsqu'on se contente de faire des mesures sur une seule molécule. Le problème est plus sérieux ici puisque l'on compare des mesures faites sur différentes billes. Si on a effectivement une erreur de 15-20 % sur la force, il paraît très discutable de vouloir donner un sens à la variation de la valeur $\delta\ell$ que l'on observe sur un intervalle de force aussi restreint que 0.4-0.6 pN.

3. L'incertitude que l'on a sur la détermination de la force F entraîne une autre difficulté. Pour pouvoir comparer les valeurs de $\delta\ell_F$ entre elles, à différentes forces, il nous a fallu corriger celles-ci par le facteur de force λ_{WLC} (on a obtenu alors les valeurs notées $\delta\ell$ et représentées sur la figure 9.7(b)). Or on exploite une gamme de forces pour laquelle ce facteur λ_{WLC} varie de manière significative avec la force : il vaut 0.675 à 0.2 pN et 0.886 à 1.6 pN, soit une variation de 27 % entre ces deux valeurs extrêmes de force (voir Figure 9.8, points rouges). Une erreur de 15-20 % sur la force, va induire l'utilisation d'une valeur du facteur correctif λ_{WLC} inadaptée, rendant encore une fois difficile la comparaison stricte des données d'une molécule à l'autre.

magnétique ait une fréquence de coupure bien inférieure à la moitié de la fréquence de la caméra (cf Partie 2, Chapitre 5), ce qui n'est pas le cas pour nos molécules d'ADN courtes ($1.2\ \mu\text{m}$), attachées à des billes magnétiques de $1\ \mu\text{m}$ de diamètre et pour des forces de l'ordre du pN. On est, de plus, assez vite gêné à basse force ($\sim 0.5\ \text{pN}$), par la proximité entre la bille et la surface du capillaire, dont le potentiel d'interaction avec la bille vient perturber les mesures.

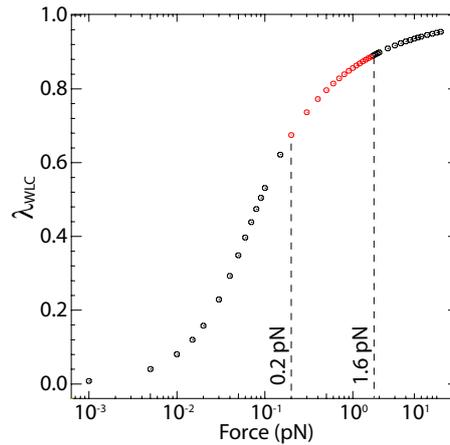


FIGURE 9.8 – Variations du facteur de force λ_{WLC} prédites par le modèle du ver, en fonction de la force.

4. Enfin, les mesures expérimentales sont marquées par la présence intrinsèque d'un bruit, de distribution gaussienne, provenant du mouvement brownien de la bille magnétique, soumise à de multiples chocs de la part des molécules présentes dans le milieu aqueux dans lequel on travaille. Pour analyser ces données brutes, nous commençons par moyenniser celles-ci sur une fenêtre glissante de 0.25s. La variance σ_v de la distribution du signal moyenné varie avec la force : plus la force augmente et plus l'amplitude des fluctuations browniennes diminue : on a mesuré cette variance σ_v en fonction de la force appliquée, dans le cas des mesures faites précédemment (on a représenté sur la figure 9.7(b) la valeur de σ_v et de $2\sigma_v$ en fonction de la force). Pour détecter la présence d'un événement d'accrochage de CHD1, nos critères ont été les suivants : on n'a sélectionné que des événements de taille supérieure à $2\sigma_v$ (car seuls 10% des points moyennés sont susceptibles de se trouver dans cette gamme du seul fait des fluctuations browniennes, on réduit ainsi significativement la détection de faux signaux) et restant, au delà de ce seuil, au moins 0.5s. L'application systématique de ces critères limite la prise en compte de faux signaux mais impose des limites assez importantes concernant la taille et la durée des signaux détectables, et ce d'autant plus que la force est petite. Ainsi, même si la réduction de taille $\delta\ell$ due à l'accrochage de CHD1 restait la même quelque soit la force et voisine de 55 nm (comme pour une molécule insensible à la torsion, à 0.4 pN), il ne serait pas possible de détecter de tels signaux à une force de 0.2 pN (où $2\sigma_v=63$ nm). La limite de détection de ces signaux d'accrochage, qui dépend de la force, conduit naturellement à détecter (ou sélectionner) des signaux de plus grande taille à basse force où on est davantage gêné par le bruit intrinsèque des mesures.

9.2.2.2 Ces mesures restent néanmoins compatibles avec les résultats précédemment montrés

En l'absence d'ATP, on s'attend à ce que la réduction de longueur $\delta\ell$ due à l'accrochage d'un unique complexe CHD1 soit peu différente dans le cas d'une molécule insensible à la torsion et dans celui d'une molécule sensible à la torsion, à $\sigma=0$. En effet, autour du centre de rotation, les courbes en chapeau d'une molécule d'ADN sont relativement plates : pour ces molécules, si on s'écarte du centre de rotation de deux tours (positifs ou négatifs), la variation de longueur observée sera inférieure à 20 nm (valeur à $F=0.25$ pN) pour des forces supérieures à 0.25 pN. Or, il semble difficile d'imaginer qu'un unique complexe introduise, du fait de son interaction avec l'ADN, plus que 2 tours (positifs ou négatifs) sur 55 nm d'ADN environ (c'est plus que ce que fait un octamère d'histones lorsqu'il s'associe à l'ADN). On ne devrait pas trouver une taille caractéristique très différente pour $\delta\ell$ dans ces deux situations. Si on compare les mesures de $\delta\ell$

faites, en l'absence d'ATP, sur des molécules d'ADN insensibles à la torsion, à $F=0.5$ pN (Figure 9.9, croix rouges), ces valeurs sont compatibles avec celles mesurées dans le cas de molécules d'ADN sensibles à la torsion, à $\sigma=0$, et pour des forces similaires (Figure 9.9, ronds noirs).

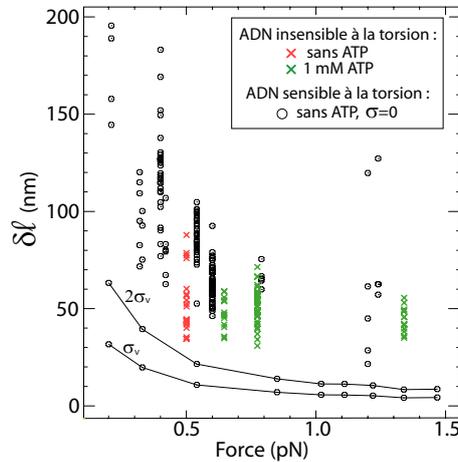


FIGURE 9.9 – Comparaison des tailles δl mesurées dans le cas de molécules sensibles à la torsion, à $\sigma=0$ et sans ATP (ronds noirs), et dans le cas de molécules insensibles à la torsion, sans ATP (croix rouges) ou avec 1 mM ATP (croix vertes).

On a montré précédemment que la présence de 1 mM ATP ne modifiait pas l'allure des événements d'accrochage de CHD1 observés sur des molécules d'ADN insensibles à la torsion. On s'attend donc à ce que les résultats obtenus précédemment, en présence de 1 mM ATP, soit très similaires à ceux obtenus dans le cas de molécules sensibles à la torsion, sans ATP, à $\sigma=0$. C'est effectivement le cas, comme le montre la figure 9.9. Les valeurs mesurées pour δl , pour des molécules insensibles à la torsion à 1 mM ATP (croix vertes) sont semblables à celles obtenues pour des molécules sensibles à la torsion, à $\sigma=0$, sans ATP, dans la même gamme de force (ronds noirs). On avait, de plus, précisé que l'on ne détectait pas, en présence de 1 mM ATP, de dépendance de la taille δl avec la force, dans la gamme de force 0.6-1.6 pN. Ceci est également compatible avec les quelques données obtenues, dans cette gamme de force, pour des molécules sensibles à la torsion, à $\sigma=0$, sans ATP.

9.2.3 L'étape d'accrochage de CHD1 sur l'ADN, en l'absence d'ATP, se fait sans génération de torsion détectable.

On a complété l'analyse précédente par l'étude de l'accrochage de CHD1 sur des molécules surenroulées et auxquelles on a imposé une contrainte de torsion (soit positive avec l'introduction de +12 tours, soit négative avec l'introduction de -8 tours). De même que précédemment, on assiste à une réduction significative de la longueur de la molécule d'ADN que l'on associe à l'accrochage de plusieurs complexes. Dans certains cas plus rares, on arrive à isoler des événements individualisés ce qui nous permet de mesurer la taille de ces événements d'accrochage. La figure 9.10(a) présente une trace obtenue pour une molécule surenroulée de +12 tours, à $F=1.2$ pN, sans ATP, en présence de CHD1 : on observe des événements d'accrochage tout à fait semblables à ce que l'on a pu observer jusque là (sur des molécules insensibles à la torsion, ou bien à $\sigma=0$). La figure 9.10(b) indique les différents états de la molécule explorés (les ronds noirs correspondent au cas $\sigma=0$ présentés dans le paragraphe précédent), la croix bleue correspond aux

évènements enregistrés à $\sigma < 0$ et les croix rouges, à $\sigma > 0$). Enfin, la figure 9.10(c) compare les valeurs de δl mesurées pour des valeurs de σ non nulles (dans les états précisés sur la figure 9.10(b)), à celles déjà présentées figure 9.7 pour le cas $\sigma = 0$.

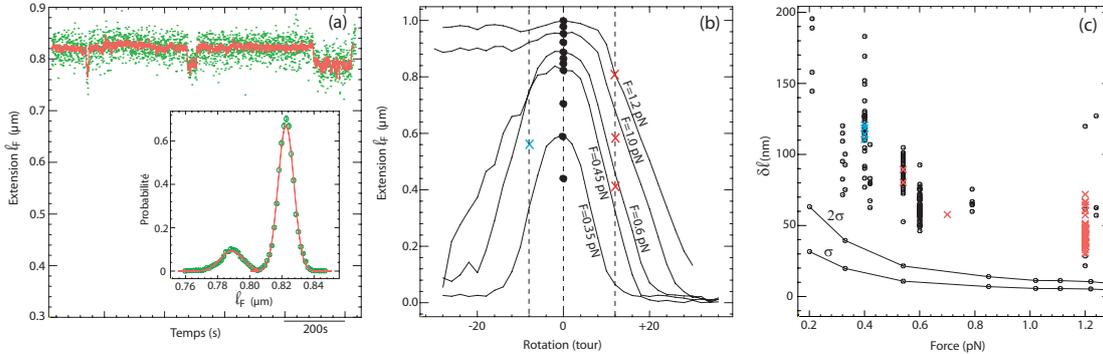


FIGURE 9.10 – (a) Suivi de l’extension d’une molécule d’ADN de $1.2 \mu\text{m}$, surenroulée de $+12$ tours, en présence de CHD1, sans ATP. On observe une succession d’évènements d’accrochage et de décrochage dont la taille est comparable à ce qui a été observé précédemment pour $\sigma = 0$ (ici, $\delta l = 38.9 \pm 2 \text{ nm}$). (b) Résumé des états explorés et pour lesquels on a pu mesurer la taille δl d’évènements d’accrochage de CHD1 (croix bleue : évènements obtenus pour une molécule surenroulée négatif, ronds noirs : évènements obtenus pour une molécule non contrainte en torsion ($\sigma = 0$), croix rouges : évènements obtenus pour une molécule surenroulée positif). Les tailles mesurées dans ces différents cas sont présentées en (c), en fonction de la force.

Si l’accrochage d’un complexe CHD1 s’accompagne de l’introduction de torsion au sein de la molécule d’ADN, en se plaçant dans le régime plectonémique, on devrait mesurer une variation de longueur δl différente de celle mesurée à $\sigma = 0$. En effet, si l’accrochage du complexe CHD1 introduit n tours (positifs ou négatifs) dans le reste de la molécule d’ADN : selon le signe des tours introduits, on va augmenter ou au contraire réduire le nombre de plectonèmes dans la molécule d’ADN, la variation de longueur associée va s’ajouter à celle due au simple accrochage de CHD1 sur l’ADN. On peut résumer ceci par l’équation suivante :

$$\delta l_\sigma = \delta l_{\sigma=0} + n l_p$$

où δl_σ est la variation de longueur (positive ou négative) mesurée pour une valeur de σ non nulle, $\delta l_{\sigma=0}$ est le raccourcissement (négatif) mesuré à $\sigma = 0$, n , le nombre de tours (positifs ou négatifs) introduits et l_p , la pente de la courbe en chapeau pour la valeur de σ à laquelle on travaille ($l_p > 0$ pour $\sigma < 0$ et $l_p < 0$ pour $\sigma > 0$). A titre d’exemple, dans les conditions ioniques dans lesquelles nous travaillons, la pente l_p de la courbe en chapeau vaut -46 nm/tr^1 à $F = 1.2 \text{ pN}$. Ici, on a toujours $\delta l_\sigma < 0$ quelque soit le signe de σ , on a donc toujours des raccourcissements de longueur de l’ADN.

Les mesures des raccourcissements δl faits ici pour des valeurs de σ non nulles (croix rouges et bleues de la figure 9.10) ne permettent pas de mettre en évidence une différence significative de taille par rapport au cas $\sigma = 0$. S’il y a introduction de torsion lors de l’accrochage d’un complexe CHD1, le nombre de tours introduits est certainement tel que $|n| \ll 1$. On peut en conclure que l’accrochage du complexe CHD1

1. Cette valeur a été corrigée par le facteur de force λ_{WLC} . La valeur de la pente de la courbe en chapeau, avant correction vaut 40 nm/tr .

sur l'ADN se fait sans introduction de torsion détectable par le dispositif des pinces magnétiques.

9.2.4 Les études menées en présence d'ATP, sur des molécules d'ADN sensibles à la torsion n'ont pas été très concluantes.

On a souhaité terminer cette étude par le suivi de l'extension d'une molécule d'ADN sensible à la torsion, en présence de CHD1 et d'ATP. On avait vu que la présence d'ATP ne modifiait pas les signaux, détectés en pinces magnétiques, dans le cas de molécules d'ADN insensibles à la torsion, sans ATP. Notre but est ici de voir si cela se confirme pour des molécules sensibles à la torsion ou si un comportement nouveau est détectable.

La démarche a été la même que précédemment : on a suivi de multiples molécules d'ADN sensibles à la torsion, en présence de CHD1 et de 1 mM ATP, pour différentes valeurs de σ . Les signaux typiquement obtenus correspondent à une réduction importante de la longueur de la molécule d'ADN, du fait de l'accrochage coopératif de multiples complexes CHD1. Les signaux alors obtenus sont tout à fait similaires à ceux présentés sur la figure 9.6. Comme précédemment, on a essayé de jouer sur différents paramètres pour obtenir des signaux individualisés et faire des mesures quantitatives de l'accrochage de CHD1 dans ces conditions. Nous n'avons malheureusement eu qu'un cas où quelques signaux individualisés se détachaient, nous ne pouvons donc rien dire de significatif dans ces conditions. Le fait que nous n'ayons pas réussi à isoler plus d'évènements individualisés ne nous pousse pas à conclure que la coopérativité est plus marquée dans ce cas là, ou bien que l'interaction entre CHD1 et l'ADN diffère : en effet, dans tous les autres cas présentés, l'obtention de tels signaux individualisés s'est avérée tout aussi difficile.

Résumé des résultats obtenus avec CHD1 sur l'ADN nu

Des études de microscopie électronique, menées en l'absence d'ATP, montrent que CHD1 a une grande affinité pour l'ADN et peut s'associer à celui-ci sans le déformer de manière détectable. Il pourrait s'agir de la première étape de reconnaissance de l'ADN par CHD1.

En pinces magnétiques, on montre de plus que CHD1 peut réduire, de manière réversible, l'extension bout-à-bout d'une molécule d'ADN de ~ 55 nm. Ce processus est ATP-indépendant et aucune introduction de torsion n'est détectée au cours de cette étape. Il pourrait s'agir d'une deuxième phase dans l'interaction de CHD1 avec l'ADN : un réarrangement passif de l'ADN au niveau du complexe (formation d'une boucle par établissement d'un deuxième contact avec l'ADN ? enroulement de l'ADN autour de la protéine ?) pourrait expliquer cette réduction transitoire de longueur.

Ce processus d'accrochage est très coopératif : l'accrochage de premiers complexes sur une molécule d'ADN facilite l'accrochage des suivants. La coopérativité peut être modulée en jouant sur la force, les conditions ioniques ou en utilisant de l'ADN compétiteur.

Des expériences en volume montrent que l'activité ATPase de CHD1 est stimulée (par un facteur 2) en présence d'ADN nu. Or, en pinces magnétiques, aucune différence dans le comportement de CHD1 n'est observée, en présence ou en l'absence d'ATP. L'ATP doit donc être consommé lors d'un processus qui n'implique pas de déformation détectable de l'extension bout-à-bout de la molécule d'ADN.

Chapitre 10

Confrontations des résultats obtenus sur l'ADN nu avec RSC, yISW1a et CHD1. Conclusions et perspectives.

Les facteurs de remodelage de la chromatine sont connus pour être impliqués dans des processus qui altèrent la structure de la chromatine. Ces altérations peuvent être variées (voir Partie 1, Chapitre 3) : il peut s'agir de modifications très locales de la structure des nucléosomes (modification du chemin qu'emprunte l'ADN nucléosomal sur la surface de l'octamère d'histones) ou bien de perturbations à plus grande échelle (comme la désorganisation ou la régularisation d'un réseau linéaire de nucléosomes). La variété de ces manifestations laisse présager que chaque facteur de remodelage puisse agir selon un mécanisme spécifique, les activités de l'ensemble de ces complexes tendant toutes vers une finalité commune : rendre la structure de la chromatine dynamique.

Les différentes familles de facteurs de remodelage de la chromatine ont été mises à l'essai sur différents tests biochimiques (voir Partie 2, Chapitre 3) : il s'est avéré qu'elles possédaient des traits communs (activité de translocation le long de l'ADN, altération de la structure locale du nucléosome, glissement des nucléosomes...) mais que le détail de leurs activités différait d'une famille à l'autre (obtention de différents produits de remodelage), suggérant encore des mécanismes d'action variés. C'est ce qui a motivé notre étude de trois facteurs de remodelage appartenant à trois différentes familles : RSC de la famille Swi2/Snf2, yISW1a de la famille Iswi et CHD1 de la famille Nurd/Mi-2/Chd.

L'étude directe de ces complexes sur leur substrat naturel, la chromatine, semble vouée à l'échec en pinces magnétiques car le système est d'une telle complexité qu'on aurait du mal à donner un sens aux signaux observés. Notre démarche a été de partir du système le plus simple possible : étudier d'abord ces complexes sur l'ADN nu. Une fois celui-ci compris, il sera temps de l'enrichir en travaillant avec un substrat se rapprochant peu à peu de la chromatine (d'abord un mononucléosome, puis un réseau régulier de nucléosomes, puis une fibre native de chromatine...).

L'étude de l'action de ces trois complexes sur l'ADN nu a mis en évidence des différences de comportement indiscutables. Citons en quelques unes :

1. En l'absence d'ATP, yISW1a et CHD1 se lient à l'ADN et réduisent, de manière réversible, son extension bout-à-bout. Cet accrochage est coopératif et ATP-indépendant. Rien de tel n'est observé en présence de RSC. Cela laisse supposer que le mode de reconnaissance ou d'interaction entre ces complexes

et l'ADN n'est pas le même.

2. En présence d'ATP, rien de plus n'est détecté dans le cas de CHD1 et de γ ISW1a : l'activité ATPase de γ ISW1a n'est pas stimulée par la présence d'ADN nu, des expériences en volume montrent que celle de CHD1 est stimulée en présence d'ADN, mais le processus associé à la consommation d'ATP n'entraîne pas de déformation détectable de la molécule d'ADN, en pinces magnétiques. RSC a un comportement tout autre : en présence d'ATP, il forme de larges boucles d'ADN, dont la taille dépend à la fois de la force et de l'ATP. La formation de ces boucles s'accompagne de génération de torsion et est intimement liée à l'activité de translocation de RSC sur l'ADN. RSC se comporte comme un moteur moléculaire capable d'utiliser de l'énergie chimique (issue de l'hydrolyse de l'ATP) pour le convertir en travail mécanique (travail contre la force pour former des boucles d'ADN).

Nous ne prétendons pas ici sonder l'activité de remodelage de ces complexes, c'est-à-dire le processus fonctionnel qui permet à ces complexes d'altérer le positionnement ou la structure d'un nucléosome sur un ADN. Nous faisons cependant remarquer que ce processus fonctionnel doit nécessiter au moins un contact entre ces complexes et l'ADN, et notre étude montre que les interactions entre l'ADN et ces complexes sont très variables selon la famille considérée. Il est donc vraisemblable que cela se répercute sur l'activité de remodelage de la chromatine à proprement parler.

Notre travail doit maintenant être complété par l'étude du comportement de ces complexes sur un substrat nucléosomal. Dans le cas de γ ISW1a, on peut espérer pouvoir enfin déceler un comportement ATP-dépendant lié à la stimulation de son activité ATPase par un trait particulier porté par le nucléosome. Dans le cas de RSC, on espère pouvoir confirmer les résultats de C. Bustamante et montrer ainsi que la présence des nucléosomes modifie profondément l'activité de RSC. Dans tous les cas, il est nécessaire de disposer pour cela d'un substrat nucléosomal contrôlé et dont on puisse facilement garantir la qualité. J'ai dans ce but mis au point un protocole pour préparer des mononucléosomes de manière contrôlée, et mis en place un test pour être sûr de leur qualité, en pinces magnétiques : c'est l'objet de la quatrième partie de ce manuscrit. Cet objectif n'a pas été simple à atteindre : aucun membre de l'équipe ne possédant une grande expérience de la préparation de la chromatine, j'ai bénéficié de plusieurs aides extérieures pour y arriver. L'équipe de T. Owen-Hughes (University of Dundee, Ecosse) m'a accompagné pour les premières reconstitutions de chromatine avec lesquelles j'ai travaillé, l'équipe d'E. Lecam (et plus particulièrement C. Lavelle) (IGR, Villejuif) m'a permis de contrôler la qualité de mes préparations en microscopie électronique, j'ai bénéficié également de l'aide de J.-P. Quivy (Institut Curie) qui m'a permis de disposer d'octamères d'histones recombinantes, et enfin, de l'expérience de P. Recouvreur (équipe de J.L. Viovy, Institut Curie) qui manipule des fibres de chromatine en pinces magnétiques et dont les discussions m'ont beaucoup apporté.

Quatrième partie

Construction et caractérisation d'un mononucléosome

Chapitre 11

Familiarisation avec la manipulation de fibres de chromatine

Sommaire

11.1 Préparation de deux types de fibres de chromatine	161
11.1.1 Fibre de chromatine de 3,8 μm avec ~ 20 nucléosomes disposés aléatoirement . . .	161
11.1.2 Fibre de chromatine de 1,2 μm avec ~ 10 nucléosomes disposés aléatoirement . . .	161
11.2 Comportement en traction de fibres de chromatine contenant plusieurs nucléosomes non positionnés	162
11.2.1 Conditions expérimentales	163
11.2.2 L'extension des fibres de chromatine peut présenter des sauts discontinus sous l'application d'une force constante suffisante	163
11.2.3 Distribution de taille de ces sauts d'extension	164
11.3 Comportement en torsion d'une fibre de chromatine ayant plusieurs nucléosomes positionnés de manière aléatoire	168
11.3.1 La présence de sels rend la fibre de chromatine <i>collante</i>	169
11.3.2 Réponse en torsion d'une fibre de chromatine	170
11.3.3 Les courbes <i>en chapeau</i> de fibres de chromatine présentent un comportement hystérétique	172
11.3.4 Borne inférieure au couple à appliquer, à la fibre de chromatine, pour induire la transition chirale des nucléosomes	173
11.3.5 Borne supérieure au couple, à appliquer à la fibre, pour permettre la transition chirale des nucléosomes	176
11.4 Motivation de la préparation d'un mononucléosome	178
11.4.1 Les tests sur des fibres de chromatine ont été encourageants...	178
11.4.2 ... mais des difficultés persistent	178
11.4.3 Vers un substrat mono-nucléosomal	179

Pour pouvoir se familiariser avec la manipulation de chromatine, en pinces magnétiques, et pouvoir comprendre plus tard les signaux obtenus dans le cas d'un mononucléosome, nous avons commencé par réaliser quelques expériences sur des fibres contenant plusieurs nucléosomes^a afin d'étudier leur comportement

a. Les substrats nucléosomaux préparés ici ont une longueur caractéristique de répétition des nucléosomes (voisine de 560 bp ou 350 bp selon la construction envisagée) bien supérieure à celle observée dans les conditions physiologiques (de l'ordre de 200 bp). On peut donc discuter l'appellation de *fibres* utilisée ici pour les décrire dans la mesure où il ne va pas y avoir de structure particulière pour l'enchaînement. Il serait donc plus judicieux de parler de *nucléofilament* plutôt que de *fibre*. Par la suite, on confondra souvent ces deux terminologies, on gardera néanmoins à l'esprit que les *fibres* que nous synthétisons ici sont bien moins denses que celles rencontrées *in vivo*.

en traction et en torsion.

11.1 Préparation de deux types de fibres de chromatine

11.1.1 Fibre de chromatine de 3,8 μm avec ~ 20 nucléosomes disposés aléatoirement

11.1.1.1 Préparation du substrat

Les premières reconstitutions de chromatine ont été réalisées avec l'aide du groupe de T. Owen-Hughes. On a utilisé un plasmide (*ChXI plasmid*) pour produire un fragment d'ADN linéaire de 11 kpb ($\sim 3,8 \mu\text{m}$), par digestion par les enzymes de restriction *Kpn I* et *Sac I*. On a souhaité incorporer, sur ce fragment d'ADN, une vingtaine de nucléosomes en moyenne : pour ce faire, on a mis en présence cet ADN avec une quantité adéquate d'histones recombinantes H2A, H2B, H3 et H4, dans un tampon contenant 2M NaCl. On a procédé par dialyses successives contre des tampons de moins en moins riches en sel afin de permettre aux histones d'interagir convenablement avec l'ADN (voir Annexe C.3.1). On ligue, aux extrémités de cette fibre de chromatine, deux fragments contenant d'une part, des bases modifiées avec une biotine pour s'ancrer sur une bille magnétique, et d'autre part, des bases modifiées avec une digoxygénine pour pouvoir se fixer sur la surface de verre de la microchambre. On a alors une fibre de chromatine que l'on peut, soit tordre, soit étirer afin de sonder son comportement mécanique.

11.1.1.2 Atouts et limites de ce substrat pour l'étude du comportement d'une fibre de chromatine

Ce type de reconstitution présente plusieurs faiblesses qui vont rendre difficile l'interprétation des signaux obtenus :

- on ne contrôle pas le nombre de nucléosomes que l'on incorpore sur chaque fibre, on s'arrange pour que le ratio choisi entre les quantités d'histones recombinantes et les fragments d'ADN, permette d'avoir une moyenne de 20 nucléosomes par fibre, mais on n'a aucune information plus précise.
- on ne contrôle pas la position des nucléosomes : il n'est ainsi pas exclu que l'on ait des nucléosomes très proches les uns des autres sur certaines portions des fibres, ils pourraient fortement interagir entre eux. Ceci risque de compliquer les signaux que l'on va acquérir.
- l'étape de ligation est un peu délicate : on ne peut se débarrasser de la ligase en chauffant l'échantillon à 60°C pendant 20 min, on déstabiliserait alors les nucléosomes. On a pris le parti de ne pas procéder à cette étape de purification, les échantillons, une fois introduits dans la chambre microfluidique, sont rincés très largement ce qui devrait suffire au départ de la ligase. Pour éviter, encore une fois de déstabiliser les nucléosomes par des rinçages abondants, on ajoute dans les tampons utilisés de la chromatine libre pour limiter l'éventuel départ de dimères (H2A-H2B).
- remarquons que, pour cette reconstitution, des histones recombinantes ont été utilisées. On aura donc une population homogène de nucléosomes (absence de variants d'histones et de modifications post-traductionnelles).

11.1.2 Fibre de chromatine de 1,2 μm avec ~ 10 nucléosomes disposés aléatoirement

11.1.2.1 Préparation de ce substrat et contrôle de sa qualité en microscopie électronique

On utilise un ADN linéaire de 1,2 μm auquel on ligue deux fragments d'ADN (de 500 pb environ) modifiés par des biotines pour l'un, des digoxygénines pour l'autre (voir Figure 11.1(a)). Ces molécules d'ADN sont mises en présence de particules de coeur purifiées à partir de cellules du thymus de veau (purification faite dans l'équipe de E. Le Cam) à très haut sel (2 M NaCl), on ajuste le ratio ADN/particule

11.2. COMPORTEMENT EN TRACTION DE FIBRES DE CHROMATINE CONTENANT PLUSIEURS NUCLÉOSOMES NON POSITIONNÉS

de coeur pour avoir une dizaine de nucléosomes par fibre en moyenne. On réalise des dilutions successives de ce mélange pour abaisser la concentration en sel et permettre l'échange d'octamères entre les particules de coeur et l'ADN que l'on a préparé (le protocole est détaillé dans l'Annexe C.3.2). On teste la qualité de la reconstitution obtenue par microscopie électronique : la figure 11.1(b) présente deux clichés obtenus pour ces fibres (clichés pris par C. Lavelle).

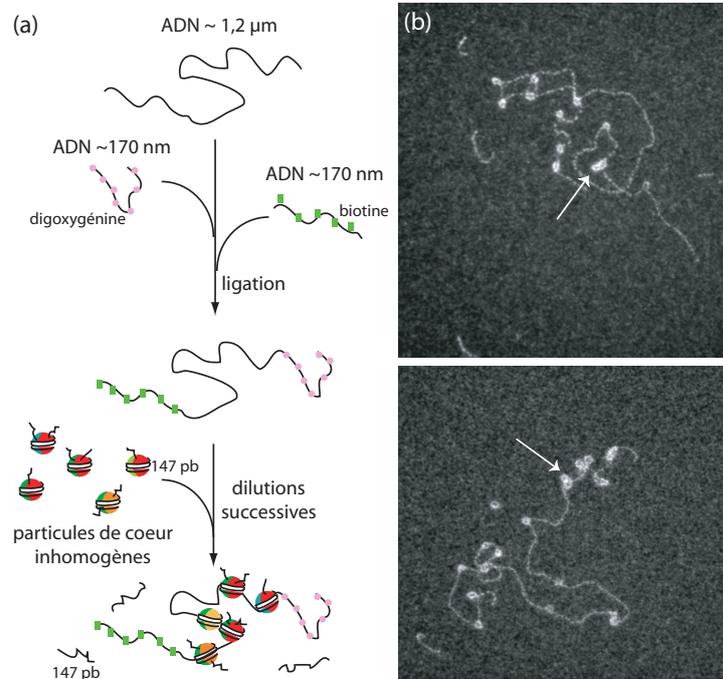


FIGURE 11.1 – (a) Mode de reconstitution de ces fibres de chromatine. (b) Clichés de microscopie électronique de ces fibres de chromatine de 1,2 µm.

11.1.2.2 Atouts et limites de ce substrat

Les fibres reconstituées ainsi sont plus courtes que les précédentes et contiennent en moyenne 10 nucléosomes. Comme précédemment, on ne contrôle pas le positionnement des nucléosomes. Comme le montrent les clichés de microscopie électronique de la figure 11.1(b), on a des regroupements de nucléosomes qui risquent de poser problème lors de l'étude de la réponse mécanique de la fibre. De plus, les particules de coeur qui nous servent à préparer les fibres sont extraites directement du thymus de veau : elles peuvent donc contenir des variants d'histones, des modifications post-traductionnelles. On a donc une certaine variabilité dans la composition des nucléosomes sur la fibre, on est plus proche de ce que l'on peut observer *in vivo* mais cela va avoir pour effet de compliquer encore l'étude de ces fibres de chromatine.

11.2 Comportement en traction de fibres de chromatine contenant plusieurs nucléosomes non positionnés

Dans les expériences qui suivent, on travaille à haute force (entre 1 et 60 pN) et on cherche à déstabiliser les nucléosomes positionnés sur la fibre par l'application d'une force de traction. On va donc souvent aller

jusqu'à l'éjection des nucléosomes.

11.2.1 Conditions expérimentales

Les résultats déjà obtenus par d'autres équipes sur le comportement de fibres de chromatine soumises à une force de traction (Brower-Toland et al. (2002)), (Brower-Toland et al. (2005)), (Bancaud et al. (2006)), (Mihardja et al. (2006)) montrent qu'il faut exercer des forces relativement importantes pour éjecter les octamères d'histones d'une fibre de chromatine (forces supérieures à 10-15 pN (Brower-Toland et al. (2002)), (Brower-Toland et al. (2005)), 8-9 pN (Mihardja et al. (2006)) ou 7-8 pN (Bancaud et al. (2006)) selon les conditions expérimentales). On a dû avoir recours à des billes magnétiques plus grandes que celles utilisées pour l'étude des facteurs de remodelage sur l'ADN nu, afin d'atteindre ces forces-là : avec des billes de $2.8 \mu\text{m}$ (resp. $4.5 \mu\text{m}$), on atteint, avec l'ancien montage de pinces magnétiques dont on disposait au moment de ces expériences, des forces comprises entre 0 et 12 pN (resp. 0 et 100 pN). Malheureusement, plus la bille magnétique sera de taille importante, moins le rapport signal sur bruit sera bon, cet argument nous a incité, par la suite, à changer de dispositif de pinces magnétiques (adoption d'un couple d'aimants plus performant, chambre microfluidique plus fine, voir Partie 2, Chapitre 5).

Le tampon utilisé ici est composé de 10 mM Hepes pH ~ 7.3 , 50 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 0.1 mM DTT et 0.2 % BSA.

11.2.2 L'extension des fibres de chromatine peut présenter des sauts discontinus sous l'application d'une force constante suffisante

On suit l'extension d'une fibre de nucléosomes reconstituée à partir du fragment d'ADN de $3,8 \mu\text{m}$, insensible à la torsion. On effectue une succession de paliers à force constante (durée typique des paliers ~ 2 s) en commençant systématiquement à basse force (inférieure à 1 pN) puis en augmentant la force graduellement^b. On effectue l'opération plusieurs fois de suite et on trace les courbes représentant l'extension de la fibre en fonction de la force appliquée (voir figure 11.2, courbes (a) à (f))^c.

Alors que l'extension d'une molécule d'ADN nue varie régulièrement lorsqu'on lui applique des petits pas de force (Figure 11.2, courbe (g)), on constate des allongements brutaux de l'extension des fibres à force constante (ces sauts sont repérés par des *étoiles* sur la figure 11.2). Ces sauts sont de taille variable (sur l'exemple proposé ici, ils ont des tailles comprises entre 22 et 250 nm), sont irréversibles et apparaissent pour des forces comprises entre 5 pN et 50 pN, gamme de forces cohérente avec les expériences effectuées par d'autres groupes (Brower-Toland et al. (2002)), (Bancaud et al. (2006)). Si l'on augmente puis diminue graduellement la force, les courbes donnant l'extension d'une molécule d'ADN nue, à la montée et à la descente, se superposent exactement (courbe (g)), alors que celles des fibres de nucléosomes présentent un fort hystérésis (courbes (a) et (b)), cet hystérésis est d'autant plus prononcé qu'il y a eu beaucoup de sauts discontinus à la montée en force. Ceci est cohérent avec l'idée que ces sauts sont liés au départ d'un ou plusieurs octamères d'histones de la fibre de chromatine.

b. On diminue de manière régulière la distance entre le couple d'aimants et l'échantillon, il en résulte une augmentation de force qui, elle, n'est pas régulière puisque la relation qui lie la distance aimant-capillaire à la force est quasiment exponentielle (voir Partie 2, Chapitre 5).

c. Les courbes ont été décalées suivant l'axe des abscisses pour plus de clarté.

11.2. COMPORTEMENT EN TRACTION DE FIBRES DE CHROMATINE CONTENANT PLUSIEURS NUCLÉOSOMES NON POSITIONNÉS

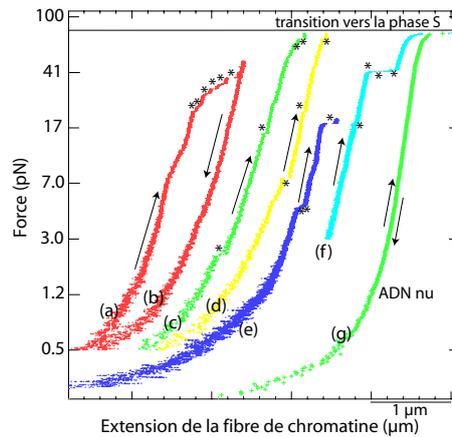


FIGURE 11.2 – Courbes représentant, pour une même fibre de chromatine, son extension en fonction de la force appliquée. On réalise une série d'étirements ou de relaxation (les flèches indiquent le sens de parcours des courbes) de la fibre : la courbe (a) est la première réalisée, la courbe (f), la dernière. On a décalé les abscisses des différentes courbes pour plus de clarté. On a ajouté la courbe (g) représentant l'extension de l'ADN nu correspondant, en fonction de la force.

11.2.3 Distribution de taille de ces sauts d'extension

11.2.3.1 Enregistrement de l'extension d'une fibre de chromatine en fonction du temps sur des paliers, à force constante, de plusieurs minutes

On a souhaité préciser la distribution de taille des sauts observés sur ces fibres. On a pour cela suivi l'extension de fibres de chromatine de $3.8 \mu\text{m}$ de long, en faisant des paliers, à force constante^d, de durée beaucoup plus longue que précédemment (plusieurs minutes) afin de donner le temps aux octamères d'histones de se détacher éventuellement de la fibre. La figure 11.3 présente une trace typique obtenue pour une fibre maintenue à 5 pN.

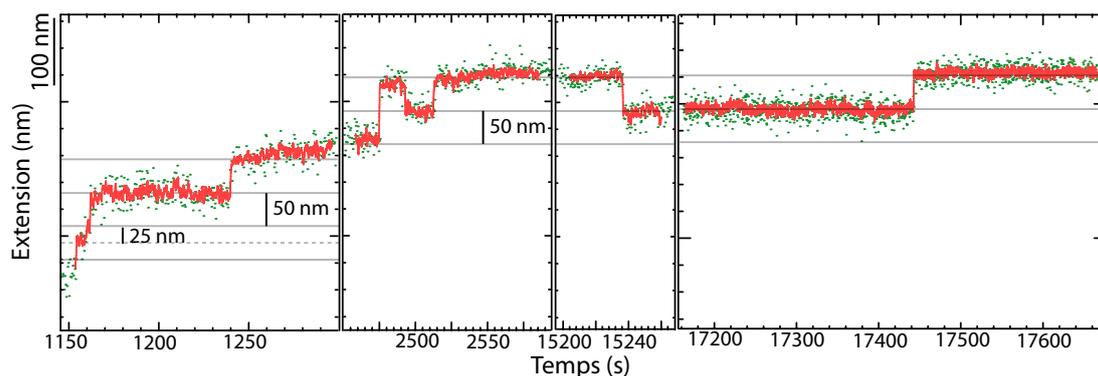


FIGURE 11.3 – Suivi de l'extension, en fonction du temps, d'une fibre de chromatine étirée à une force de 5 pN. On observe une succession de pas, parfois réversibles, que l'on associe au détachement/attachement d'une certaine quantité d'ADN nucléosomal autour de l'octamère d'histones.

d. Les pas de forces sont espacés de 0.05 pN à basse force, et de 1 à 5 pN aux plus hautes forces.

11.2. COMPORTEMENT EN TRACTION DE FIBRES DE CHROMATINE CONTENANT PLUSIEURS NUCLÉOSOMES NON POSITIONNÉS

Cette trace montre que l'extension de la fibre de chromatine peut varier brutalement à force constante. Ces variations peuvent être ou non réversibles (ce que ne révélaient pas les premières courbes $F=f(\text{extension})$ obtenues avec des paliers de forces très courts). On a enregistré de telles traces pour différentes fibres, on a systématiquement mesuré la taille de ces sauts afin d'étudier leur distribution de taille^e.

11.2.3.2 Ces sauts présentent deux tailles caractéristiques

La figure 11.4(a) présente les mesures de la taille des sauts observés, à force constante, de l'extension de plusieurs fibres de chromatine. Parmi les sauts enregistrés au cours de ces acquisitions, où la force est augmentée très lentement, 90 % de ceux-ci ont une taille inférieure à 60 nm. Les quelques rares sauts de grande taille ont des valeurs comprises entre 60 et 250 nm et sont toujours irréversibles. On les attribue au départ simultané de plusieurs octamères d'histones (la simultanéité de leur départ peut être due au fait que certains nucléosomes peuvent interagir entre eux sur la fibre s'ils sont positionnés proches les uns des autres). On construit l'histogramme correspondant aux sauts de taille inférieure à 60 nm (figure 11.4(b)), il en ressort deux tailles caractéristiques : 45.6 ± 4.8 nm et 20.2 ± 7.4 nm.

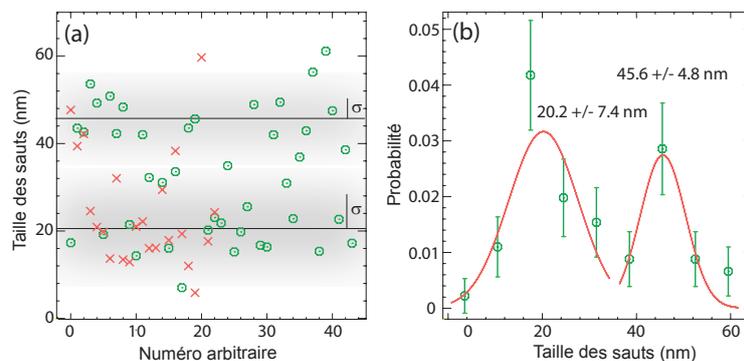


FIGURE 11.4 – (a) Sauts réversibles (croix rouges) et irréversibles (ronds verts), de moins de 60 nm, détectés sur les fibres de chromatine. On a représenté les valeurs moyennes (lignes noires) des deux tailles caractéristiques qui apparaissent et deux bandes grisées de part et d'autre, ayant une largeur de 2σ . (b) Histogramme de la taille des sauts (65 sauts traités) ayant une valeur inférieure à 60 nm : deux tailles caractéristiques apparaissent, 45.6 ± 4.8 nm et 20.2 ± 7.4 nm.

11.2.3.3 Confrontation de nos résultats avec les données déjà publiées

On peut d'abord confronter ces données avec celles proposées par M. Wang, A. Bancaud ou C. Bustamante. Ces groupes ne reportent que des sauts élémentaires, à haute force, de ~ 25 nm qu'ils attribuent à la rupture des contacts ADN-histones les plus forts, situés entre ± 36 et ± 46 pb par rapport au dyad du nucléosome (étape (ii) de la Figure 11.5(b)). Richmond a en effet proposé un classement de la robustesse des 14 contacts ADN-histones, stabilisant la particule de coeur, en se basant sur des données cristallographiques (Luger and Richmond (1998a)). Il prévoit le classement des sites SHL suivant : $\pm 6,5 < \pm 5,5 \approx \pm 2,5 \approx \pm 1,5 < \pm 4,5 < \pm 3,5 < \pm 0,5$, on a schématisé cet ordre sur la figure 11.5(a) (la robustesse d'un site est d'autant plus grande qu'il est représenté par un gros point noir).

e. Ces sauts ont été enregistrés pour des forces comprises entre 2 et 50 pN.

11.2. COMPORTEMENT EN TRACTION DE FIBRES DE CHROMATINE CONTENANT PLUSIEURS NUCLÉOSOMES NON POSITIONNÉS

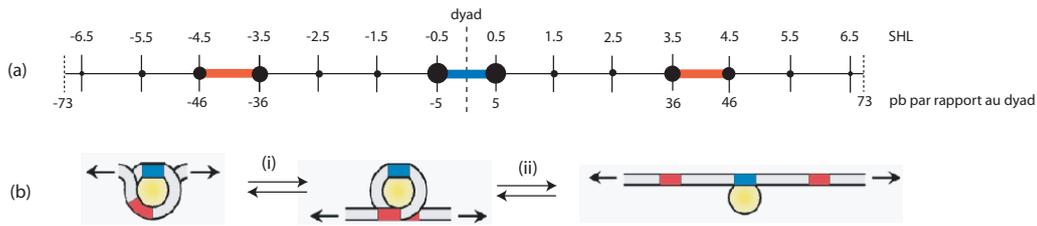


FIGURE 11.5 – (a) Représentation schématique de la robustesse des sites de contact entre l'ADN et l'octamère d'histones au sein d'un nucléosome. Plus le point correspondant à un site est gros et plus celui-ci est robuste. (b) Modèle communément admis pour le détachement d'un nucléosome sous l'action d'une force de traction.

Nos mesures suggèrent, elles, que le détachement d'un nucléosome peut être moins simple que ne le présente le modèle de la figure 11.5(b). Comme les études précédentes, nous détectons un nombre significatif de sauts ayant une taille voisine de 25 nm (dans notre cas 20.2 ± 7.4 nm). Ces sauts peuvent effectivement correspondre au détachement des paires de bases d'ADN nucléosomal comprises entre ± 36 et ± 46 bp par rapport au dyad. En plus de ces sauts, nous en observons un grand nombre dont la taille est de l'ordre de 50 nm, ces sauts pourraient correspondre au détachement soudain de tout l'ADN nucléosomal complexé autour de l'octamère d'histones. Enfin, nous observons aussi des sauts ayant des valeurs intermédiaires entre ces deux tailles caractéristiques (sauts de l'ordre de 15 nm, de 30 nm...) : ces sauts pourraient correspondre au détachement d'une partie de l'ADN nucléosomal, suite à la rupture de contacts ADN-histones différents de ceux situés à la position ± 36 et ± 46 pb.

Ces différences pourraient avoir plusieurs origines : on ne peut invoquer une hétérogénéité possible de nos nucléosomes puisque ceux-ci sont préparés à partir d'histones recombinantes, donc strictement identiques et ne possédant pas de modifications post-traductionnelles. Par contre, les conditions ioniques dans lesquelles nous travaillons pourraient être une piste : nos conditions de tampon diffèrent de celles des autres groupes^f. Ceci peut avoir une grande influence sur la robustesse des contacts dans la mesure où ceux-ci sont essentiellement assurés par des interactions électrostatiques. On pourrait imaginer que, selon les conditions de tampon utilisées, les différences de robustesse entre les contacts SHL ne soient pas très grandes et que la rupture des contacts, lors de l'application d'une force, puisse avoir lieu pour d'autres tailles intermédiaires, comprises entre 0 et 50 nm (longueur totale de l'ADN nucléosomal). Cependant, il est difficile de dire plus de choses dans la mesure où les articles publiés par les autres groupes ne proposent pas la distribution des tailles de sauts qu'ils observent.

Un autre élément peut expliquer certaines disparités avec les résultats déjà publiés : l'expérience que l'on fait diffère des expériences les plus détaillées (Brower-Toland et al. (2002)), (Mihardja et al. (2006)) dans la mesure où l'on applique une force constante et non pas une extension constante, ceci pourrait expliquer certaines différences observées : on a par exemple remarqué que nos expériences sont très sensibles à la durée et à la taille des paliers de forces que l'on faisait : si on va vite, on favorise des pas assez grands, irréversibles ; si les pas de forces sont grands, on observe des augmentations de longueur significatives lors

f. Tampon de travail de M. Wang : 10 mM TrisCl pH~8, 1 mM Na₂EDTA, 100 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0.02 % (vol/vol) Tween20, 0.01 % (masse/vol) protéine de lait.

Tampon de C. Bustamante : 10 mM TrisOAc, 50 mM KOAc, 10 mM MgOAc, 1 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA.

Tampon de A. Bancaud : 10 mM Tris-HCl pH~7,5, 1 mM EDTA, 0.1 mg/mL BSA.

Tampon utilisé ici : 10 mM Hepes pH~7.3, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT, 0.2 % BSA.

de ces augmentations brutales de force.

Notons enfin une dernière difficulté expérimentale, commune aux différentes expériences faites, et qui peut conduire à mesurer des sauts d'extension qui ne sont pas liés au départ d'un nucléosome : l'attachement de la fibre de chromatine à la bille et à la surface de verre se fait par l'intermédiaire d'interactions antigène-anticorps. Ces points d'attache, quoique solides, peuvent parfois être rompus à très haute force. Il n'est pas exclu que quelques sauts, que l'on attribue au départ d'un nucléosome, correspondent simplement à un détachement partiel de la fibre au niveau de la bille ou de la surface. Néanmoins, on a réalisé en parallèle des étirements de fibres de chromatine (contenant en moyenne 20 nucléosomes) et d'ADN nu pour se convaincre que les sauts observés pour ces hautes forces étaient bien plus fréquents en présence de nucléosomes, ce qui valide les résultats précédents. Ce problème sera par contre de taille pour des molécules contenant seulement un ou très peu de nucléosomes : il sera difficile de faire confiance à un saut irréversible, ayant lieu à haute force, comme signal clair de la présence d'un nucléosome.

On peut envisager, en parallèle de ce modèle communément admis pour le départ d'un nucléosome (voir Figure 11.5(b)), un autre scénario : c'est ce que propose l'équipe de J. Bednar (Claudet et al. (2005)). Ceux-ci tirent sur des fibres de chromatine grâce à un dispositif de pinces optiques et observent, comme nous le faisons, deux longueurs typiques d'allongement (~ 25 et 50 nm). Les constatations qui suivent leur permettent de proposer une interprétation de ces deux allongements caractéristiques. Dans des conditions pour lesquelles les fibres de chromatine sont très diluées, ils montrent que les dimères (H2A-H2B) se déstabilisent tandis que les tétramères (H3-H4)₂ restent attachés à l'ADN ; l'application d'une force de traction entraîne alors des allongements de ~ 25 nm qu'ils attribuent au départ de tétramères. Ils se placent ensuite dans des conditions qui stabilisent les octamères, ils observent dans ce cas, en plus des allongements précédents, d'autres de ~ 50 nm qu'ils associent au départ d'un octamère entier intact. Ainsi, les sauts de ~ 50 ou 25 nm seraient à attribuer respectivement au départ d'un octamère entier ou au départ d'un tétramère ayant "perdu" ses dimères (H2A-H2B). Leurs observations sont donc très semblables aux nôtres et l'interprétation qu'ils proposent est tout à fait cohérente avec nos résultats.

Pour conclure, nos expériences ne nous permettent pas de préciser le mécanisme qui permet à la fibre de s'allonger par sauts de 25 ou 50 nm lorsqu'elle est soumise à une force de traction. Le modèle le plus souvent évoqué propose que les contacts ADN-histones soient rompus de manière séquentielle : on perdrait le premier enroulement d'ADN autour de l'octamère d'histones à basse force, puis on déroulerait le second tour d'ADN nucléosomal à haute force (Luger and Richmond (1998a)). Une autre possibilité consiste à envisager que se soient les interactions histones-histones qui se rompent : on pourrait d'abord dissocier à basse force les dimères (H2A-H2B) et permettre ainsi le déroulement du premier tour d'ADN nucléosomal. Les dimères pourraient éventuellement se maintenir sur l'ADN par l'intermédiaire de leurs queues, on pourrait ensuite assister au départ du tétramère central (ou au déroulement de la boucle d'ADN nucléosomal centrale) à plus haute force (Claudet et al. (2005)). Par la suite, nous justifierons souvent nos observations en s'appuyant sur le premier modèle, nous garderons en tête qu'une interprétation similaire pourrait être donnée sur la base du second scénario.

11.2.3.4 Réversibilité des sauts observés

Les sauts observés peuvent être réversibles : parmi les événements réversibles recensés, 70% ont une taille voisine de 25 nm, 30% ont une taille proche de 50 nm (voir figure 11.4(a)). L'enroulement de l'ADN autour de l'octamère est très dynamique, les contacts peuvent se faire et se défaire très rapidement et ce,

même à des forces assez grandes^g.

11.2.3.5 Distribution de la taille des sauts en fonction de la force de traction

La figure 11.6 représente les tailles des sauts (réversibles ou non) détectés lors de paliers de force lents, en fonction de la force de traction^h.

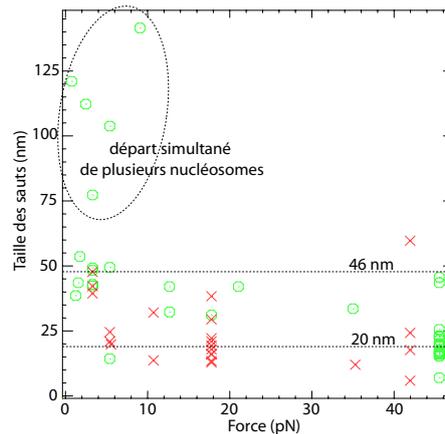


FIGURE 11.6 – Taille des sauts obtenus en faisant des paliers de force longs (plusieurs minutes), en fonction de la force. Les croix rouges correspondent à des sauts réversibles ; les ronds verts, à des sauts irréversibles.

On peut faire quelques remarques : les événements de grande taille (supérieure à 60 nm) apparaissent pour de faibles forces : il pourrait s'agir de paquets de nucléosomes qui interagissent ensemble, et peut être moins avec l'ADN, et qui pourraient se détacher de la fibre aux faibles forces. On observe ensuite, sur une très large gamme de forces (3-60 pN), des événements de taille comprise entre 10 et 60 nm sans que l'on puisse vraiment dégager une tendance particulière de leur taille en fonction de la force.

11.3 Comportement en torsion d'une fibre de chromatine ayant plusieurs nucléosomes positionnés de manière aléatoire

Dans ce type d'expériences, on va être amené à travailler à basse force (typiquement inférieure à 1,5 pN), on ne cherchera pas à éjecter les nucléosomes mais à voir si on a une signature particulière de leur présence en rotation comme le suggèrent les travaux de A. Bancaud. On sera amené à faire des courbes *en chapeau* donc à approcher la bille magnétique, grâce à laquelle on tire sur la fibre de chromatine, proche de la surface. On verra que cela impose de travailler dans des conditions de tampon particulières, à savoir dans des tampons très pauvres en sels. Les expériences présentées ici ont été réalisées avec des fibres de chromatine reconstituées sur des fragments d'ADN de 1,2 μm avec en moyenne 10 nucléosomes.

g. En se référant au second modèle proposé pour le départ d'un nucléosome, la réversibilité des sauts pourrait indiquer que les dimères (H2A-H2B) peuvent se dissocier du tétramère central tout en restant liés à l'ADN, de façon à ce que l'octamère intact puisse par la suite se reformer spontanément.

h. Il s'agit des mêmes données que celles présentées dans la figure 11.4, on précise simplement ici la force à laquelle on a observé ces sauts d'extension.

11.3.1 La présence de sels rend la fibre de chromatine *collante*

On a déjà indiqué (Partie 1, Chapitre 1) l'influence drastique qu'ont les sels sur la structure d'une fibre de chromatine. Si l'on augmente la concentration en ions monovalents, on permet aux nucléosomes d'interagir plus fortement entre eux, ce qui entraîne une compaction de la fibre de chromatine (Zlatanova et al. (1998)). On a souhaité comparer le comportement en torsion d'une fibre de chromatine en présence d'un tampon de référence, appelé B_0 par la suite, (tampon B_0 : 10 mM Tris-Cl pH \sim 7.5, 1 mM EDTA, 0,2 % BSA) et de $B_0 + 100$ mM NaCl. Les courbes obtenues sont présentées en figure 11.7.

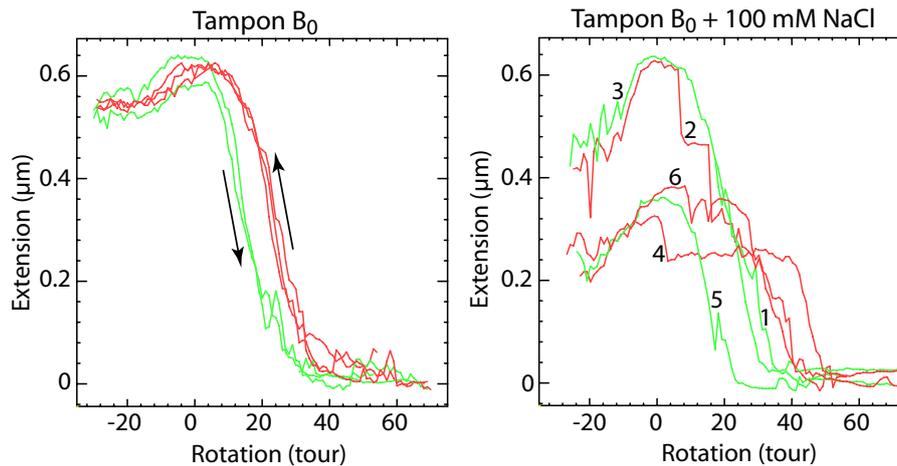


FIGURE 11.7 – Courbes en chapeau d'une fibre de chromatine reconstituée sur un fragment d'ADN de $1,2 \mu\text{m}$, à $0,9 \text{ pN}$, dans le tampon de référence B_0 (à gauche) ou dans le tampon $B_0 + 100 \text{ mM NaCl}$ (à droite). Les courbes vertes sont faites en partant de valeurs négatives de rotation et en appliquant des tours positifs, les courbes rouges correspondent au retour vers des valeurs négatives de rotation. On a numéroté l'ordre de parcours des différentes courbes obtenues dans le tampon $B_0 + 100 \text{ mM NaCl}$.

Alors que les courbes obtenues dans le tampon B_0 sont propres et reproductiblesⁱ, on a un comportement tout autre en présence de 100 mM NaCl : les courbes ne sont plus reproductibles, on observe, dans de nombreux cas, un raccourcissement significatif des fibres (courbes 4,5 et 6). Ce comportement est spécifique des fibres de chromatine. La même expérience, réalisée sur les fragments d'ADN nus, montre que l'on n'observe pas ce *collage* dramatique des molécules. Ce sont donc vraisemblablement les octamères d'histones qui sont responsables de ce phénomène. On interprète ceci par une augmentation des interactions entre nucléosomes : on se trouve ici à basse force ($0,9 \text{ pN}$), lorsqu'on applique des tours positifs, la longueur de la fibre se raccourcit du fait de la formation de plectonèmes. Ces plectonèmes permettent à des nucléosomes, même éloignés le long de la fibre, de se retrouver très proches les uns des autres et d'interagir, raccourcissant l'extension bout-à-bout de la fibre. On observe souvent, dans ces conditions de tampon, des raccourcissements tels qu'il n'est plus possible de suivre l'extension de la fibre et de poursuivre l'expérience.

Notons que les expériences en traction présentées dans la section précédente ont été réalisées dans un tampon salin (contenant 50 mM KCl et 3 mM MgCl_2), donc dans des conditions où on aurait pu être un peu gêné par le sel. Néanmoins, on tirait systématiquement fort sur les fibres : on maintenait ainsi la bille magnétique et la fibre loin de la surface, limitant ainsi des collages non spécifiques entre la bille, la

i. du moins si l'on compare les courbes rouges (resp. vertes) entre elles, on reviendra sur l'hystérésis observé entre les deux lots de courbes dans les paragraphes suivants.

11.3. COMPORTEMENT EN TORSION D'UNE FIBRE DE CHROMATINE AYANT PLUSIEURS NUCLÉOSOMES POSITIONNÉS DE MANIÈRE ALÉATOIRE

surface et/ou les nucléosomes. Comme on tirait fort sur la fibre de chromatine, on limitait la formation spontanée de boucles dans la fibre, du fait de ses fluctuations browniennes, et on empêchait ainsi que deux nucléosomes positionnés en des endroits distincts de la fibre puissent interagir et éventuellement se coller. Enfin, on travaillait avec des fibres insensibles à la torsion, on ne pouvait introduire de structures plectonémiques qui auraient eu pour effet de pouvoir rapprocher les nucléosomes entre eux et favoriser leur interaction. Nous n'avons donc pas été confronté aux mêmes difficultés que celles rencontrées à basse force avec des fibres sensibles à la torsion.

Dans la suite de ce chapitre, nous avons systématiquement travaillé avec le tampon B_0 (10 mM Tris-Cl pH \sim 7.5, 1 mM EDTA, 0,2 % BSA). Ce point, qui peut sembler anodin, a posé beaucoup de problèmes au cours de ce travail de thèse : rappelons que notre objectif est d'étudier l'activité des facteurs de remodelage sur un substrat de chromatine. Or, pour suivre leur activité, on souhaite se placer dans des conditions de tampon proches des conditions physiologiques. De plus, dès que l'on souhaitera suivre l'activité ATPase de ces complexes, on sera forcé de mettre du magnésium dans le tampon... Or ce type de tampon est difficilement utilisable avec une fibre contenant plusieurs nucléosomes (dans le régime des basses forces tout du moins). Une solution sera de ne travailler qu'avec un seul nucléosome.

11.3.2 Réponse en torsion d'une fibre de chromatine

On utilise le dispositif de pinces magnétiques pour tordre des fibres de chromatine reconstituées sur un fragment d'ADN de 1,2 μm et possédant, en moyenne 10 nucléosomes. On leur applique 25 tours négatifs, puis on enregistre leur extension alors qu'on leur applique, tour par tour, 50 tours positifs. La figure 11.8(a) présente l'allure d'un résultat typique obtenu pour cette expérience : les courbes vertes correspondent à la réponse de la fibre de chromatine étudiée. On rince la chambre microfluidique avec le tampon B_0 auquel on a ajouté de l'héparine. L'héparine permet de déstabiliser les nucléosomes. On est ainsi capable d'enregistrer, après rinçage, la courbe extension-rotation de la même fibre, débarrassée de ses nucléosomes (courbe bleue). La comparaison des courbes vertes et de la courbe bleue révèle que la fibre de chromatine est plus courte que l'ADN nu correspondant, la différence de longueur entre les maxima des deux courbes vaut $\Delta\ell = 573 \pm 13 \text{ nm}^{\text{j}}$ et le centre de rotation de la fibre est décalé par rapport à celui de l'ADN nu de 14 ± 1 tour. Il en résulte un raccourcissement de $40.9 \pm 3.8 \text{ nm}$ par tour négatif, ce qui est cohérent avec les résultats proposés par A. Bancaud pour une fibre de chromatine *irrégulière*, c'est-à-dire une fibre de chromatine dans laquelle tous les nucléosomes ne sont pas individualisés, certains se retrouvant sous forme de *paquets* de nucléosomes^k (Bancaud et al. (2006)). On peut estimer le nombre de nucléosomes portés par la fibre à $\sim 14^{\text{l}}$.

On peut comparer la réponse en torsion de la fibre de chromatine et de l'ADN nu correspondant. Pour comparer ces deux courbes, on renormalise celle obtenue par l'ADN en divisant, son extension et sa rotation, par le rapport des deux extensions maximales mesurées pour la fibre et pour l'ADN nu. On centre chacune des courbes sur 0 tour. La figure 11.8(b) présente les résultats obtenus. La courbe obtenue pour la fibre de chromatine est plus large que celle de l'ADN nu, elle est capable d'emmagasiner davantage de

j. Sur la figure, l'extension représentée correspond à l'extension mesurée par le dispositif des pinces magnétiques à $F=0,3 \text{ pN}$. Cette valeur de l'extension doit être corrigée pour tenir compte de la force : en ce qui concerne l'ADN nu, on corrige son extension maximale $\ell_F = 937 \pm 6 \text{ nm}$ par le facteur de force issu du modèle du *Worm Like Chain* pour obtenir la longueur cristallographique correspondante (ici $\lambda_{WLC}=0.736$ à $F=0.3 \text{ pN}$, donc $\ell=1273 \pm 8 \text{ nm}$) ; pour ce qui est de la fibre de chromatine, les expériences d'A. Bancaud (Bancaud et al. (2006)) montrent que son comportement élastique est très bien ajusté par le modèle du ver en prenant une longueur de persistance de $\xi \sim 28 \text{ nm}$ (dans ce cas, $\lambda_{WLC}= 0.644$ à $F=0.3 \text{ pN}$), la longueur maximale mesurée, $\ell_F = 451 \pm 8 \text{ nm}$, correspond donc à une longueur réelle de $\ell = 700 \pm 12 \text{ nm}$. On en déduit donc $\Delta\ell = 573 \pm 13 \text{ nm}$.

k. Il prévoit une variation de $\sim 55 \text{ nm}$ par tour pour une fibre comportant des nucléosomes individualisés. Dans le cas d'une fibre contenant des regroupements de nucléosomes, A. Bancaud trouve une valeur du rapport $\Delta\ell/\Delta R$ plus petite.

l. La déformation topologique introduite par la présence d'un nucléosome est voisine -1 tour.

11.3. COMPORTEMENT EN TORSION D'UNE FIBRE DE CHROMATINE AYANT PLUSIEURS NUCLÉOSOMES POSITIONNÉS DE MANIÈRE ALÉATOIRE

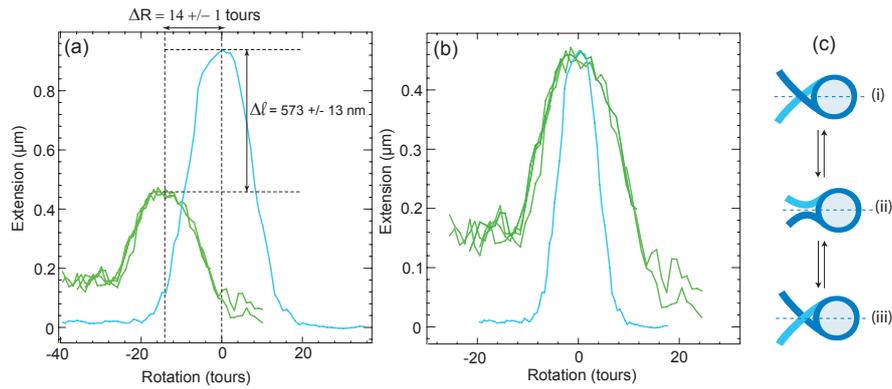


FIGURE 11.8 – (a) Courbes extension-rotation, à 0.3 pN, d'une fibre de chromatine (courbes vertes) et de l'ADN nu correspondant après départ des nucléosomes provoqué par un ringage à l'héparine (courbe bleue). Les courbes sont décalées en rotation de $\Delta R = 14 \pm 1$ tour, et leurs maxima respectifs sont séparés de $\Delta \ell = 573 \pm 13$ nm. (b) Ces mêmes courbes sont représentées ici : elles ont été centrées l'une par rapport à l'autre, et la courbe correspondant à l'ADN nu est renormalisée : l'extension et la rotation sont multipliées par le rapport entre l'extension maximale de la fibre de chromatine et celle de l'ADN nu. (c) Représentation des trois configurations discrètes que peut adopter le nucléosome : (i) état négatif, (ii) état ouvert, (iii) état positif.

torsion (positive ou négative). La région centrale du chapeau est plus large du fait de l'équilibre existant entre trois configurations discrètes, identifiées par des expériences sur des minicercles (Lucia et al. (1999)), qui se distinguent par l'angle existant entre les ADN entrant et sortant de la particule de coeur : états *négatif*, *ouvert* ou *positif* (voir Figure 11.8(c)). Les barrières énergétiques pour passer d'un état à l'autre sont très faibles ($0,7$ à $2 k_B T$ (Bancaud et al. (2006))), on va avoir un équilibre dynamique entre ces trois états, sur une plage de torsion centrée autour du centre de rotation des courbes. Puis, au delà d'un certain nombre de tours positifs introduits, l'extension de la fibre va diminuer rapidement sous l'effet de la formation de plectonèmes, on peut mesurer la pente de ce régime plectonémique : ~ 48 nm/tr (à comparer à celle de l'ADN nu ~ 109 nm/tr, mesurée dans les mêmes conditions^m).

Remarquons qu'il nous est le plus souvent arrivé de trouver des valeurs de $\Delta \ell / \Delta R$ inférieures à celles observées par A. Bancaud pour le comportement d'une fibre régulière. Ses travaux prévoient une variation topologique $\Delta \ell / \Delta R \sim 55$ nm/tr pour une fibre régulière (les notations sont précisées sur la figure 11.8(a)). Dans notre cas, aucune précaution n'est prise pour obtenir des fibres régulières. Il peut donc tout à fait se trouver, sur les fibres étudiées, des regroupements de nucléosomes proches. Ces groupements sont visibles sur certaines fibres dont on a fait l'image en microscopie électronique (Figure 11.1, groupements signalés par une flèche blanche). Ces groupements induisent des déformations topologiques différentes de celles des nucléosomes isolés (Bancaud et al. (2006)).

m. Ces valeurs n'ont pas été corrigées par les facteurs de force λ_{WLC} .

11.3.3 Les courbes *en chapeau* de fibres de chromatine présentent un comportement hystérétique

11.3.3.1 Observation de l'hystérésis

On suit toujours l'extension de fibres de chromatine ayant en moyenne 10 nucléosomes. On leur applique initialement autour de 50 tours négatifs, puis on enregistre successivement l'extension de la fibre de chromatine lorsqu'on lui applique +100 tours puis -100 tours (par pas de 1 tour), on réalise plusieurs de ces cycles. La figure 11.9 présente un ensemble de courbes typiques obtenues pour une telle fibre, à 0,4 pN : les courbes vertes correspondent aux phases où l'on applique 100 tours positifs, les courbes rouges correspondent au retour (où l'on applique -100 tours).

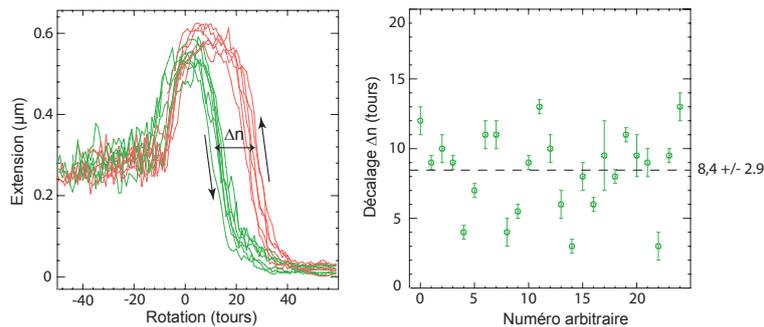


FIGURE 11.9 – (a) Courbes *en chapeau* obtenues pour une fibre de chromatine lorsqu'on lui impose, à partir de -50 tours, 100 tours positifs (courbes vertes) puis 100 tours négatifs (courbes rouges). Les courbes aller et retour présentent un hystérésis caractérisé par la valeur de Δn . Pour chaque tour de rotation imposé, l'extension donnée ici correspond à la valeur moyenne de l'extension mesurée pendant 10s (256 points acquis par une caméra 25 Hz). (b) On représente ici la valeur de Δn pour 25 fibres de chromatine analysées. On représente la valeur moyenne de cette valeur $\Delta n_{moy} = 8.4 \pm 2.9$ tours.

On observe très clairement un hystérésis entre les jeux de courbes *aller* et *retour*. Ce phénomène a déjà été étudié dans l'équipe de J.-L. Viovy (voir Partie 2, Chapitre 6) (Bancaud et al. (2007)). Cet hystérésis est dû au fait que les nucléosomes, lorsqu'ils sont soumis à un couple de torsion positif suffisant, subissent une transition chirale vers un état appelé réversible (transition décrite dans la Partie 2, Chapitre 6). Dans notre cas, on part d'une fibre de chromatine surenroulée négative. On lui applique progressivement des tours positifs, les courbes vertes correspondent à la réponse d'une fibre pour laquelle les nucléosomes sont dans leur état canonique (équilibre thermodynamique entre les trois configurations possibles de cet état : négatif, ouvert, positif). Les courbes retour correspondent, elles, à la réponse d'une fibre de chromatine dans laquelle les nucléosomes individualisés ont subi la transition chirale vers l'état de réversible, configuration dans laquelle ils absorbent un tour positif par rapport à l'état canonique. Les courbes rouges sont ainsi décalées vers les valeurs positives de rotation. Lorsque l'on parcourt les courbes *retour*, cette nouvelle configuration reste stable jusqu'à des valeurs intermédiaires de torsion négative, puis disparaît lorsqu'on applique davantage de torsion négative. Le cycle est alors réinitialisé et la courbe *aller* suivante se superpose aux autres courbes *aller*.

11.3.3.2 Estimation du nombre de nucléosomes individualisés par fibre

En mesurant l'amplitude de cet hystérésis, à savoir Δn , on peut évaluer le nombre de nucléosomes isolés et caractériser ainsi la qualité de nos fibres. La figure 11.9(b) présente les valeurs de Δn obtenues pour

11.3. COMPORTEMENT EN TORSION D'UNE FIBRE DE CHROMATINE AYANT PLUSIEURS NUCLÉOSOMES POSITIONNÉS DE MANIÈRE ALÉATOIRE

25 fibres de chromatine différentes : on obtient une valeur moyenne de 8.4 ± 2.9 tours. On en déduit que l'on a, en moyenne, ~ 8 nucléosomes individualisés sur nos fibres. Ceci est cohérent avec notre protocole de préparation des fibres (qui prévoit une moyenne de 10 nucléosomes par fibre), et avec les clichés de microscopie électronique obtenus sur ces reconstitutions (voir Figure 11.1).

11.3.4 Borne inférieure au couple à appliquer, à la fibre de chromatine, pour induire la transition chirale des nucléosomes

Nous avons répété l'expérience présentée dans la figure 11.9, pour une fibre de chromatine, à différentes forces (comprises entre 0.30 et 1.60 pN), dans les mêmes conditions de tampon que précédemment (tampon B_0). On a obtenu ainsi une série de courbes en chapeau *aller* et *retour* (Figure 11.10) : pour les construire, on a moyenné, à chaque pas de rotation, l'extension de la fibre de chromatine sur 256 points (soit ~ 10 s). On a ensuite rincé la chambre microfluidique avec de l'héparine pour détacher les nucléosomes et on a enregistré à nouveau les courbes extension-rotation de l'ADN nu (courbes bleues), aux différentes forces explorées.

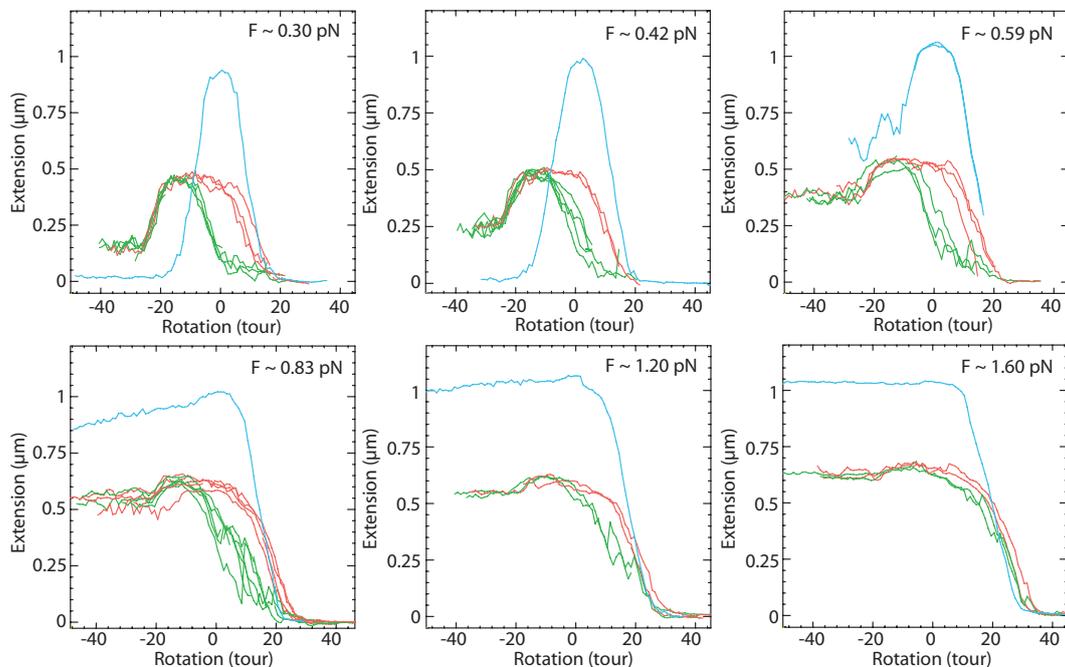


FIGURE 11.10 – Courbes extension-rotation d'une fibre de chromatine (courbes vertes et rouges) et de l'ADN nu correspondant (courbes bleues) pour différentes forces (allant de 0,30 à 1,60 pN). La référence 0 de rotation correspond au centre de rotation de la molécule d'ADN nue.

Alors que les courbes vertes et rouges forment bien deux jeux distincts pour des forces inférieures à 0.6 pN, les courbes vertes rejoignent les courbes rouges pour des forces supérieures à 1.2 pN. On a un régime intermédiaire, entre 0.6 et 1.2 pN, pour lequel une partie des nucléosomes réussit à transiter vers l'état *réversible* lors des courbes *aller*, les courbes *aller* semblent se déstabiliser pour rejoindre les courbes *retour*. On applique, dans ces conditions, un couple suffisant pour changer la structure chirale du nucléosome. Il serait intéressant de pouvoir estimer sa valeur.

Alors que la réponse en torsion de molécules d'ADN est relativement bien connue (voir Partie 2, Cha-

pitre 5) et que des modèles théoriques permettent de prédire assez finement ses caractéristiques (valeur du module de torsion C , dépendance de C avec la force et les conditions ioniques) (Moroz and Nelson (1997)), (Bouchiat and Mezard (1998)), (Mosconi et al. (2009)), il n'en va pas de même pour une fibre de chromatine. Sa structure est plus complexe : si on l'assimile à une fibre sur laquelle est assemblé un certain nombre de perles, il paraît discutable de pouvoir la considérer comme une fibre homogène et de lui appliquer un modèle de type *Worm Like Chain* comme pour l'ADN afin d'en déduire son comportement en torsion. En effet, les perles sur lesquelles s'enroulent l'ADN risquent d'avoir une contribution majeure dans la réponse en torsion de la fibre, pouvant sans doute servir de points de déclenchement du flambage de la fibre du fait de la courbure intrinsèque de l'ADN au niveau de la particule de coeur. Certains groupes l'ont néanmoins fait ((Cui and Bustamante (2000)), (Bancaud et al. (2006))) et ont extrait, de ces analyses, des ordres de grandeur pour son comportement élastique (longueur de persistance d'une fibre de chromatine ~ 28 nm, module d'élasticité ~ 5 -8 pN). D'autres études ont proposé de nouveaux modèles pour caractériser le comportement torsionnel d'une fibre de chromatine. Le modèle à *deux angles* est un modèle très simple qui décrit la structure de la chromatine par la donnée de deux paramètres : l'angle α d'entrée-sortie de l'ADN nucléosomal et l'angle β représentant le changement d'orientation entre deux nucléosomes successifs (Ben-Haim et al. (2001)), (Schiessel et al. (2001)), (Wagner (2006)). En supposant que tous les nucléosomes de la fibre sont dans la configuration canonique croisée négative et que la contrainte de torsion est accumulée dans les ADN de liaison, on peut en déduire la réponse rotationnelle de la molécule. Ce modèle prédit un module de torsion de 35 nm. Le modèle à *trois états* suppose, quant à lui, que ce sont essentiellement les nucléosomes qui encaissent la contrainte de rotation en basculant entre les trois états distincts déjà cités précédemment (négatif, ouvert, positif), ces transitions permettent d'accumuler la contrainte avec très peu de diminution de longueur et le module de torsion associé, ~ 5 nm, est plus faible que ce que prédit le modèle précédent (Bancaud et al. (2006)). Ces modèles ne peuvent prédire le comportement rotationnel de la fibre qu'au centre de leurs courbes en chapeau et ne permettent pas de prévoir l'apparition du régime plectonémique. La dernière approche présentée permet de prédire la variation du couple appliqué à la fibre au voisinage de son centre de rotation : Γ varie entre 0 et 4 pN.nm/rad autour du centre de rotation. Une étude récente a permis de mesurer directement le couple associé à une fibre de chromatine (Celedon et al. (2009)) : celui-ci varie entre 0 et 7 pN.nm/rad autour du centre de rotation, ce qui est cohérent avec les prédictions précédentes.

Dans notre situation, nous avons souhaité rester prudent et renoncer à appliquer un modèle de type *Worm Like Chain* pour décrire le comportement en torsion de la chromatine, et ce pour plusieurs raisons : les fibres que l'on prépare contiennent, en moyenne, 10 nucléosomes sur un fragment d'ADN de ~ 1200 nm, ceci implique que 58 % de l'ADN est complexé autour des octamères d'histones, il s'agit donc d'une proportion importante d'ADN. L'ADN étant fortement courbé au niveau de chacun de ces nucléosomes, on imagine qu'ils vont avoir une contribution importante à la réponse en torsion de la fibre complète. Ces nucléosomes ne sont pas disposés de manière régulière et il n'est pas exclu que certains d'entre eux se trouvent proches et puissent donc interagir et former des paquets. Toutes ces raisons nous font penser que l'on est loin d'une fibre homogène et loin également des modèles théoriques développés jusqu'à présent (qui supposent également une organisation régulière des nucléosomes).

Malgré cela, on peut déduire de nos expériences une borne inférieure au couple nécessaire à exercer sur la fibre de chromatine pour permettre aux nucléosomes de transiter vers l'état *réversible*. Analysons la variation du couple appliqué à la fibre lors de l'enregistrement d'une courbe extension-rotation (voir Figure 11.11(gauche)) : lorsqu'on applique des tours positifs à la fibre, à partir de son centre de rotation, le couple Γ appliqué à celle-ci augmente continûment jusqu'à atteindre une valeur maximale Γ_f pour n_f tours introduits. A cette valeur de couple a lieu le flambage de la fibre. L'application de tours positifs supplémentaires permet de parcourir le régime plectonémique, caractérisé par une valeur de couple constante (égale à Γ_f). Dans ce régime plectonémique, l'énergie que l'on fournit grâce à ce couple permet de réaliser

11.3. COMPORTEMENT EN TORSION D'UNE FIBRE DE CHROMATINE AYANT PLUSIEURS NUCLÉOSOMES POSITIONNÉS DE MANIÈRE ALÉATOIRE

deux opérations (voir Figure 11.11(droite)) : lorsque l'on passe de l'état A à l'état B, on a d'une part, un raccourcissement ΔL de la longueur bout-à-bout de la fibre étirée et, d'autre part, l'augmentation de la taille de la région plectonémique.

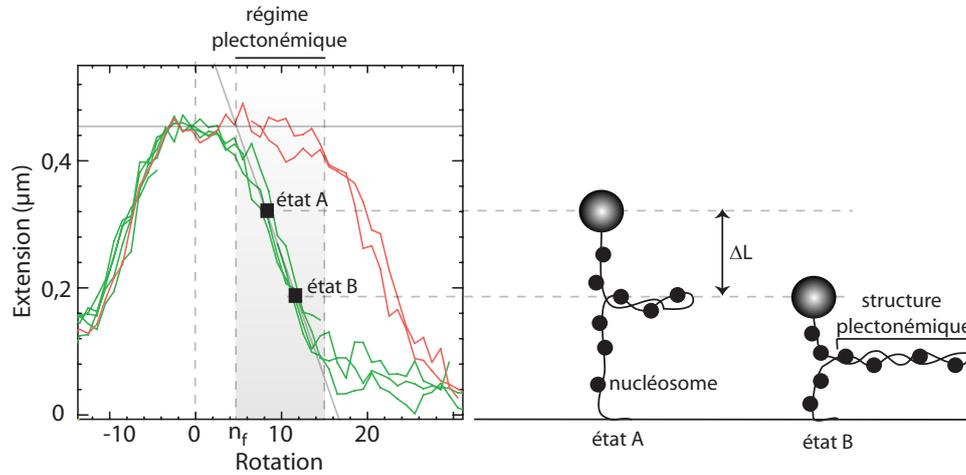


FIGURE 11.11 – (à gauche) Courbes *aller* (vertes) et *retour* (rouges) caractérisant l'extension d'une fibre de chromatine en fonction de la rotation, à 0,30 pN. La référence 0 de rotation correspond au centre de rotation de la fibre de chromatine. n_f correspond au nombre de tours à appliquer à la fibre pour qu'il y ait flambage. On repère deux états A et B dans le régime plectonémique que l'on schématise à droite des courbes. (à droite) Schématisation des deux états A et B : on passe de A à B en appliquant n tours positifs. Cela entraîne une diminution de l'extension bout-à-bout de la fibre de ΔL et une augmentation de la taille de la structure plectonémique.

Résumons ceci par la relation énergétique suivante :

$$2\pi n\Gamma_f = F.\Delta L + (E_p - E_0)n\ell_p$$

où F est la force de traction appliquée, $(E_p - E_0)$ est la différence d'énergie, par unité de longueur, de la fibre dans la région étirée (région participant à l'extension bout-à-bout de la fibre) par rapport à la région plectonémique, n est le nombre de tours imposés à la fibre et ℓ_p , la pente de la courbe extension-rotation dans la région plectonémique ($\Delta L = n.\ell_p$).

Nous ne connaissons pas la valeur de E_p pour une fibre de chromatine, le deuxième terme ne nous est donc pas accessible. Nous pouvons par contre donner une borne inférieure au couple Γ_f dans cette région plectonémique : $\Gamma_{f_{min}} = \frac{F.\ell_p}{2\pi}$.

Dans notre exemple (Figure 11.10), pour des forces inférieures à 0.6 pN, les courbes vertes correspondent à une fibre dans laquelle les nucléosomes n'ont pas subi de transition chirale, ceci indique que le couple Γ_f atteint dans le régime plectonémique, n'est pas suffisant pour permettre la transition chirale des nucléosomes (dans nos conditions expérimentales). Par contre, puisqu'on applique des tours positifs au delà du régime plectonémique, la bille finit par arriver à proximité de la surface (au delà de 30 tours, dans notre cas), le couple augmente alors à nouveau ce qui permet, même à ces faibles forces, d'atteindre une valeur du couple suffisante pour que la transition chirale ait lieu et que les courbes retour soient décalées.

Mais dans ce cas, on n'a aucun moyen d'estimer le couple imposé lorsque la bille est au sol. A 0.6 pN par contre, les courbes vertes commencent à se déstabiliser dans le régime plectonémique, pour se rapprocher des courbes *retour*, le couple Γ_f est maintenant suffisant pour permettre aux premiers nucléosomes de basculer vers l'état réversible : le couple nécessaire est supérieur à $\Gamma_{f_{min}} \sim 4.5 \text{ pN.nm/rad}$ (on a ici $F \sim 0.6 \text{ pN}$, $l_p = 47.2 \text{ nm/tr}$). Cette borne minimale a un ordre de grandeur compatible avec d'autres repères que l'on connaît : on s'attend à ce que le couple de flambage de la fibre de chromatine soit inférieur à celui d'un ADN nu dans les mêmes conditions de force et de tampon : on estime celui de l'ADN nu (obtenu après traitement de la fibre à l'héparine) : $\Gamma_f = \sqrt{2F\xi k_B T} \sim 16 \text{ pN.nm/rad}$ ⁿ.

11.3.5 Borne supérieure au couple, à appliquer à la fibre, pour permettre la transition chirale des nucléosomes

11.3.5.1 Présentation de l'expérience

On essaie de se servir de valeurs de couple que l'on connaît pour trouver une borne supérieure au couple permettant la transition chirale des nucléosomes. On réalise l'expérience présentée sur la figure 11.12. On commence par obtenir les courbes *aller* (vertes) et *retour* (rouges), pour $F = 0,4 \text{ pN}$ en balayant en rotation, de -60 à $+40$. On a, dans ce cas, un hystérésis clair entre les deux jeux de courbes. Remarquons que si on se contente d'aller de -60 à $+19$ (état D) puis de revenir à des valeurs négatives de rotation, on parcourt, au retour, la même courbe qu'à l'aller, on n'observe pas d'hystérésis. Le couple imposé lors du régime plectonémique, à $0,4 \text{ pN}$, n'est pas suffisant pour induire la transition chirale des nucléosomes.

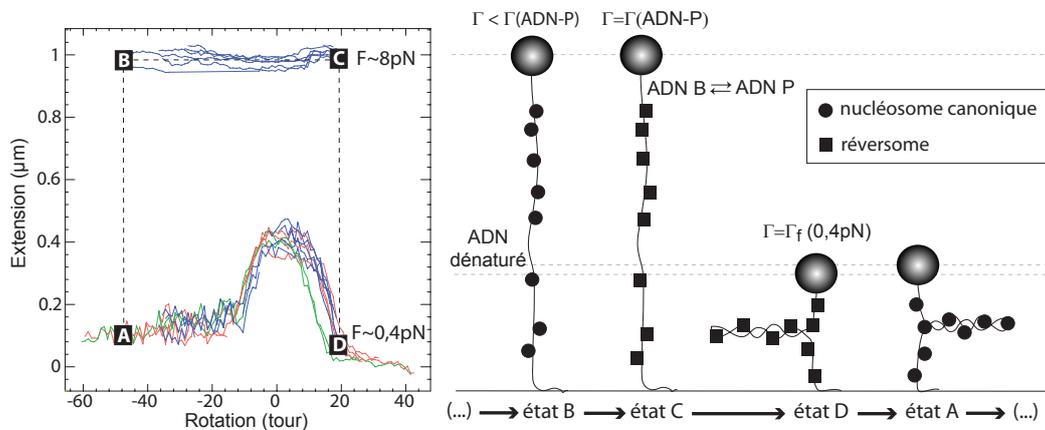


FIGURE 11.12 – (à gauche) Courbes extension-rotation d'une fibre de chromatine à 0,4 pN ou 8 pN. Les courbes vertes et rouges correspondent à la réponse de la fibre à 0,4 pN et présentent l'hystérésis caractérisé dans les paragraphes précédents. Les courbes bleues correspondent à la réponse de la fibre lorsqu'on réalise le cycle $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D$ décrit dans le texte principal. (à droite) Représentation de l'état de la fibre de chromatine lorsqu'on parcourt ce cycle.

On se place ensuite à des valeurs de rotation négatives (entre -50 et -30 tours, *état A*) et on augmente la force jusqu'à 8 pN (*état B*), puis on impose des tours positifs jusqu'à atteindre $+19$ tours (*état C*). On diminue ensuite brusquement la force à $0,4 \text{ pN}$, on se retrouve instantanément au point D. Lorsqu'on ajoute des tours négatifs pour revenir au point A, on parcourt l'une des courbes bleues. On refait plusieurs

n. Formule rappelée dans la Partie 2, Chapitre 5.

fois le cycle ABCD.

11.3.5.2 Interprétation

A haute force (passage de B à C), on conserve l'intégralité des nucléosomes puisque, dès qu'on diminue la force, on parcourt exactement les mêmes courbes qu'initialement (on n'a ni augmentation de la longueur maximale de la fibre, ni décalage de son centre de rotation).

A cette force, on observe, comme pour l'ADN nu, un comportement singulier lorsqu'on applique de nombreux tours positifs (on est allé jusqu'à + 100 tours sans observer de variation significative de l'extension de la molécule) : l'extension de la fibre, au lieu de décroître de manière linéaire du fait de la formation des plectonèmes, présente un plateau très semblable à celui observé lors de la formation de la phase d'ADN dite P. Pour maintenir cette extension constante, trois solutions peuvent être envisagées :

1. Les nucléosomes sont capables de capturer toute cette accumulation de torsion positive : on suppose donc que l'ADN de liaison ne subit aucune déformation (on a donc ni formation de plectonèmes, ni transition de celui-ci vers la phase d'ADN dite P que l'on observe pour des molécules d'ADN fortement surenroulées et des forces supérieures à 3 pN (Allemand et al. (1998)), (Bryant et al. (2003))) ce qui correspondrait bien à une situation où on maintient la longueur bout-à-bout constante. Or on n'observe pas de variation de longueur de la fibre pour l'ajout d'au moins 100 tours positifs. On a estimé le nombre moyen de nucléosomes portés par la fibre à 8 environ, il faudrait donc que chacun absorbent plus de 12 tours positifs. Etant donné leur structure et la façon dont se fait la stabilisation de l'ADN autour de la particule de coeur (par l'intermédiaire de 14 points de contact privilégiés coïncidant avec les sillons mineurs de l'ADN nucléosomal, espacés de ~ 10 pb, ce qui impose largement l'hélicité de l'ADN autour de l'octamère d'histones), on voit difficilement comment cela serait possible.

2. L'accumulation de la torsion positive est entièrement capturée par l'ADN de liaison, les nucléosomes restant dans leur état canonique (pas de transition vers l'état réversible). Ceci est en désaccord avec le fait que, dès que l'on diminue la force pour passer de l'état C vers l'état D puis que l'on impose des tours négatifs, on décrit une courbe qui se trouve être confondue avec les courbes *retour* caractéristiques d'une fibre pour laquelle les nucléosomes ont subi la transition chirale vers l'état de réversible.

3. On en déduit que l'accumulation de torsion positive introduite est absorbée à la fois par les nucléosomes et l'ADN de liaison : le couple existant dans la fibre permet aux nucléosomes de basculer dans l'état réversible, ceci se fait sans changement de longueur pour l'ADN impliqué dans la structure des particules de coeur. L'ADN de liaison subit, quant à lui, une transition de phase de la phase B vers la phase P^{oP}, ce qui lui permet, tant que les deux phases coexistent, de conserver une extension bout-à-bout constante malgré l'introduction de tours positifs supplémentaires (Allemand et al. (1998)). Cette transition est caractérisée par une valeur de couple $\Gamma(ADN - P)$ constante, elle a été estimée par d'autres expériences de micromanipulation $\Gamma(ADN - P) \sim 34$ pN.nm/rad (Bryant et al. (2003)). On en déduit que pour une valeur du couple égale $\Gamma(ADN - P)$, tous les nucléosomes ont pu passer sous la forme de réversibles : cela nous

o. Voir Partie 2, Chapitre 5, pour la présentation de la phase P.

p. Dans l'état C, on a déjà l'équilibre entre la phase B et la phase P. En effet, (Allemand et al. (1998)) montre que la phase P apparaît pour des valeurs $\sigma = \frac{\Delta Lk}{Lk_0} = \frac{n}{Lk_0} = +0.037$ dans un tampon phosphate à 10 mM. Estimons Lk_0 dans notre cas. L'ADN impliqué dans la structure des nucléosomes ne va pas, dans un premier temps, transiter vers la phase P puisque son hélicité doit être préservée pour interagir correctement avec l'octamère d'histones et ne pas permettre aux nucléosomes de se dissocier. L'ADN restant correspond à une longueur de $3500 - 8 \times 150 \sim 2300$ pb, en considérant que l'on a 8 nucléosomes sur la fibre, on a donc $Lk_0 = 2300/10.5 \sim 220$ et $\sigma \sim +0.09$.

donne une borne maximale au couple suffisant pour permettre la transition chirale d'un nucléosome.

Les deux derniers paragraphes permettent de proposer un encadrement de la valeur du couple nécessaire pour permettre la transition chirale d'un nucléosome vers l'état de réversible dans les conditions de l'expérience^q. On le note $\Gamma_{transition}$, et il vérifie :

$$4.5 \text{ pN.nm/rad} < \Gamma_{transition} < 34 \text{ pN.nm/rad}.$$

Nous pouvons faire une dernière remarque sur ces résultats. Nous avons constaté que le couple appliqué dans l'état C (égal à $\Gamma(ADN - P) \sim 34 \text{ pN.nm/rad}$) n'était pas suffisant, dans les conditions de l'expérience, pour éjecter les nucléosomes. Nous pouvons rapprocher ceci de la prédiction faite par J. Marko sur le couple nécessaire à l'éjection d'un octamère d'histones par application d'une contrainte torsionnelle, à savoir $9 k_B T$ soit 37 pN.nm/rad (Sarkar and Marko (2001)).

11.4 Motivation de la préparation d'un mononucléosome

11.4.1 Les tests sur des fibres de chromatine ont été encourageants...

Les premiers tests que l'on a effectué sur des fibres de chromatine sont encourageants : on a été capable de retrouver des comportements qui avaient déjà été caractérisés précédemment mais également de pointer du doigt quelques différences :

1. A haute force ($F > 3 \text{ pN}$), l'éjection des nucléosomes se fait de manière discontinue. Cependant, alors que les études précédentes ne reportent que des sauts de $\sim 25 \text{ nm}$, nous observons une variété de taille beaucoup plus importante (comprises entre 15 et 60 nm).

2. A basse force ($F < 1.6 \text{ pN}$), l'étude systématique d'une fibre de chromatine et de l'ADN nu correspondant (après traitement à l'héparine) nous a permis de retrouver le fait que leurs réponses extension-rotation sont décalées à la fois en rotation (de ΔR) et en extension (de $\Delta \ell$). Le décalage en torsion peut être rapproché au nombre de nucléosomes individualisés sur la fibre. L'étude en torsion de fibres de chromatine nous a permis de retrouver les résultats de A. Bancaud concernant son comportement hystérétique et d'encadrer le couple nécessaire pour que cet hystérésis puisse être observé.

11.4.2 ... mais des difficultés persistent

Le fait d'avoir des fibres irrégulières (positions des nucléosomes non contrôlées) pose problème. Le fait que l'on puisse avoir des paquets de nucléosomes sur la fibre rend délicat leur étude car ces paquets ont sans doute un comportement très différent de celui des nucléosomes individualisés : ils risquent d'être éjectés conjointement, masquant les caractéristiques du départ d'un unique nucléosome, et ils auront vraisemblablement une réponse en torsion différente car l'encombrement stérique de ce paquet risque d'empêcher d'éventuelles réorganisations internes d'un nucléosome (vers l'état de réversible par exemple).

On a vu précédemment que le fait d'avoir plusieurs nucléosomes allait être problématique dès qu'on allait souhaiter travailler avec des protéines, car il nous faudra utiliser alors des tampons salins. Or, dans

q. Sa valeur risque de dépendre, entre autres, du tampon dans lequel est réalisée l'expérience dans la mesure où la transition nécessite de rompre des contacts ADN-histones d'une part, et histones-histones d'autre part, ces contacts étant essentiellement assurés par des interactions de type électrostatique.

de tels tampons, les interactions nucléosomes-nucléosomes se renforcent et on est très souvent confronté, à basse force, à des problèmes de *collage* des fibres de chromatine. Un dernier élément nous a dissuadé de travailler avec plusieurs nucléosomes par fibre : nous souhaitons étudier l'action de facteurs de remodelage (FaRC) sur un substrat de chromatine, ces facteurs sont connus pour être capables de déplacer les nucléosomes. Si nous travaillons d'emblée avec plusieurs nucléosomes par fibre, on va compliquer significativement notre étude car les signaux que l'on observera pourront correspondre à des interactions FaRC-ADN, FaRC-nucléosomes, ADN-nucléosomes ou nucléosomes-nucléosomes.

11.4.3 Vers un substrat mono-nucléosomal

Ces arguments nous ont convaincu que, pour comprendre, en pinces magnétiques, l'action d'un facteur de remodelage sur la chromatine, il fallait commencer par étudier son comportement en présence d'un unique nucléosome positionné précisément sur un ADN court. Les signaux que l'on enregistrera correspondront soit à des interactions FaRC-ADN (que nous avons au préalable caractérisées), soit à des interactions FaRC-nucléosome, ce que l'on souhaite étudier à présent.

Fort de cette constatation, notre travail a consisté à produire un substrat mono-nucléosomal (ce sera l'objet du prochain chapitre), puis à caractériser son comportement en bénéficiant des observations faites sur les fibres de chromatine plus longues. Notre souhait est de mettre en évidence une signature claire de la présence d'un unique nucléosome, afin d'être certain, lorsqu'on ajoutera les FaRC étudiés, de la nature du substrat sur lequel ils agissent. Cette signature caractéristique de la présence d'un unique nucléosome est à chercher à basse force, car, comme on l'a vu, on assiste à haute force au détachement (souvent irréversible) du nucléosome et donc à la destruction de notre substrat. A basse force, on pourra aussi bien explorer la réponse en torsion ou en étirement pour essayer de distinguer un ADN d'un substrat mononucléosomal. On présentera cette étude au Chapitre 14, ainsi que des pièges expérimentaux auxquels on peut être confronté (Chapitre 13).

Chapitre 12

Construction d'un mono-nucléosome

Sommaire

12.1 Première tentative : préparation, par PCR, d'un ADN modifié aux extrémités, puis positionnement ultérieur d'un nucléosome.	181
12.1.1 Préparation du fragment d'ADN	181
12.1.2 Positionnement du nucléosome sur ce fragment	181
12.2 Une technique de préparation du substrat plus longue mais qui a fait ses preuves	183
12.2.1 Positionnement d'un unique nucléosome sur une séquence 601, insérée dans un fragment d'ADN de 308 pb	183
12.2.2 Construction envisagée et impératifs imposés par celle-ci	186
12.2.3 Production des cinq fragments d'ADN	187
12.2.4 Optimisation de la ligation sur l'exemple du couple de fragments 1 et 2	188
12.2.5 Méthodologie adoptée pour la ligation du fragment final	195
12.2.6 Validation de la méthode de reconstitution : image EM	196

La construction que l'on souhaite réaliser est la suivante : on veut avoir un unique nucléosome positionné sur un court fragment d'ADN ($< 1 \mu\text{m}$) pour avoir un bon rapport signal sur bruit. On souhaite contrôler le positionnement de ce nucléosome sur l'ADN : on souhaite le mettre au centre du fragment pour qu'il ait suffisamment d'ADN de part et d'autre au cas où l'action d'un facteur de remodelage entraînerait de grands déplacements de l'octamère d'histones le long de l'ADN. Pour assurer le positionnement du nucléosome, on va utiliser un fragment d'ADN possédant une séquence positionnante : dans notre cas, ce sera la séquence 601. De plus, il est nécessaire que le fragment d'ADN possède, à ses extrémités, des bases modifiées par des biotines (resp. digoxygénines) de manière à pouvoir se lier de manière spécifique à une bille magnétique recouverte de streptavidine (resp. à une surface de verre fonctionnalisée avec de l'anti-digoxigénine). Il est nécessaire d'avoir plusieurs bases modifiées de chaque côté afin que l'ancrage se fasse en plusieurs endroits sur l'ADN, pour que celui-ci soit sensible à la torsion (dans le cas contraire, on aurait libre rotation de l'ADN autour de son unique point d'ancrage). Le substrat souhaité est schématisé sur la figure 12.1.

T. Owen-Hughes nous a aimablement fourni un plasmide (pGEM3Z) modifié par l'introduction de la séquence 601 dans son MCS (*Multiple Cloning Site*) (voir Annexe C.1). Nous appellerons par la suite ce plasmide modifié *pGEM3Z-mod*.

12.1. PREMIÈRE TENTATIVE : PRÉPARATION, PAR PCR, D'UN ADN MODIFIÉ AUX EXTRÉMITÉS, PUIS POSITIONNEMENT ULTÉRIEUR D'UN NUCLÉOSOME.

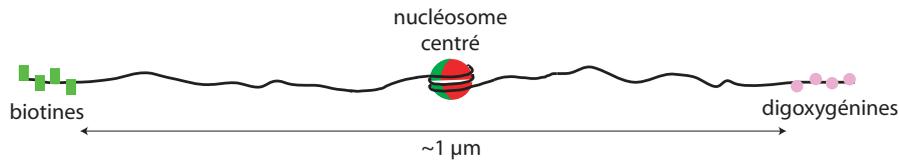


FIGURE 12.1 – Représentation schématique du substrat mono-nucléosomal que l'on souhaite préparer pour l'étude des facteurs de remodelage de la chromatine.

12.1 Première tentative : préparation, par PCR, d'un ADN modifié aux extrémités, puis positionnement ultérieur d'un nucléosome.

Notre première idée a été de préparer d'abord le fragment d'ADN en une seule étape, puis de positionner sur celui-ci un nucléosome.

12.1.1 Préparation du fragment d'ADN

Pour produire le fragment d'ADN recherché (caractéristiques précisées sur la figure 12.1), nous avons réalisé une PCR sur le plasmide pGEM3Z-mod en utilisant de longs *primers* contenant plusieurs bases modifiées. Les séquences des *primers* utilisés sont précisées dans l'Annexe C.2. Nous avons besoin de plusieurs bases modifiées à chaque extrémité du fragment, nous avons donc choisi des primers assez longs (64 et 65 pb) dans lesquels nous avons positionné 6 bases modifiées que nous avons espacé de 10 bp environ (périodicité de la double hélice d'ADN) afin de faciliter l'ancrage simultané de plusieurs d'entre elles à la surface de verre ou sur la bille, et de garantir que l'on ait une molécule sensible à la torsion (Annexe C.2, Figure C.2).

Les fragments d'ADN ainsi produits sont sensibles à la torsion :

Habituellement (voir Partie 2, Chapitre 5), les fragments, qu'on ligue aux extrémités de l'ADN que l'on souhaite manipuler, possèdent des bases modifiées sur les deux brins complémentaires et mesurent près de 500 pb. On est assuré que l'ancrage des molécules sur la surface de verre ou sur la bille se fasse par l'intermédiaire des deux brins ce qui empêche la libre rotation de la molécule autour de ces points d'ancrage. Dans le cas présent, les bases sont introduites par l'intermédiaire des primers, donc sur un seul des deux brins de l'ADN et sont réparties sur seulement 64-65 pb, il est moins sûr que cela suffise à garantir que les molécules puissent être sensibles à la torsion.

C'est le premier test que l'on a fait : en comparaison avec les préparations d'ADN habituelles (notamment celle avec l'ADN de 1,2 μm de long utilisé pour l'étude de γISW1a), il a été plus difficile de trouver des *billes en l'air*^a, mais on a quand même réussi à en trouver, certaines étant même liées à des ADN sensibles à la torsion. Même si leur nombre n'est pas très important, une seule suffit a priori pour une expérience en molécule unique. Ce qui va compliquer les choses, c'est lorsqu'on va vouloir que cette molécule ait, en plus, un unique nucléosome...

12.1.2 Positionnement du nucléosome sur ce fragment

Comme on l'a déjà vu, la séquence 601 a une plus grande affinité pour s'enrouler autour d'un octamère d'histones qu'une séquence d'ADN quelconque. On pense donc pouvoir, en trouvant un bon ratio

a. donc liées à la surface via une ou plusieurs molécules d'ADN.

12.1. PREMIÈRE TENTATIVE : PRÉPARATION, PAR PCR, D'UN ADN MODIFIÉ AUX EXTRÉMITÉS, PUIS POSITIONNEMENT ULTÉRIEUR D'UN NUCLÉOSOME.

ADN/particules de coeur, réussir à placer un unique nucléosome sur la fibre, au niveau de la séquence 601. Cette étude a été faite par C. Lavelle dans l'équipe de E. Le Cam, il mélange différents ratios ADN/particules de coeur (purifiées à partir du thymus de veau) puis procède à la reconstitution de chromatine en suivant un protocole très semblable à celui décrit dans l'Annexe C.3.2 (étapes de dilutions successives). Ses conclusions sont les suivantes :

La séquence 601 a un effet de positionnement très efficace :

Si on met très peu de particules de coeur par rapport aux sites 601 que l'on souhaite occuper, après reconstitution, très peu de molécules d'ADN possèdent des nucléosomes. Les quelques molécules qui en ont, n'en ont qu'un seul effectivement positionné sur la séquence 601 (voir figure 12.2(gauche)). Malheureusement, le taux de molécules ayant un nucléosome est très faible, on ne peut pas travailler en pinces magnétiques dans ces conditions-là : on serait obligé d'analyser de nombreuses molécules avant d'en trouver une avec un nucléosome. La caractérisation de la réponse d'un nucléosome serait fastidieuse.

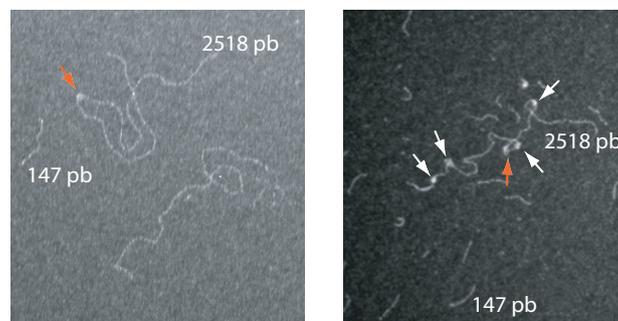


FIGURE 12.2 – Clichés de microscopie électronique, obtenus par C. Lavelle, de fragments d'ADN de 2518 pb possédant une séquence 601 centrale après dilutions successives en présence de particules de coeur (lorsqu'on a transféré de l'octamère d'histones vers les fragments d'ADN de 2518 pb, on a libération du fragment d'ADN de 147 pb enroulé initialement autour de l'octamère, on retrouve donc celui-ci sur les clichés ci-dessus). (à gauche) Reconstitution avec un très faible ratio *particules de coeur/ADN*, la plupart des molécules n'ont pas de nucléosome. Les quelques rares qui en ont, en ont un dont la position coïncide avec la séquence 601 (flèche rouge). (à droite) Reconstitution avec un ratio *particules de coeur/ADN* un peu plus élevé, beaucoup de molécules possèdent des nucléosomes, mais on en compte la plupart du temps plus d'un. La molécule présentée ici a un nucléosome positionné sur la séquence 601 (flèche rouge) et quatre autres nucléosomes positionnés aléatoirement sur l'ADN (flèches blanches).

Dès que l'on augmente la quantité de particules de coeur, on obtient des molécules avec plusieurs nucléosomes :

Dès que l'on augmente le ratio entre particules de coeur et sites 601, on peuple effectivement les sites 601 mais on positionne également d'autres nucléosomes de manière aléatoire sur le fragment d'ADN (voir Figure 12.2(droite)). C. Lavelle n'a pas réussi à trouver de ratio intermédiaire assurant d'avoir une majorité de molécules d'ADN avec un et un seul nucléosome positionné sur la séquence 601.

Nouvelle tactique :

12.2. UNE TECHNIQUE DE PRÉPARATION DU SUBSTRAT PLUS LONGUE MAIS QUI A FAIT SES PREUVES

Comme il ne paraît pas possible d'arriver à nos fins à partir de ce fragment d'ADN long, on décide d'isoler la séquence 601, de positionner dessus un unique nucléosome puis de liguer, à chacune de ses extrémités, des fragments d'ADN plus longs pour pouvoir manipuler l'ensemble en pinces magnétiques.

12.2 Une technique de préparation du substrat plus longue mais qui a fait ses preuves

12.2.1 Positionnement d'un unique nucléosome sur une séquence 601, insérée dans un fragment d'ADN de 308 pb

On étudie le positionnement d'un unique nucléosome sur un fragment d'ADN de 308 pb contenant la séquence 601^b : on choisit de ne pas prendre un fragment plus court car nous serons amené à le liguer à deux autres fragments d'ADN, on est garanti que le nucléosome sera loin des sites de ligation et on espère ainsi que l'étape de ligation perturbera peu le nucléosome.

On réalise en parallèle 6 reconstitutions : 4 vont être faites sur la base d'un échange avec des particules de coeur purifiées à partir de cellules du thymus de veau, les deux dernières seront menées à partir d'octamères seuls, issus d'érythrocytes de poulet. Dans tous les cas, la population de nucléosomes ne sera pas homogène puisque les octamères pourront contenir des variants d'histones ou des modifications post-traductionnelles. Remarquons que lorsqu'on réalise la reconstitution à partir d'octamères seuls, on doit ajouter, à l'ADN que l'on souhaite reconstituer, un ADN facilitant le transfert : on ajoute donc à ces préparations des fragments d'ADN de 146 pb (dans les mêmes proportions que l'ADN à reconstituer). Les ratios massiques utilisés entre ADN et octamères sont compris entre 0,5 et 2.

La méthode de reconstitution consiste toujours à mettre en présence l'ADN accepteur et les particules de coeur (ou les octamères d'histones) à haut sel (2 M NaCl) afin d'écranter les interactions électrostatiques entre les différentes espèces, puis à diminuer graduellement cette concentration saline pour permettre aux octamères d'histones de venir se positionner convenablement sur les fragments d'ADN. On a procédé par deux méthodes différentes basées sur ce principe :

- *Méthode de saut de concentration* : on part d'un mélange ADN/particules de coeur (ou octamères) porté à 2M NaCl que l'on maintient 10 min à 37°C. On le porte, en une étape de dilution^c, à 0.5 M NaCl et on le laisse ainsi 50 min toujours à 37°C. On finit par une dialyse contre une solution de TE^d pendant 1h30, à température ambiante.

- *Méthode de dilutions successives* : on part du même mélange ADN/particules de coeur (ou octamères) porté à 2M NaCl et maintenu 10 min à 37°C. On réalise 4 étapes de dilution successives portant le mélange aux concentrations 1M, 0.8M, 0.6M puis 0.4M NaCl. On attend 20 min à 37°C entre chacune de ces dilutions. On termine par une dialyse contre du TE, pendant 1h, à température ambiante.

On contrôle la qualité de ces reconstitutions sur gel d'abord, puis en microscopie électronique.

b. Le fragment de 308 pb est composé de la manière suivante : 52 pb - séquence 601 (147 pb) - 109 pb.

c. Les étapes de dilution sont faites, dans les deux méthodes, par ajout de TE+BSA : 10 mM Tris-Cl pH~7.5, 1 mM EDTA, 0.2% BSA

d. 10 mM Tris-Cl pH ~7.5, 1 mM EDTA.

12.2. UNE TECHNIQUE DE PRÉPARATION DU SUBSTRAT PLUS LONGUE MAIS QUI A FAIT SES PREUVES

12.2.1.1 Contrôle de la reconstitution sur gel d'acrylamide 4 %

On compare la qualité de reconstitution de ces 6 essais sur gel d'acrylamide 4 % (Figure 12.3). Les échantillons portés dans les différents puits sont les suivants :

- (1) : fragments d'ADN de 308 pb et de 146 pb.
- (2) : particules de coeur issues du thymus de veau.
- (3)^e : reconstitution à partir de particules de coeur (ratio ADN/particules de coeur ~ 1.6), par la méthode de saut de concentration.
- (4) : reconstitution à partir de particules de coeur (ratio ADN/particules de coeur ~ 0.8), par la méthode de saut de concentration.
- (5) : reconstitution à partir de particules de coeur (ratio ADN/particules de coeur ~ 1.6), par la méthode de dilutions successives.
- (6) : reconstitution à partir de particules de coeur (ratio ADN/particules de coeur ~ 0.8), par la méthode de dilutions successives.
- (7) : reconstitution à partir d'octamères seuls (ratio ADN/octamères ~ 0.7), par la méthode de saut de concentration.
- (8) : reconstitution à partir d'octamères seuls (ratio ADN/octamères ~ 0.5), par la méthode de saut de concentration.

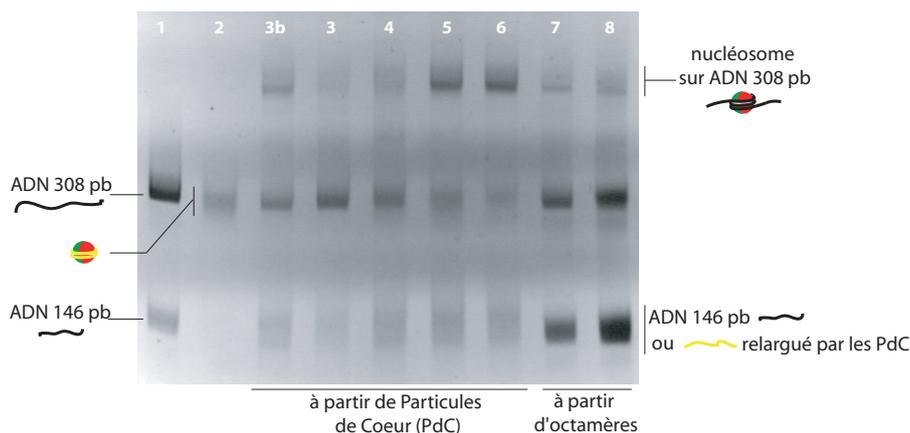


FIGURE 12.3 – Gel d'acrylamide 4%, migration 2h à 250 V, révélation par BET. (1) Fragments d'ADN de 308 et 146 pb. (2) Particules de coeur. (3b), (3) et (4) Reconstitution avec particules de coeur par la méthode de saut de concentration (ratio $\sim 1,6$ pour (3b) et (3), et 0.8 pour (4)). (5) et (6) Reconstitution avec particules de coeur par la méthode de dilutions successives (ratio $\sim 1,6$ pour (5) et 0,8 pour (6)). (7) et (8) Reconstitution à partir d'octamères seuls par la méthode de sauts de concentration (ratio ~ 0.7 pour (7) et 0.5 pour (8)).

Toutes les reconstitutions envisagées ont permis d'obtenir des fragments d'ADN de 308 pb avec un nucléosome, cependant leurs rendements ne sont pas comparables. On obtient les meilleurs résultats pour la reconstitution à partir de particules de coeur, par la méthode de dilutions successives (colonnes 5 et 6) : la bande correspondant aux fragments d'ADN de 308 pb et aux particules de coeur s'est vidée au profit de deux nouvelles bandes : l'une plus haute correspondant au substrat mononucléosomal attendu

e. (3b) correspond au même protocole que (3), la reconstitution est simplement faite à partir d'une préparation différente de particules de coeur.

12.2. UNE TECHNIQUE DE PRÉPARATION DU SUBSTRAT PLUS LONGUE MAIS QUI A FAIT SES PREUVES

(un nucléosome sur le fragment 308 pb), et l'autre plus basse correspondant aux fragments d'ADN de 146 pb relargués par les particules de coeur lors de l'échange de l'octamère d'histones. On va s'assurer de la qualité de ces reconstitutions en les observant en microscopie électronique.

12.2.1.2 Contrôle de la reconstitution en microscopie électronique

On caractérise en microscopie électronique la reconstitution correspondant à la colonne (6) du gel de la figure 12.3. La figure 12.4(a) montre un champ de vue typique obtenu en diluant, au 1/25ème, la préparation (6) dans du TE. Ce type de champ de vue nous permet de dénombrer les différentes espèces présentes dans la préparation (ADN nus, mononucléosomes, dinucléosomes) et de caractériser leurs distributions de taille. L'analyse faite sur plusieurs de ces champs de vue nous a permis de tirer les conclusions suivantes.

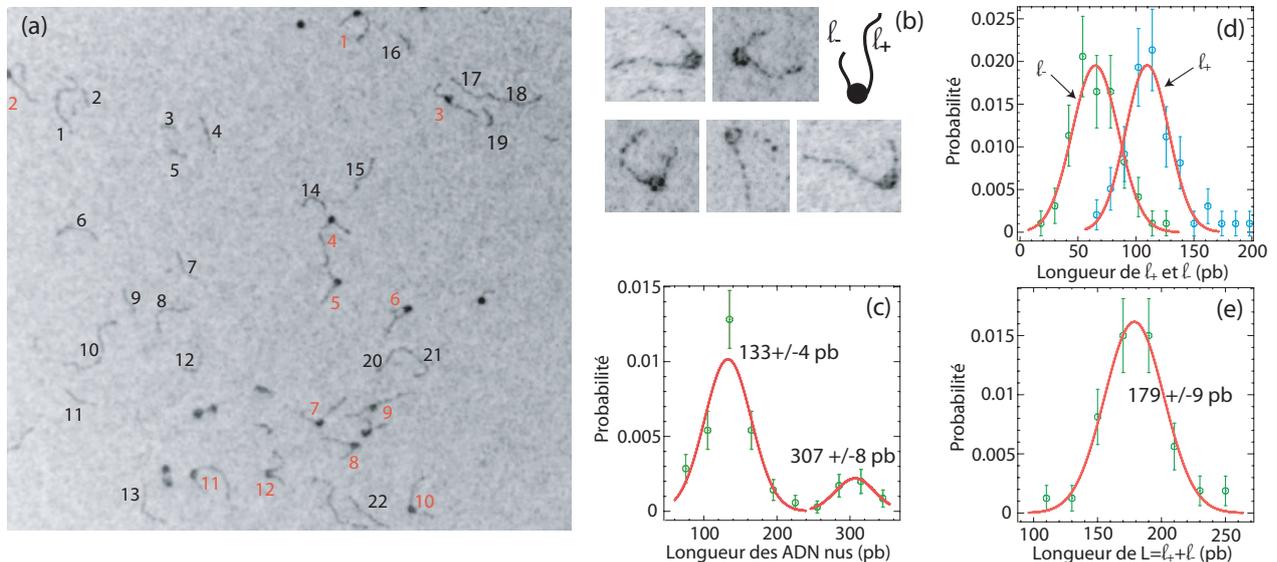


FIGURE 12.4 – (a) Cliché de microscopie électronique (x85 000) de la préparation de mononucléosomes (6). Les ADN nus sont numérotés en noir, les substrats nucléosomaux, en rouge. (b) Cinq mononucléosomes sont imagés (grossissement x250000), on a précisé les notations l_+ et l_- . (c) Distribution de taille (en pb) de 114 ADN nus. On distingue deux tailles caractéristiques : 307 ± 8 pb pour les fragments d'ADN contenant la séquence 601, et 133 ± 4 pb pour les fragments d'ADN relargués par les particules de coeur après échange de leur octamère d'histones. (d) Distribution de taille de 160 fragments d'ADN l_+ (80) et l_- (80) mesurés sur des substrats mononucléosomaux : $l_+ = 110 \pm 5$ pb et $l_- = 65 \pm 5$ pb. (e) Distribution de taille de $L = l_+ + l_-$: $L = 179 \pm 9$ pb.

Le rendement de la préparation de mononucléosomes est proche de 80%. La mesure de la longueur des ADN nus révèle deux tailles caractéristiques comme le montre l'histogramme de la figure 12.4(c) : sur 114 molécules d'ADN étudiées, on retrouve 16 ADN de 308 pb qui correspondent à la part des ADN non reconstitués, et 98 ADN de taille voisine de 133 pb^f qui correspondent aux ADN relargués

f. La valeur que l'on trouve est légèrement inférieure à 146 pb que l'on attend pour l'ADN nucléosomal impliqué dans les particules de coeur. Cela vient sans doute du mode de préparation des particules de coeur.

12.2. UNE TECHNIQUE DE PRÉPARATION DU SUBSTRAT PLUS LONGUE MAIS QUI A FAIT SES PREUVES

par les particules de coeur lors de l'échange de l'octamère. La proportion relative entre ces deux espèces nous donne une première idée du taux de reconstitution de chromatine dans notre échantillon^g : celui-ci est voisin de 80%.

On étudie ensuite les substrats nucléosomaux^h. Parmi les 89 substrats nucléosomaux recensés, 9 possèdent deux nucléosomes (soit 10 %). L'un de ces deux nucléosomes se trouve systématiquement à une extrémité du fragment d'ADN (cela pourra avoir une conséquence pour la ligation ultérieure d'un tel substrat). Aucun ADN ne porte plus de deux nucléosomes. Les 80 substrats nucléosomaux restant comportent un seul nucléosome. On peut obtenir ainsi le taux de reconstitution de mononucléosomes dans la préparation, en comparant le nombre de fragments de 308 pb nus (16) et le nombre de mononucléosomes identifiés (80). On obtient encore un rendement de l'ordre de 80%.

Le positionnement par la séquence 601 est efficace. La mesure systématique des longueurs ℓ_+ et ℓ_- des fragments d'ADN dépassant de part et d'autre de l'octamère d'histones, et de leur somme $L = \ell_+ + \ell_-$ a permis de caractériser la position de l'octamère d'histones sur le substrat d'ADN de 308 pb et la quantité d'ADN enroulée effectivement autour de l'octamère. On présente, sur la figure 12.4(b), cinq mononucléosomes obtenus au grossissement $\times 250000$, la longueur ℓ_+ (resp. ℓ_-) correspond au plus long (resp. court) des fragments d'ADN émergeant de la particule de coeur. La distribution de tailles, pour 80 mononucléosomes, fournit : $\ell_+ = 110 \pm 5$ pb et $\ell_- = 65 \pm 5$ pb. Ceci est cohérent avec la construction du fragment de 308 pb, qui prévoit que la séquence 601 (de 147 pb) soit entourée de deux fragments de 55 et 109 pb. La somme des deux fragments émergeant de la particule de coeur vaut $L = 179 \pm 9$ pb, on peut donc en déduire la longueur d'ADN enroulée autour de l'octamère d'histones : on trouve 128 ± 10 pb. Ceci est inférieur à la longueur de l'ADN nucléosomal déduit des études cristallographiques (147 pb). Mais il est à noter ici que les nucléosomes apparaissent dans une configuration ouverte où les contacts faibles, au niveau du SHL $= \pm 6.5$, sont probablement rompus (voir Figure 12.4(b)).

12.2.2 Construction envisagée et impératifs imposés par celle-ci

La figure 12.5 schématise la construction que l'on souhaite réaliser.

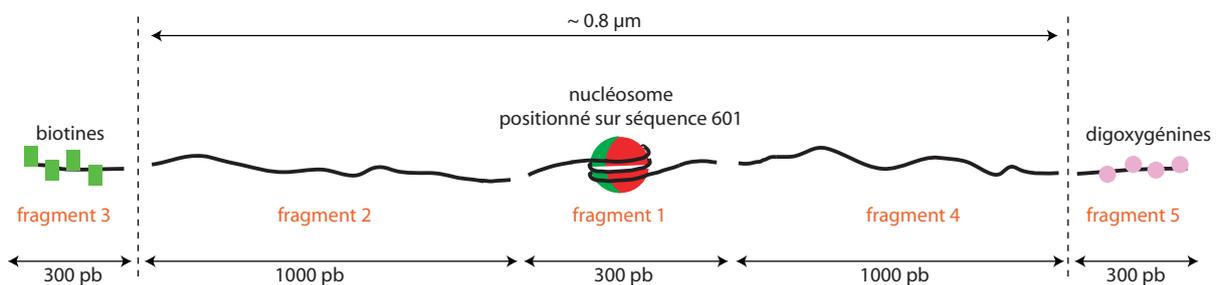


FIGURE 12.5 – Représentation schématique du substrat mono-nucléosomal que l'on souhaite préparer.

g. Puisqu'un ADN de 133 pb est relargué à chaque fois qu'un octamère se positionne sur un ADN de 308 pb

h. On ne tient pas compte des nucléosomes dont on ne voit aucun fragment d'ADN dépasser : ils correspondent aux particules de coeur utilisées pour la reconstitution.

12.2. UNE TECHNIQUE DE PRÉPARATION DU SUBSTRAT PLUS LONGUE MAIS QUI A FAIT SES PREUVES

Celle-ci se compose de cinq fragments que nous allons préparer de manière indépendante : un fragment central contenant la séquence 601 et sur lequel sera positionné le nucléosome (*fragment 1*), deux fragments d'ADN classiques de 1000 bp environ (*fragment 2* et *fragment 4*) qui serviront d'extensions au fragment central, et deux autres fragments modifiés par des biotines (*fragment 3*) et des digoxygénines (*fragment 5*) pour pouvoir manipuler la construction totale avec des pinces magnétiques. Ces cinq fragments seront assemblés par ligation.

On souhaite n'avoir qu'un seul nucléosome, il faut donc empêcher que le fragment central, lors des étapes de ligation, puisse se multimériser. De manière plus générale, à chaque étape de ligation, on voudra éviter qu'un fragment puisse se multimériser ou se liquer à un autre fragment non désiré. On va donc avoir recours à des enzymes de restriction coupant en des sites non palindromiques et on va choisir, pour toutes les jonctions entre fragments, des terminaisons différentes. Les enzymes de restriction laissant des extrémités cohésives (*sticky ends*) non palindromiques ne sont pas si courantes. La taille des fragments que l'on souhaite générer, ainsi que les plasmides facilement mis à notre disposition nous ont conduit à utiliser deux d'entre elles : TspRI et BbsI.

TspRI (Biolabs)	BbsI (Biolabs)
- tampon Neb4 + BSA - température optimale : 65°C - site de restriction reconnu :	- tampon Neb4 (75% d'activité) - température optimale : 37°C - site de restriction reconnu :
5' NNC ASTGNN 3' 3' NNGTSACNN 5'	5' GAAGACNN 3' 3' CTTC TGNN NNNN 5'
N = A ou C ou T ou G ; S = C ou G	

Les cinq fragments sont produits par PCR, les sites de restriction (des enzymes TspRI ou BbsI) n'apparaissant pas naturellement dans les plasmides dont nous nous servons, nous les avons introduit dans la séquence des primers que nous utilisons pour l'amplification, on aura donc un certain nombre de mésappariements entre les primers utilisés et la séquence du plasmide que l'on souhaite amplifier (entre 0 et 5 mésappariements en fonction des primers). Nous avons veillé à placer le site de restriction à au moins 10 pb de l'extrémité 5' des primers pour être sûr que la digestion puisse avoir lieu dans des conditions normales, et le plus loin possible de l'extrémité 3' pour ne pas gêner l'activité de la polymérase (du fait de la présence des mésappariements). Le fragment 1 est obtenu par PCR sur le plasmide pGEM3Z-mod (Annexe C.1), les fragments 2, 4 et 5 sont préparés à partir du plasmide commercial pSKpⁱ et le fragment 3 est obtenu à partir du plasmide pSA580^j. Les couples de primers utilisés sont fournis dans l'Annexe C.4.1.

12.2.3 Production des cinq fragments d'ADN

12.2.3.1 Phase d'amplification des cinq fragments d'ADN

Le protocole d'amplification des cinq fragments d'ADN cités ci-dessus est très classique et précisé dans l'Annexe C.4.2. On réalise un premier jeu de PCR en prenant, comme substrat, les plasmides précisés au paragraphe précédent (pGEM3Z-mod, pSKp ou pSA580). Les rendements ne sont pas excellents (surtout pour le *fragment 1*), certainement à cause des mésappariements existant entre les primers et leur substrat

i. Plasmide pSK Bluescript (+), 2961 pb.

j. Plasmide de 3523 pb, Cadeau de Sankar Adhya.

12.2. UNE TECHNIQUE DE PRÉPARATION DU SUBSTRAT PLUS LONGUE MAIS QUI A FAIT SES PREUVES

(plus nombreux pour le fragment 1). On réalise les PCR suivantes en prenant comme substrat les produits de PCR générés par la première amplification, on a ainsi une complémentarité parfaite entre les primers et leur substrat et on améliore nettement le rendement des PCR réalisées. Le gel de la figure 12.6 correspond à la migration des cinq fragments obtenus.

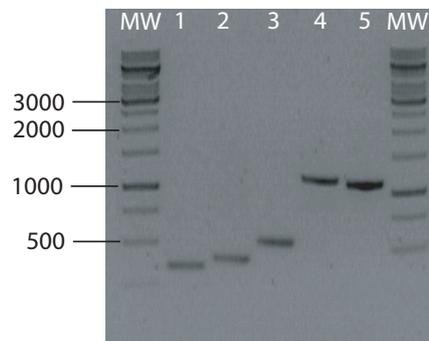


FIGURE 12.6 – Migration, sur gel d’agarose 1 %, des produits de PCR obtenus pour les cinq fragments d’ADN. (MW) : marqueur moléculaire (GeneRuler 1 kb, Fermentas), (1) : fragment 1 (348 pb). (2) : fragment 3 (365 pb) contenant des bases modifiées par des biotines. (3) : fragment 5 (486 pb) contenant des bases modifiées par des digoxygénines. (4) : fragment 2 (1144 pb). (5) : fragment 4 (1108 pb).

Les produits de PCR sont purifiés par un kit commercial (Millipore, Microcon YM100).

12.2.3.2 Digestion des fragments précédents

On digère les différents fragments obtenus en suivant les protocoles décrits dans l’Annexe C.4.3, et on purifie les produits de digestion par un kit commercial (Millipore, Micropure-EZ puis Microcon YM100).

Si la digestion a effectivement marché comme prévu, on se trouve en présence des cinq fragments schématisés sur la figure 12.7 : les fragments sont représentés dans des couleurs différentes. On précise les extrémités cohésives et complémentaires de chacun.

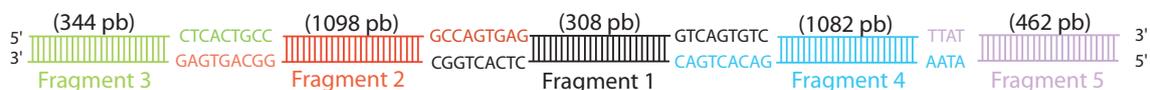


FIGURE 12.7 – Représentation des extrémités cohésives et complémentaires de chacun des fragments obtenus à la suite de la digestion.

12.2.4 Optimisation de la ligation sur l’exemple du couple de fragments 1 et 2

Il est crucial de bien maîtriser les étapes de ligation pour éviter la formation de produits non désirés issus de ligations non spécifiques. On veut par exemple à tout prix éviter la multimérisation du fragment

12.2. UNE TECHNIQUE DE PRÉPARATION DU SUBSTRAT PLUS LONGUE MAIS QUI A FAIT SES PREUVES

central qui donnerait la possibilité d'avoir plusieurs sites présentant un nucléosome. On souhaite de plus améliorer au maximum le rendement de la préparation.

12.2.4.1 Un protocole classique de ligation produit des multimères non désirés

On prépare les fragments 1 et 2 comme on l'a décrit ci-dessus. On réalise le mélange de ligation de ces deux fragments (à l'exception de la ligase), on le chauffe à 60°C puis on le laisse refroidir jusqu'à 16°C pour séparer des fragments non complémentaires qui se seraient éventuellement appariés. On lance la ligation de ces deux fragments par la *T4 DNA ligase* à 16°C pendant 10 heures, on porte ensuite le mélange à 65°C pendant 30 min pour inactiver la ligase puis on conserve le tout à 4°C. On contrôle les produits de la ligation des fragments 1 et 2, sur gel d'agarose 1 % (voir Figure 12.8).

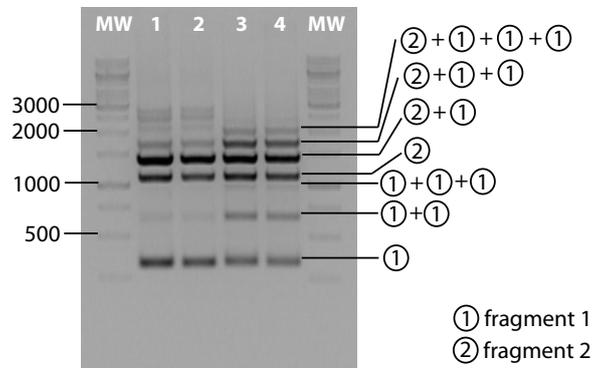


FIGURE 12.8 – Gel d'agarose 1 % sur lequel on fait migrer les produits de ligation, par la T4 DNA ligase, des fragments 1 et 2. (MW) : marqueur de poids moléculaire (GeneRuler 1 kb, Fermentas). (1) et (2) : les fragments 1 et 2 ont été obtenus à partir du couple de primers présentés dans l'Annexe C.4.1 avec une purification HSPF, (3) et (4) : les fragments ont été obtenus avec les mêmes primers mais purifiés par la méthode HYPUR.

Les colonnes (1) et (2)^k du gel présentent les produits de ligation obtenus : les trois bandes principales sortent vers 300, 1100 et 1400 paires de base. Elles correspondent respectivement au fragment 1 seul (308 pb + 18 bases aux extrémités), au fragment 2 seul (1098 pb + 18 bases aux extrémités) et à la ligation des deux (1415 pb + 18 bases aux extrémités). Cependant, on observe d'autres bandes d'intensité non négligeable : une bande vers 600 pb (dimérisation du fragment 1), vers 1700 pb (fragment 2 lié à deux fragments 1) puis d'autres comprises entre 2100 et 2900 pb correspondant à d'autres multimères des fragments 1 et 2 (notamment : dimérisation du fragment 2, deux fragments 2 avec un fragment 1...). Une ligation dans ces conditions n'est pas satisfaisante car elle peut introduire plusieurs fragments 1 dans la molécule finale, donc potentiellement plusieurs nucléosomes.

Les paragraphes suivant analysent les raisons éventuelles de ces multimérisations.

k. Les colonnes (1) et (2) (resp. (3) et (4)) sont identiques, et correspondent à deux même ligations menées en parallèle.

12.2.4.2 La séquence des sites de restriction introduits dans les primers est mal contrôlée

On a précisé dans les paragraphes précédents que, pour pouvoir produire les cinq fragments d'ADN, on avait dû introduire, dans les primers servant à leur amplification, des mésappariements afin de faire apparaître les sites de restriction des deux enzymes que nous utilisons. Si la production des primers n'est pas très bien contrôlée, il peut y avoir des variations dans la séquence et/ou la longueur des primers synthétisés. On peut donc avoir une variabilité importante des extrémités des fragments amplifiés (absence ou modification du site de restriction des enzymes TspRI ou BbsI). On a souhaité tester ceci en ayant recours à différentes qualités de purification des primers qu'offre Eurofins-MWG. La méthode de purification classique offerte par ce service est appelée HPSF (*High Purity Salt Free*) et est basée sur une chromatographie en phase inverse. Cependant, cette méthode peut ne pas se révéler suffisamment fidèle dans notre cas : elle ne permet pas de se débarrasser des primers éventuellement tronqués ou présentant des défauts de séquence. MWG propose une technique de purification mieux adaptée dans le cas d'expériences de mutagenèse ou de clonage : la méthode HYPUR. Celle-ci sépare les oligos en fonction de leur charge et de leur poids moléculaire sur un gel de polyacrylamide dénaturant. Les oligos de taille *ad hoc* sont retirés du gel et purifiés. Cette méthode garantit une homogénéité des oligos synthétisés à mieux que 90%.

La ligation des fragments 1 et 2 décrite au paragraphe précédent correspondait à la ligation de produits obtenus par des primers purifiés par la méthode HPSF (gel de la figure 12.8, colonnes 1 et 2). Nous avons réitéré l'expérience avec les mêmes primers, mais purifiés par la méthode HYPUR (gel de la figure 12.8, colonnes 3 et 4) : on obtient un gel sensiblement plus propre : on retrouve les trois bandes principales correspondant aux fragments 1 et 2 seuls et au produit de ligation des deux. Les bandes que l'on obtenait pour des poids moléculaires supérieurs à 2400 pb ont disparu. Par contre, on observe une répartition régulière de bandes encore caractéristique de la multimérisation du fragment 1 (dimère à 600 pb, trimère à 900 pb, fragment 2 + deux fragments 1 à 1700 pb, fragment 2 + trois fragments 1 à 2000 pb). Il semble que seul le fragment 1 se multimérise (pas de bande visible pour un dimère du fragment 2, contrairement au cas des colonnes 1 et 2).

La qualité de la purification des primers semble être importante pour la suite de nos expériences. Nous travaillerons dorénavant avec les mêmes primers mais purifiés par la méthode HYPUR. Cependant, même si les produits de ligation semblent plus propres, on n'a pas résolu le problème de multimérisation du fragment 1.

12.2.4.3 La méthode de purification des fragments après amplification n'est peut être pas suffisante

Lorsqu'on amplifie les fragments d'ADN 1 et 2 à partir des primers, on travaille généralement avec une quantité importante d'ADN Polymérase (ici, la T4 DNA polymerase). La "purification" des échantillons que l'on fait grâce aux kits commerciaux (Microcon YM100, Millipore) n'est pas une réelle purification. La membrane au travers de laquelle se fait la filtration ne sépare les molécules qu'en fonction de leur poids moléculaire : elle permet de ne retenir que les fragments d'ADN double brin de taille supérieure à 125 pb, on se débarrasse ainsi de la majorité des dNTP et des primers. La technique permet de reconcentrer et de changer de tampon de manière efficace mais ne permet pas de se débarrasser efficacement de la polymérase. Or, s'il reste de la polymérase lors de l'étape de digestion, on ne peut pas totalement exclure qu'elle puisse venir combler les extrémités simple brin générées par la digestion. On aurait alors des fragments digérés mais avec des extrémités franches. On perdrait alors toute spécificité de la ligation des différents fragments et on pourrait comprendre ainsi la présence de multimères.

12.2. UNE TECHNIQUE DE PRÉPARATION DU SUBSTRAT PLUS LONGUE MAIS QUI A FAIT SES PREUVES

Pour tester cette hypothèse, on a amplifié les fragments 1 et 2 (à partir de primers HYPUR), on a purifié les produits obtenus par une extraction phénol-chloroforme (qui nous assure de l'absence de la polymérase), on a digéré les produits obtenus par TspRI. On a refait une extraction phénol-chloroforme pour se débarrasser de TspRI, puis on a testé la ligation, par la T4 DNA ligase, des fragments 1 et 2. Les résultats sont présentés sur le gel 12.9 : on a fait migrer le fragment 1 (resp. 2) seul dans la colonne (1) (resp. (5)). La colonne (2) (resp. (4)) correspond au produit de ligation en présence du seul fragment 1 (resp. fragment 2). La colonne (3) présente les produits de ligation obtenus lorsque la T4 DNA ligase agit sur un mélange de fragments 1 et 2.

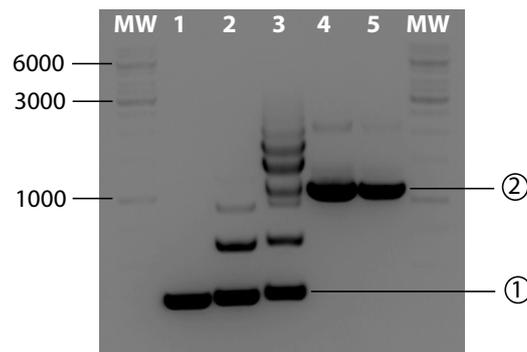


FIGURE 12.9 – Migration sur un gel d'agarose 1 %. (MW) : marqueur de poids moléculaire (GeneRuler 1 kb, Fermentas). (1) Fragment 1 seul. (2) Produits de ligation du fragment 1 seul. (3) Produits de ligation d'un mélange de fragments 1 et 2. (4) Produits de ligation du fragment 2 seul. (5) Fragment 2 seul.

La colonne (2) montre que l'on a encore une forte multimérisation du fragment 1, la colonne (4) montre que le fragment 2 peut se dimériser également un peu. La colonne (3) montre encore que les produits de ligation issus d'un mélange de fragments 1 et 2 sont variés du fait de la multimérisation possible des fragments.

12.2.4.4 Problèmes éventuels lors de l'étape de digestion

L'étape de digestion par TspRI pourrait poser problème : soit l'enzyme utilisée n'est pas active et on n'obtient pas les fragments de digestion souhaités, soit l'enzyme est active mais ne réussit pas à digérer des sites de restriction très proches des extrémités des fragments d'ADN (les sites de restriction de TspRI sont à 10 et 12 pb (resp. 11 et 17 pb) de l'extrémité du fragment 1 (resp. 2)).

On vérifie l'activité de restriction de TspRI sur un fragment d'ADN linéaire de 1032 pb contenant trois sites de restriction, la digestion est faite dans les mêmes conditions que précédemment (à 65° pendant 2 heures). La digestion de cet ADN est totale (les résultats apparaissent sur la figure 12.11 : le fragment non digéré apparaît sur la colonne (1), le fragment après digestion sur la colonne (2)), TspRI est donc active dans nos conditions expérimentales.

Il n'est pas facile de contrôler la digestion de nos fragments 1 et 2 dans la mesure où les sites de restriction sont proches de leurs extrémités. En effet, la longueur des produits digérés est peu différente de celle avant digestion (variation de masse de 6,0 % (resp. 3,2 %) pour le fragment 1 (resp. 2)). Son contrôle est plus facile sur le fragment 1 : on le fait migrer, avant digestion, et après digestion et purification, sur un

12.2. UNE TECHNIQUE DE PRÉPARATION DU SUBSTRAT PLUS LONGUE MAIS QUI A FAIT SES PREUVES

grand gel d'acrylamide à 10 %. Le gel obtenu est présenté dans la figure 12.10 : il montre que la digestion a bien lieu.

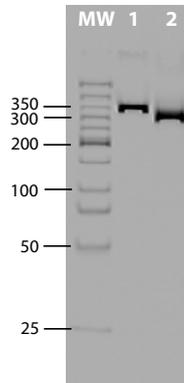


FIGURE 12.10 – Migration sur un gel d'acrylamide 10 %. (MW) : marqueur de poids moléculaire (N3233S, Biolabs). (1) Fragment 1 non digéré. (2) Fragment 1 après digestion par TspRI.

La durée de digestion pourrait éventuellement poser problème : il faut digérer suffisamment longtemps pour que l'enzyme ait le temps de couper tous les fragments d'ADN dont elle dispose, mais il ne faut pas que le temps de digestion soit trop long : ceci peut entraîner une activité de restriction non spécifique indésirable (*star activity*) et peut être un endommagement des extrémités simple brin générées par la digestion. On a fait des ligations des fragments 1 et 2 après 10, 30, 60 et 120 min de digestion (suivie d'une étape de purification) : les produits de ligation obtenus sont les mêmes que ceux présentés dans la figure 12.9, colonne (3).

Travailler à partir de primers HYPUR, purifier après amplification par une extraction phénol-chloroforme, et digérer les fragments pendant des temps de l'ordre de l'heure nous garantissent a priori que les fragments d'ADN obtenus sont bien conformes à la représentation de la figure 12.7 : les extrémités sont intactes, simple brin, et leur séquence est celle précisée sur cette même figure. Pourtant, l'étape de ligation conduit à la formation de multimères, donc à la ligation entre des extrémités non complémentaires. On s'est donc demandé à quel point l'étape de ligation était spécifique.

12.2.4.5 Test de la spécificité de l'étape de ligation

Analyse du nombre de mésappariements pour chacun des fragments d'ADN Pour obtenir des multimères du fragment 1 (resp. 2), il faut que la ligase soit capable de lier des extrémités ayant au minimum 3 (resp. 5) mésappariement(s) comme le montre le tableau ci-dessous, qui indique le nombre de mésappariements qui seraient introduits si les extrémités des fragments d'ADN (précisés dans le tableau) se liguèrent deux à deux. On peut également obtenir un mauvais assemblage des fragments 1 et 2 si la ligase peut admettre un mésappariement entre les deux extrémités à lier. Pour éviter d'avoir des mésappariements, il faut que la ligation soit impossible même dans le cas d'un unique mésappariement sur une extrémité de 9 paires de bases.

12.2. UNE TECHNIQUE DE PRÉPARATION DU SUBSTRAT PLUS LONGUE MAIS QUI A FAIT SES PREUVES

		Fragment (1)		Fragment (2)		Fragment (3)	Fragment (4)
		CTCACTGGC	GTCAGTGTC	GGCAGTGAG	GCCAGTGAG	CTCACTGCC	GACACTGAC
(1)	CTCACTGGC	5	3	1	0	5	3
	GTCAGTGTC	3	3	3	3	3	0
(2)	GGCAGTGAG	1	3	5	5	0	3
	GCCAGTGAG	0	3	5	5	1	3
(3)	CTCACTGCC	5	3	0	1	5	3
(4)	GACACTGAC	3	0	3	3	3	3

Test de la spécificité de la ligation par la T4 DNA Ligase et la Taq Ligase On digère, par TspRI, un fragment d'ADN de 1032 pb contenant trois sites de restriction pour cette enzyme et on purifie les produits obtenus par un kit commercial. La figure 12.11(b) donne la taille des fragments attendus et la séquence des sites de restriction identifiés dans le fragment. La colonne (1) du gel de la figure 12.11 correspond au fragment avant digestion, la colonne (2), au produit de la digestion : celle-ci est donc très efficace. On ligue ensuite ce mélange, soit avec la T4 DNA ligase (à 16°C pendant 10h), soit avec la Taq DNA ligase (à 45°C pendant 10h). On fait migrer les produits de ligation obtenus dans les colonnes (3) pour la T4 DNA ligase, et (4) pour la Taq DNA ligase.

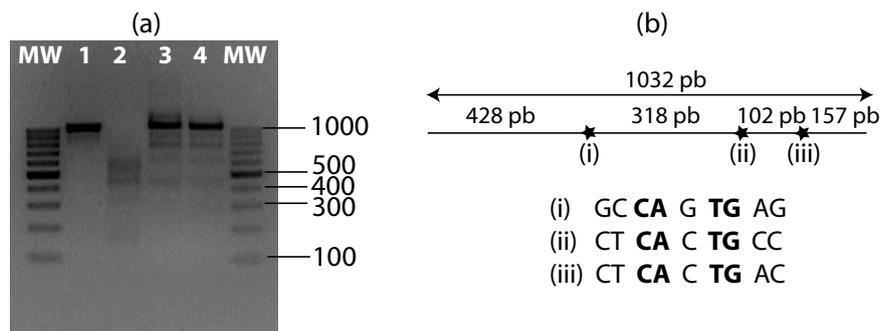


FIGURE 12.11 – (a) Migration sur un gel d'agarose 1 %. (MW) : marqueur de poids moléculaire (GeneRuler 100 pb, Fermentas). (1) Fragment d'ADN avant digestion par TspRI (1032 pb). (2) Produits de la digestion de ce fragment par TspRI (purifiés sur Micropure-EZ et Microcon) : les tailles des produits attendus sont de 102, 157, 318 et 428 pb. (3) Ligation des produits précédents par la T4 DNA ligase à 16°C pendant 10h. (4) Ligation des produits précédents par la Taq ligase à 45°C pendant 10h. (b) Représentation schématique du fragment de 1032 pb utilisé. On donne la séquence des trois sites de restriction de TspR I qu'il contient.

Pour les deux ligations testées (colonnes (3) et (4)), le produit majoritaire est effectivement le produit attendu (à 1032 pb). Dans les deux cas néanmoins, il reste quelques bandes correspondant soit à des produits de ligation incomplets (pour les petits poids moléculaires), soit éventuellement à des ligations avec mésappariements (surtout pour les produits de poids moléculaires supérieurs). Notons que la quantité de ces sous-produits est faible malgré la présence d'une unique base différente entre les sites de restriction notés (ii) et (iii) sur la figure 12.11(b), les ligases sont des enzymes remarquablement spécifiques. Ces produits issus de mésappariements sont plus nombreux dans le cas de la T4 DNA ligase que dans celui de la Taq DNA ligase. Soit la Taq DNA ligase est effectivement plus sensible à la présence de mésappariements, soit, le fait que la ligation se fasse, dans le cas de la Taq DNA ligase, à plus haute température (45°C au lieu de 16°C) favorise des ligations entre extrémités identiques. Nous allons donc essayer de jouer sur la température de l'étape de ligation pour voir si on peut augmenter la spécificité du processus.

12.2. UNE TECHNIQUE DE PRÉPARATION DU SUBSTRAT PLUS LONGUE MAIS QUI A FAIT SES PREUVES

Ajustement de la température de la phase de ligation On amplifie, digère et purifie les fragments 1 et 2 de manière optimale¹. On réalise en parallèle 20 expériences de ligation : on ligue, avec la T4 DNA ligase, le fragment 1 seul, le fragment 2 seul ou les fragments 1 et 2 mélangés. On réalise ces ligations à 30, 35, 40, 45 ou 50°C, pendant 1 ou 5 min. On inactive la ligase à 65°C pendant 20 min, puis on dépose un échantillon de chacune de ces ligations sur un grand gel d'agarose à 1 %, celui-ci est donné en figure 12.12.

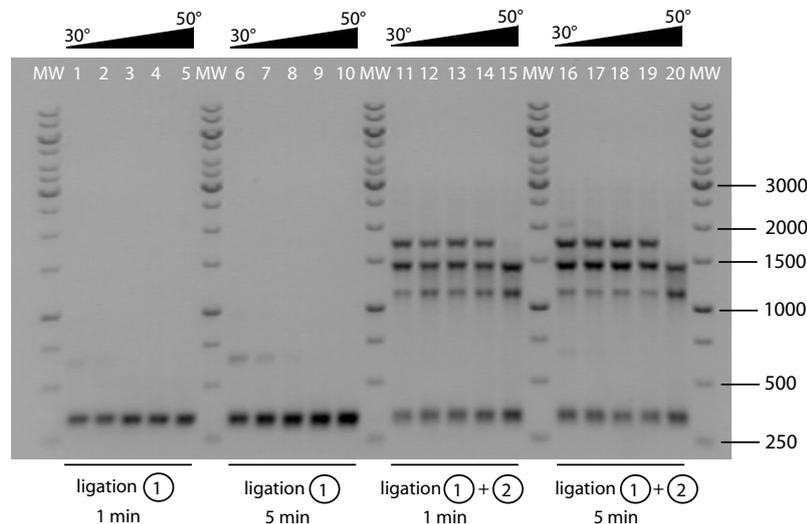


FIGURE 12.12 – (a) Migration sur un gel d'agarose 1 %. (MW) : marqueur de poids moléculaire (GeneRuler 1 kpb, Fermentas). De (1) à (5) : Produits de ligation obtenus, après 1 min, en présence du fragment 1 seul pour des températures allant de 30 à 50°. De (6) à (10) : Produits de ligation obtenus, après 5 min, en présence du fragment 1 seul pour des températures allant de 30 à 50°. De (11) à (15) : Produits de ligation obtenus, après 1 min, en présence d'un mélange des fragments 1 et 2 pour des températures allant de 30 à 50°. De (16) à (20) : Produits de ligation obtenus, après 5 min, en présence d'un mélange de fragments 1 et 2 pour des températures allant de 30 à 50°.

Les colonnes (1) à (10) montrent que la multimérisation du fragment 1 disparaît progressivement lorsque la température augmente. Pour des températures supérieures à 45°C, on n'observe plus aucune trace de multimérisation. Les colonnes (11) à (20) montrent de même que la ligation des fragments 1 et 2 peut être rendue spécifique en faisant travailler la ligase à plus haute température : le résultat obtenu est très sensible : on a encore une bande importante correspondant à la ligation d'un fragment 2 et de deux fragments 1 à 45°C, alors qu'elle disparaît complètement à 50°C. On réalisera dorénavant la ligation des fragments 1 et 2 à 50°C pendant 2 heures.

Le nombre de mésappariements a une importance cruciale pour favoriser la spécificité de l'étape de ligation. On commande de nouveaux primers, aux mêmes emplacements que les précédents sur les plasmides servant de substrat, et maximisant le nombre de mésappariements entre les fragments. On donne leur séquence en annexe (Annexe C.5).

1. Utilisation de primers HYPUR, extractions phénol-chloroforme après la PCR et la digestion, digestion avec TspRI à 65°C pendant 2h.

12.2.5 Méthodologie adoptée pour la ligation du fragment final

12.2.5.1 Production des fragments 2+3 et 4+5

On travaille à partir des nouveaux primers. On va d'abord liguer les fragments 2 et 3 : une étude semblable à celle présentée précédemment pour le couple de fragments 1 et 2 montre que la ligation doit être faite à 45°C pour n'obtenir que le produit spécifique cherché^m. On ligue en parallèle les fragments 4 et 5 : la ligation est spécifique à 25°C. On fait migrer les produits de ligation sur gel, on extrait la bande correspondant au produit de ligation (on se débarrasse ainsi des fragments ne s'étant pas ligués) et on purifie l'ADN correspondant. Un contrôle des produits de ligation obtenus est donné sur la figure 12.13(a), cela nous permet de déterminer la concentration de ces fragments d'ADN.

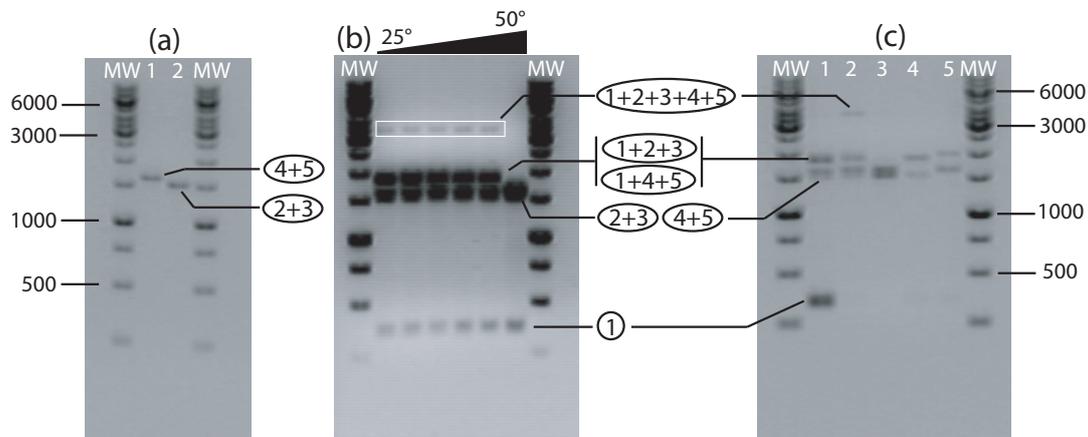


FIGURE 12.13 – Migration d'ADN sur gel d'agarose 1 %. (a) Contrôle des deux fragments d'ADN servant d'extension au fragment central : (MW) Marqueur moléculaire (GeneRuler 1kb, Fermentas). (1) Fragment 4+5 (résultat de la ligation des fragments 4 et 5, taille attendue : 1553 pb). (2) Fragment 2+3 (résultat de la ligation des fragments 2 et 3, taille attendue : 1451 pb). Les bandes correspondantes apparaissent un peu plus haut que ce qui est attendu du fait de l'incorporation de biotines pour 2+3 et de digoxygénines pour 4+5. (b) Détermination de la température à laquelle faire la ligation totale des fragments 1, 2+3 et 4+5 : on dépose les produits de ligation des fragments 1, 2+3 et 4+5, après 2h de ligation menée à 25, 30, 35, 40, 45 ou 50°C. Pour des températures comprises entre 25 et 45°C, on obtient le produit final attendu. (c) Influence de la quantité du Fragment 1 introduit pour la ligation finale de 1, 2+3 et 4+5. (MW) Marqueur moléculaire (GeneRuler 1 kb, Fermentas). (1) Une grande quantité de Fragment 1 empêche la formation du produit total désiré. (2) Une quantité dix fois moins importante du Fragment 1 permet la formation du produit désiré. (3) Cent fois moins de fragment 1 ne permet plus de produire l'ADN désiré. (4) Ligation des fragments 1 et 2+3 seuls. (5) Ligation des fragments 1 et 4+5 seuls.

12.2.5.2 Production de la construction finale

Température de ligation de fragments 2+3, 4+5 et 1 Comme précédemment, on définit la température à laquelle doit être faite la ligation entre les fragments 2+3, 4+5 et le fragment 1 : le gel de la figure 12.13(b) montre que pour des températures comprises entre 25 et 45°C, on peut obtenir le produit final désiré. On réalise dorénavant cette étape de ligation à 25°C pendant 2h30. On remarque cependant

^m. A 40°C, on a encore des ligations non spécifiques, à 50°C, on n'a pas de produit de ligation du tout !

que le rendement de l'opération est mauvais : à partir des concentrations estimées des différents fragments, on a introduit les fragments de telle sorte que pour une molécule des fragments 2+3 et 4+5, on ait deux molécules du fragment 1. Il semble qu'on ait mis trop peu de fragment 1 ici puisque la bande correspondante n'apparaît presque plus. Il faut donc optimiser la quantité de fragment 1 ajoutée pour améliorer le rendement de la construction.

Ajustement de la quantité de fragment 1 utilisée pour la ligation finale La quantité de fragment 1 utilisée pour la ligation finale est très importante à contrôler. Si on en met trop peu, on aura peu de molécules complètes et beaucoup de fragments 2+3 et 4+5 libres, mais on est quasiment sûr que les fragments 1 seront entourés de leurs extensions. Si on met trop de fragment 1, on va saturer les fragments 2+3 d'une part, et 4+5 d'autre part, et on ne pourra pas obtenir la construction complète. Le gel de la figure 12.13(c) montre les produits de ligation obtenus dans le cas où on met beaucoup de fragments 1 (colonne 1), dans le cas où on en met dix fois moins (colonne 2) puis dans le cas où on en met cent fois moins que dans la colonne 1 (colonne 3). On a un optimum proche de la situation de la colonne 2. La colonne 4 (resp. 5) présente les produits de ligation obtenus entre le fragment 1 et le fragment 2+3 (resp. 4+5).

12.2.6 Validation de la méthode de reconstitution : image EM

On reproduit la dernière étape de ligation entre les fragments 1, 2+3 et 4+5 en ayant, au préalable, positionné un nucléosome sur le fragment 1. On contrôle la construction obtenue par microscopie électronique : on étale la préparation obtenue après dilution, au 10ème, dans du TE. Les molécules obtenues sont variées. On retrouve d'abord des fragments d'ADN nus de trois types de taille : les fragments les plus nombreux ont une taille proche de 147 pb et correspondent aux fragments d'ADN relargués par les particules de coeur lors de l'échange de leur octamère d'histones avec le fragment 1. On remarque la présence de quelques rares fragments de 308 pb (il s'agit de fragments 1 qui n'ont pas capté de nucléosomes), et quelques fragments de 1500 ou 1670 pb correspondant à des fragments 2+3 ou 4+5 non ligués à un fragment 1. On retrouve d'autre part des substrats nucléosomaux : ils sont majoritairement de deux types que l'on présente dans la figure 12.14(a) et (b). Les premiers (Figure 12.14(a)) correspondent à des fragments 1 possédant un unique nucléosome et n'étant ligués qu'à l'un des deux fragments 2+3 ou 4+5 ; les seconds (Figure 12.14(b)) correspondent à la construction totale désirée, à savoir la ligation du fragment 1 possédant un nucléosome avec un fragment 2+3 et un fragment 4+5. L'étude des substrats présentés sur la figure 12.14 montre que les deux extensions de part et d'autre du nucléosome (notées L_+ et L_- comme on l'a schématisé dans l'encart de la figure 12.14(c)) sont dissymétriques : la figure 12.14(c) présente la taille, en paires de bases, de la plus courte des extensions (L_-) et de la plus longue (L_+) pour 38 de ces substrats. On obtient les valeurs moyennes suivantes : $L_- = 1511 \pm 7$ pb et $L_+ = 1657 \pm 12$ pb. Ceci est tout à fait cohérent avec les longueurs attendues pour ces extensions, à savoir : $L_- = 1512$ pb et $L_+ = 1666$ pb.

La variété des molécules présentes dans la préparation ne va pas poser problème pour nos expériences en pinces magnétiques. En effet, nous ne sommes capables de piéger que les molécules qui possèdent deux extrémités modifiées (par des biotines d'une part, et des digoxygénines, d'autre part). Ces molécules contiennent donc les fragments 2+3 et 4+5 qui ne peuvent être reliés l'un à l'autre que par l'intermédiaire du fragment 1. Les molécules résultantes ont une taille caractéristique de 3325 pb. Ces molécules sont facilement reconnaissables, en microscopie électronique, de toutes les autres molécules présentes. L'analyse de ces molécules révèle que la très grande majorité de celles-ci possèdent un unique nucléosome positionné au niveau de la séquence 601 (comme le montrent les images de la figure 12.14(b)) : on estime à 70 % la

12.2. UNE TECHNIQUE DE PRÉPARATION DU SUBSTRAT PLUS LONGUE MAIS QUI A FAIT SES PREUVES

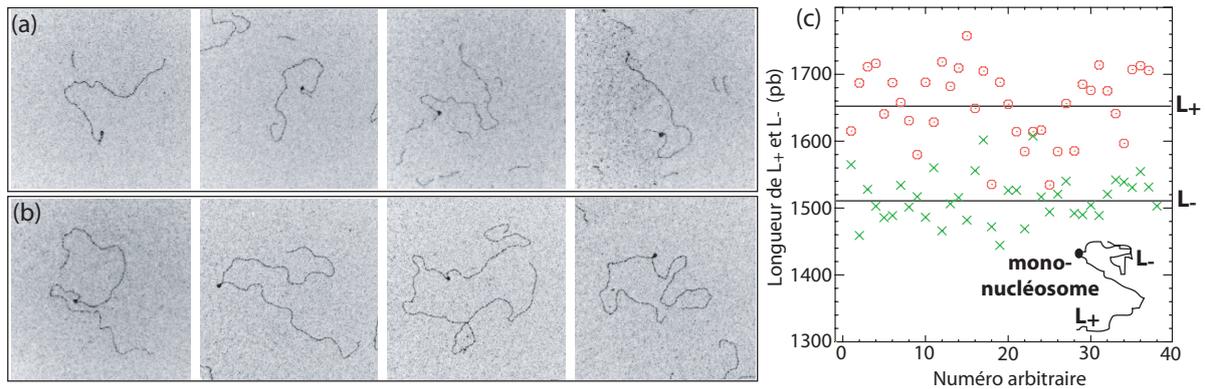


FIGURE 12.14 – Clichés de microscopie électronique, au grossissement $\times 140\,000$. (a) Substrats semi-ligués : le fragment 1, possédant un nucléosome, s'est ligué soit à un fragment 2+3 soit à un 4+5. (b) Substrats totalement ligués : le fragment 1, possédant un nucléosome, s'est ligué avec un fragment 2+3 et un fragment 4+5. (c) Taille des extensions d'ADN dépassant de part et d'autre du nucléosome pour 38 substrats totalement ligués : L_+ correspond à l'extension la plus longue, L_- correspond à la plus courte.

quantité de ces molécules possédant un unique nucléosome. L'étape de ligation entre les fragments 1, 2+3 et 4+5 ne semble donc perturber ni la présence, ni le positionnement du nucléosome.

La méthode présentée ici, permet de préparer de manière très efficace un substrat mononucléosomal pour lequel la position de l'octamère d'histones est très bien contrôlée. 70 % des molécules que l'on pourra potentiellement piéger par un dispositif de pinces magnétiques auront donc un unique nucléosome. On a donc, à disposition, un substrat de choix pour l'étude du comportement d'un nucléosome unique en pinces magnétiques. Néanmoins, alors que l'allure des substrats préparés est homogène (unique nucléosome positionné en un lieu très précis), la composition des octamères d'histones d'un substrat à l'autre est hétérogène : les particules de coeur utilisées pour la reconstitution peuvent inclure des variants d'histones ou des modifications post-traductionnelles.

La construction ainsi préparée est conservée dans 50 % glycérol à -20°C et peut tenir au moins huit mois sans vieillissement apparent (on a imagé en microscopie électronique l'échantillon au bout de huit mois sans noter d'altérations de la préparation).

Chapitre 13

Identification et caractérisation des artéfacts potentiels lors de la recherche de la signature d'un nucléosome en pinces magnétiques

Sommaire

13.1 Le dispositif des pinces magnétiques limite certaines approches envisageables pour la détection d'un unique nucléosome.	199
13.1.1 On ne peut pas espérer détecter sans ambiguïté la présence d'un mononucléosome par un seul allongement irréversible de l'extension de la molécule.	199
13.1.2 On ne peut pas détecter sans ambiguïté la présence d'un unique nucléosome par l'observation de l'hystérésis apparaissant pour des valeurs de rotation positives. . .	200
13.2 Contraintes expérimentales à satisfaire pour observer la respiration de l'ADN nucléosomal à la surface de l'octamère d'histones.	200
13.3 Quelques subtilités dans la réponse en torsion de molécules d'ADN nues . . .	201
13.3.1 Bulles de dénaturation ou formation de structures cruciformes dans le domaine des valeurs de rotation négatives	201
13.3.2 Déstabilisation de l'extension de la molécule d'ADN pour des valeurs de rotation positives	202

Le chapitre 12 montre que l'on dispose d'une préparation de mononucléosomes dans laquelle 70 % des molécules de taille attendue possèdent un nucléosome. On pourrait se contenter de cette information et utiliser directement ces substrats en pinces magnétiques pour étudier l'activité des facteurs de remodelage en leur présence. Si on observe un comportement distinct de celui observé en présence d'ADN nu, on saura qu'il s'agit d'une activité propre à la présence d'un nucléosome. Cependant, la situation n'est pas si simple : on perd en fait des nucléosomes pendant les phases qui permettent de piéger les substrats (incubation dans la chambre, rinçages multiples...), on a donc moins de "bons substrats" que prévu. On gagnera un temps considérable si on développe un test nous permettant d'être sûr que l'on piège bien un substrat nucléosomal, et on sera ainsi certain que l'activité observée correspond à celle développée sur un substrat nucléosomal.

Pour sonder la présence d'un nucléosome sur un fragment d'ADN, on a plusieurs options. On peut soit le solliciter en traction, soit en torsion :

1. En tirant sur un substrat mononucléosomal, on peut espérer voir son extension s'allonger. Cet allongement peut correspondre à un détachement partiel ou total de l'ADN nucléosomal de la surface de l'octamère d'histones et peut être ou non réversible. On peut faire cette expérience sur des molécules sensibles ou non à la torsion. En travaillant avec des molécules insensibles à la torsion, on s'attend à ce que cet allongement soit inférieur ou égal à 50 nm (équivalent à 147 pb). Avec des molécules sensibles à la torsion, en se plaçant dans le régime plectonémique positif, on peut espérer voir un allongement plus important : à l'allongement de la molécule dû à la libération d'une partie de l'ADN nucléosomal de la surface de l'octamère, s'ajoute une contribution due à la réduction du nombre de plectonèmes positifs (liée à la conservation de la contrainte topologique dans la molécule totale) : si on a une pente voisine de 30 nm/tr^a dans le régime plectonémique et que l'octamère d'histones se détache complètement (libération de 50 nm d'ADN et déformation topologique d'environ 1 tour négatif), l'allongement résultant sera d'environ 80 nm.

2. En imposant une contrainte de torsion au substrat mononucléosomal, on peut espérer voir une hystérésis d'un tour environ, liée à la transition chirale du nucléosome.

Alors que ces deux types de tests permettent d'obtenir des résultats convaincants dans le cas de fibres de chromatine possédant plusieurs nucléosomes (voir Partie 4, Chapitre 11), la situation d'un unique nucléosome est plus délicate. On va voir, dans paragraphes qui suivent, que l'on ne peut pas se fier à certains tests : un allongement unique et irréversible de 50 nm ne saurait être attribué sans ambiguïté à la présence d'un mononucléosome, ce test est de plus destructif ; de même une hystérésis d'un tour dans la réponse en torsion d'un mononucléosome ne pourra pas être convaincante. Il faudra donc mettre en place un nouveau test, non destructif, pour sonder la présence d'un mononucléosome (nous aborderons ce dernier point dans le prochain chapitre).

13.1 Le dispositif des pinces magnétiques limite certaines approches envisageables pour la détection d'un unique nucléosome.

13.1.1 On ne peut pas espérer détecter sans ambiguïté la présence d'un mononucléosome par un seul allongement irréversible de l'extension de la molécule.

On travaille avec de courts substrats (ADN ou substrat mononucléosomal de 860 nm) qui relie une bille magnétique à la surface de verre d'une chambre microfluidique. Il n'est pas rare d'avoir des interactions non spécifiques entre la bille, le substrat et/ou la surface. On se sert d'ailleurs des interactions non spécifiques entre les billes et la surface lorsque l'on souhaite trouver une *bille fixe* qui nous permet de suivre, de manière différentielle, la position de la bille *en l'air* d'intérêt, pour s'affranchir d'éventuelles dérives du microscope^b. On souhaite, par contre, éviter à tout prix que la bille *en l'air* que l'on suit, ou que le substrat d'intérêt, interagisse de manière non spécifique avec la surface : on aurait alors des réductions ou accroissements de la longueur du substrat (ou un collage de la bille) non contrôlés. Pour limiter ce risque, on passive les surfaces en ajoutant de la BSA et des surfactants (Pluronic F-127) aux tampons dans lesquels on conserve la chambre microfluidique. Les tampons de travail contiennent également tous de la BSA. Ceci réduit nettement les problèmes de *collage non spécifique*, mais il arrive malgré tout que l'on observe des allongements ou réductions irréversibles de l'extension d'une molécule d'ADN nue, du

a. Cette valeur dépend des conditions ioniques de l'expérience.

b. Voir Partie 2, Chapitre 5.

13.2. CONTRAINTES EXPÉRIMENTALES À SATISFAIRE POUR OBSERVER LA RESPIRATION DE L'ADN NUCLÉOSOMAL À LA SURFACE DE L'OCTAMÈRE D'HISTONES.

fait de ces collages. Dans le cadre d'une expérience de traction sur un substrat mononucléosomal, si on ne voit qu'une variation de longueur irréversible, il sera toujours difficile de l'attribuer sans ambiguïté au nucléosome.

Faisons une dernière remarque : pour forcer le départ du nucléosome, on est amené à tirer fort sur le substrat. Or ce substrat est relié à la bille et à la surface par différents liens (contacts antigène-anticorps) : lorsque l'on tire fort sur une molécule d'ADN nue (au delà de 5-10 pN), il n'est pas rare de rompre certains de ces liens ce qui entraîne des augmentations irréversibles, séquentielles, de son extension bout-à-bout. Encore une fois, il sera difficile, dans le cas d'un mononucléosome, de faire la distinction entre ces ruptures de contacts et l'augmentation de longueur attendue pour le départ d'un nucléosome^c.

13.1.2 On ne peut pas détecter sans ambiguïté la présence d'un unique nucléosome par l'observation de l'hystérésis apparaissant pour des valeurs de rotation positives.

Si on cherche à caractériser la présence du nucléosome par l'observation d'une hystérésis (d'un tour environ) liée à la transition chirale du nucléosome, ceci ne sera pas sans ambiguïté : pour voir la transition chirale, il faut imposer un couple suffisant au substrat. Soit on le fait en tirant fort sur la molécule et en introduisant peu de tours, mais on retombe alors sur les difficultés précisées au-dessus (rupture possible de quelques liens entre le substrat et les surfaces, décalage du centre de rotation), soit on tire moins fort et on applique de nombreux tours positifs à la molécule : le problème est qu'on force alors la bille contre la surface : à cause des interactions non-spécifiques, la bille (ou même le substrat) peut très bien coller de manière transitoire à la surface. Ceci peut suffire à ce que le centre de rotation du substrat soit décalé et que l'observation d'une hystérésis de un tour ne soit pas fiable.

Ainsi, alors que le dispositif des pinces magnétiques offre a priori la résolution nécessaire pour détecter une variation de quelques dizaines de nanomètres (à 1 pN) ou la variation d'un tour de rotation, des complications expérimentales rendent certaines approches difficilement fiables pour la caractérisation d'un unique nucléosome. Pour que cette caractérisation soit fiable, il nous faut une signature réversible : on s'est donc attaché à détecter la respiration réversible de l'ADN nucléosomal à la surface de l'octamère d'histones. Ceci nous impose un certain nombre de contraintes expérimentales que l'on allons préciser ci-dessous.

13.2 Contraintes expérimentales à satisfaire pour observer la respiration de l'ADN nucléosomal à la surface de l'octamère d'histones.

Pour les raisons évoquées précédemment, on souhaite éviter de travailler à très haute force : on va donc rester dans la gamme 0,5-5 pN. Si l'on souhaite observer, pour ces forces, des variations de longueur dues au détachement transitoire de l'ADN nucléosomal de la surface de l'octamère, il faut faciliter ce processus : on travaillera donc dans des tampons relativement salins^d. On souhaitera sonder également sa présence lorsqu'on applique au substrat une contrainte de torsion : pour interpréter correctement les résultats, il nous faut caractériser précisément la réponse du fragment d'ADN seul dans cette gamme de force, pour

c. Une solution serait de ne mettre qu'un seul lien antigène-anticorps de chaque côté de la molécule d'ADN : si le lien se rompt, on perd alors la bille et l'expérience s'arrête. Ainsi si une variation d'extension est détectée avant, elle sera le fait du mononucléosome. Néanmoins, on perd ici l'un des principaux intérêts du dispositif des pinces magnétiques : le substrat ne sera plus sensible à la torsion.

d. On utilisera le même tampon que celui utilisé par le groupe de C. Bustamante pour faciliter la comparaison entre les deux expériences : 10 mM Tris-Acétate pH~7.4, 50 mM KOAc, 10 mM MgOAc, 1 mM DTT, 0,1 mg/mL BSA.

différents tampons (plus ou moins salins). Le paragraphe suivant montre à quel point cette caractérisation est nécessaire car une molécule d'ADN seule peut avoir des comportements subtils, dans certaines conditions, et il sera essentiel de ne pas confondre ceux-ci avec la signature d'un nucléosome.

13.3 Quelques subtilités dans la réponse en torsion de molécules d'ADN nues

La Partie 2, Chapitre 5, présente les réponses extension-rotation typiques obtenues lorsque l'on trace la valeur moyenne de l'extension d'une molécule d'ADN, à force et rotation fixées, pour différentes valeurs de la rotation et à différentes forces. Si l'on regarde attentivement les variations de l'extension d'une molécule d'ADN au cours du temps, à force et rotation fixées, dans certaines conditions particulières, on a des comportements un peu plus compliqués que ce qui apparaît après moyennage. On va en présenter trois dans les paragraphes qui suivent : le premier apparaît pour des forces de l'ordre de 0.5 pN et pour des valeurs négatives de la rotation et correspond à la formation de bulles de dénaturation ou l'apparition de structures cruciformes dans l'ADN, les deux autres apparaissent pour des valeurs positives de rotation et des forces supérieures au pN : il s'agit soit d'un comportement bistable de l'extension de la molécule d'ADN, au moment du flambage de celle-ci, dans certaines conditions salines, soit de la déstabilisation de l'extension de l'ADN du fait de transitions locales de l'ADN de la phase B vers la phase P.

13.3.1 Bulles de dénaturation ou formation de structures cruciformes dans le domaine des valeurs de rotation négatives

On étudie l'extension d'une molécule d'ADN de 1,2 μm de long en fonction de la rotation, pour différentes forces allant de 0,33 à 1,1 pN^e. On représente le jeu de courbes obtenu pour une telle molécule : ces courbes sont obtenues en calculant, à rotation et force fixées, la valeur moyenne de l'extension de la molécule. Pour tous les points hors de la zone ombrée de la figure 13.1(a), la valeur de l'extension de la molécule, à force et rotation fixées, varie très peu autour d'une valeur moyenne stable. Dans la région ombrée, la situation est différente : si on suit l'extension de la molécule d'ADN, à force et rotation fixées, celle-ci fluctue énormément. On peut expliquer ceci par l'apparition de régions où l'ADN est dénaturé, les deux simples brins de la molécule d'ADN sont localement et transitoirement séparés. La situation présentée sur la figure 13.1(b) présente un cas limite : on est à 0,44 pN et on a introduit 10 tours négatifs à la molécule (point rouge de la figure 13.1(a)). On a un état bistable : l'extension de la molécule oscille entre deux niveaux distants de 100 nm environ. On pourrait interpréter ce comportement comme le résultat de l'ouverture et de la fermeture d'une première bulle de dénaturation. Cependant la fréquence de passage entre les deux états observés ici, est plus petite que celle attendue pour la formation spontanée de bulles de dénaturation, il est plus vraisemblable qu'il s'agisse de la formation locale d'une structure cruciforme au sein de la molécule d'ADN^f.

La force à laquelle apparaissent ces premières déstabilisations dépend des conditions salines ainsi que de la séquence d'ADN utilisée : néanmoins, cette valeur reste comprise entre 0,2 et 0,6 pN. Ces signaux ne seront pas problématiques pour l'étude du mononucléosome : en effet, on va être amené à exercer des forces supérieures au pN, dans ce cas, la molécule est complètement dénaturée et l'extension de la molécule

e. Les conditions de tampon sont les suivantes : 10 mM Hepes pH \sim 7.3, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0,1 mM DTT, 0,2 % BSA.

f. Ces informations proviennent d'une discussion avec T. Strick.

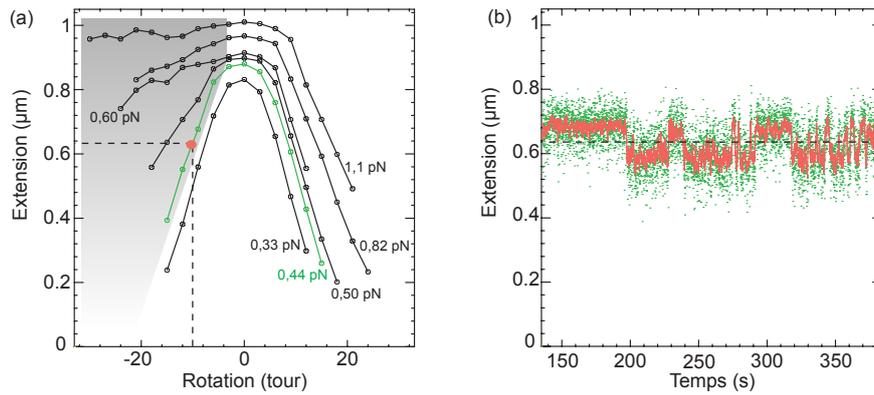


FIGURE 13.1 – (a) Courbes extension-rotation obtenues pour une molécule d'ADN de $1,2 \mu\text{m}$ de long, pour des forces comprises entre $0,33$ et $1,1 \text{ pN}$. (b) Extension, en fonction du temps, de la molécule d'ADN dans l'état signalé par un point rouge dans (a) : on observe des oscillations de grandes amplitudes de l'extension de la molécule d'ADN du fait de la formation locale d'une structure cruciforme.

ne fluctue pas, à rotation et force fixées.

13.3.2 Déstabilisation de l'extension de la molécule d'ADN pour des valeurs de rotation positives

13.3.2.1 Pour des valeurs de rotation positives et à haute force, l'extension de l'ADN se déstabilise du fait de l'apparition de bulles d'ADN de phase P.

On suit l'extension de molécules d'ADN de $1,2 \mu\text{m}$ en fonction de la rotation, pour différentes forces. On travaille d'abord dans du TE^g. On trace, dans un premier temps, les courbes extension-rotation en calculant la moyenne sur 1024 points (environ 17s, caméra à 60 Hz) de l'extension d'une molécule d'ADN, à rotation et force fixées. On obtient le jeu de courbes présenté sur la figure 13.2(gauche).

Ces courbes sont obtenues pour des forces allant de $0,85$ à $3,1 \text{ pN}$. Alors que les courbes obtenues pour des forces inférieures à $2,3 \text{ pN}$ sont extrêmement reproductibles d'un tracé à l'autre, il en va tout autrement pour des forces comprises entre $2,3$ et $3,7 \text{ pN}$. Dans cette gamme de forces, les courbes se déstabilisent pour des valeurs de rotation positives : on atteint en effet des conditions pour lesquelles certaines régions de la molécule transitent de la phase B vers la phase P. Si on se place à rotation positive fixée ($+29$ tours dans l'exemple présenté ici) et que l'on augmente, pas à pas, la force de manière à passer graduellement de l'état (i) vers l'état (v), localisés sur la figure 13.2(gauche), l'extension de la molécule varie de la manière indiquée sur la figure 13.2(droite) : dans l'état (i), à $1,9 \text{ pN}$, l'extension de la molécule est très stable à rotation et force fixées et les courbes en chapeau obtenues sont très reproductibles. Dans l'état (ii), à $2,3 \text{ pN}$, on commence à transformer localement (et réversiblement) de la phase B en phase P : on a un niveau de base assez stable mais qui est perturbé par de nombreuses augmentations transitoires de l'extension de la molécule (de l'ordre de 60 nm) dues au passage de petites quantités d'ADN vers la phase P. On a un signal qui peut se révéler trompeur pour l'étude d'un substrat mononucléosomal dans la mesure où on a des variations d'extension de tailles semblables à celles attendues pour un nucléosome. Dans l'état (iii), à $2,5 \text{ pN}$, on a de larges fluctuations de l'extension de la molécule d'ADN du fait de la transition de larges régions d'ADN

g. On travaille dans 10 mM Tris-Cl $\text{pH} \sim 7,9$, 1 mM EDTA et $0,2 \%$ BSA.

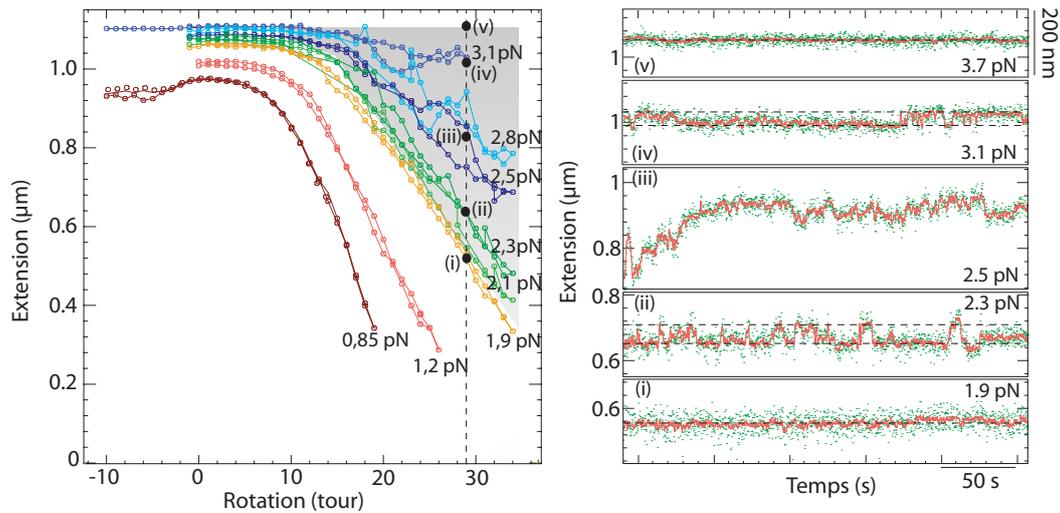


FIGURE 13.2 – (gauche) Courbes extension-rotation obtenues pour une molécule d'ADN de $1,2 \mu\text{m}$ de long, pour des forces comprises entre $0,85$ et $3,1$ pN. (droite) Extension, en fonction du temps, de la molécule d'ADN dans les états (i), (ii), (iii), (iv) et (v), signalés par un point noir dans la figure de gauche : les données brutes sont en vert, la trace rouge correspond à un moyennage, sur $0,5$ s, des données brutes. (i) l'extension est stable à $1,9$ pN, (ii) premières déstabilisations de l'extension dues à des transitions locales de l'ADN vers la phase P, (iii) l'extension de la molécule subit des fluctuations conséquentes du fait d'un équilibre dynamique entre les phases B et P de l'ADN, (iv) une dernière région de l'ADN oscille encore entre la phase B et la phase P, (v) l'extension de la molécule est à nouveau stable : toute la région de l'ADN nécessaire, pour que soit absorbée une contrainte en torsion équivalente à $+29$ tours, se retrouve en phase P.

vers la phase P. Les courbes en chapeaux ne sont plus reproductibles d'une fois sur l'autre dans la région de rotation positive, et dépendent de la durée de moyennage fait pour chaque pas de rotation. L'état (iv), à $3,1$ pN, correspond à un état où presque toute la quantité d'ADN nécessaire, pour que soit absorbé l'équivalent de $+29$ tours, a été convertie en phase P : seule une dernière région transite encore de manière réversible : à nouveau, on a un signal qu'il faudra distinguer de ceux dus au nucléosome. Finalement, lorsqu'on atteint des forces supérieures à $3,7$ pN, l'extension de la molécule est à nouveau constante, à rotation et force fixées.

Cet exemple montre plusieurs choses : si on travaille dans un tampon TE et que l'on veut sonder la réponse d'un nucléosome pour des valeurs de rotation positives, il faudra éviter les régions pour lesquelles on peut transiter vers la phase P car on ne serait pas capable de différencier des signaux dus au nucléosome de ceux dus à des bulles de transition vers la phase P. On a répété cette étude sur un certain nombre de molécules d'ADN, ayant des tailles et des séquences en acides nucléiques différentes^h : elle révèle que l'on n'observe aucune bulle de transition vers la phase P pour des forces inférieures à $1,5$ pN, et que l'extension de l'ADN est à nouveau stable, à force et rotation fixées, pour des forces supérieures à 4 pN. Si on persiste à travailler dans ce tampon, il faudra éviter les gammes de forces et de rotations apparaissant dans la région grisée de la figure 13.2(gauche). Ceci est très ennuyeux : la gamme de force concernée $1,5-4$ pN semble être la gamme de forces de choix pour mettre en évidence la respiration réversible du nucléosome (Mihardja et al. (2006)).

h. Molécules d'ADN de 860 et de 1200 nm, préparées à partir de deux plasmides différents : pSA850 et pGEM3Z-mod

Il a été montré que les forces, pour lesquelles la transition vers la phase P se déclare, dépendent des conditions salines : la force nécessaire pour permettre la transition vers la phase P augmente avec le sel (Allemand et al. (1998)). On a cherché des conditions salines qui permettent donc de décaler, vers des valeurs plus grandes, la gamme de forces qui nous est interdite. Ceci va dans le bon sens pour l'étude de la respiration du nucléosome : si on augmente la salinité des tampons, on va d'une part fragiliser les contacts entre l'octamère d'histones et l'ADN nucléosomal et donc permettre l'observation de sa respiration à plus basse force, et on va d'autre part, déplacer la gamme de forces interdite vers des valeurs plus grandes : il y a des chances pour que l'on trouve, pour des conditions salines ad hoc, des forces intermédiaires, de l'ordre de 2-3 pN, suffisantes pour sonder le nucléosome et ne permettant pas de transition vers la phase P.

13.3.2.2 Effet de la force ionique sur la transition de l'ADN vers la phase P

La transition vers la phase P est déplacée à plus haute force, lorsqu'on augmente les concentrations salines. On construit à nouveau les courbes extension-rotation, pour une même molécule d'ADN de $1,2 \mu\text{m}$, dans trois conditions de tampon différentes : il s'agit du tampon TE précédentⁱ auquel on ajoute 1, 3 ou 10 mM d'acétate de magnésium (MgOAc). A chaque pas, à rotation et force données, on acquiert l'extension de la molécule d'ADN sur 4096 points (un peu plus d'une minute, caméra à 60 Hz), on construit l'histogramme correspondant à la distribution des valeurs de cette extension et on note la valeur maximale (ou les valeurs maximales, lorsque plusieurs pics sont clairement définis). Cela nous permet de construire les trois jeux de courbes présentés sur la figure 13.3. Afin de pouvoir plus aisément les comparer, les courbes obtenues pour des forces voisines apparaissent avec des coloris similaires (marron pour les basses forces jusqu'à bleu pour les hautes forces).

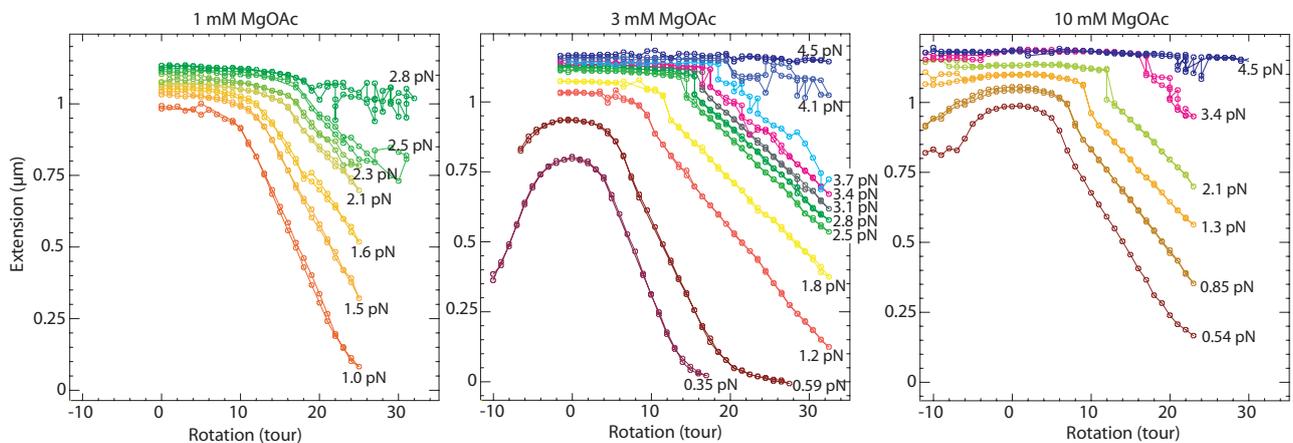


FIGURE 13.3 – Courbes extension-rotation obtenues pour une molécule d'ADN de $1,2 \mu\text{m}$ de long, pour des forces comprises entre 0.35 et 4.5 pN, pour différentes conditions de tampon : (gauche) TE + 1mM MgOAc, (centre) TE + 3mM MgOAc, (droite) TE + 10mM MgOAc.

Pour les forces proches du seuil à partir duquel on observe les premières transitions vers la phase P, on a, comme précédemment, des signaux qui pourraient être très trompeurs lors de la recherche de la signature d'un unique nucléosome. A titre d'exemple, la figure 13.4(b) montre les variations d'extension au cours du temps, de la molécule d'ADN, à 3 mM MgOAc, pour une force de 3.4 pN et à +23 tours (l'état

i. 10 mM Tris-Cl pH~7.9, 1 mM EDTA, 0.2 %BSA.

correspondant est cerclé en noir sur la figure 13.4(a)). L'extension de la molécule oscille entre deux valeurs distantes de 45 ± 1 nm comme le montre l'histogramme, dans l'encart de la figure 13.4(b).

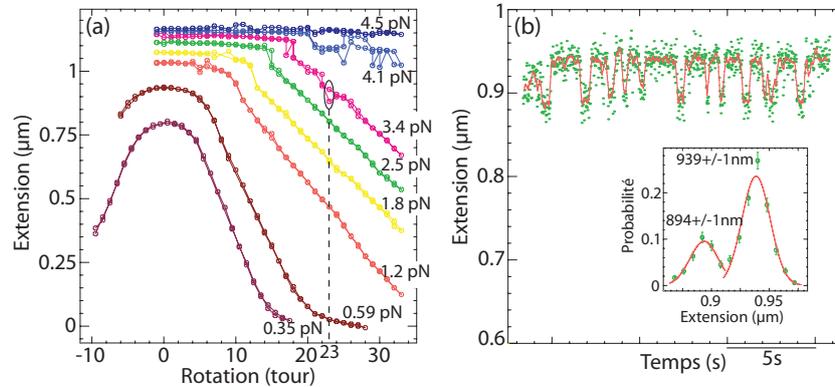


FIGURE 13.4 – (a) Courbes extension-rotation obtenues pour une molécule d'ADN de $1,2 \mu\text{m}$ de long, pour des forces comprises entre 0.35 et 4.5 pN, dans le tampon TE+3mM MgOAc. (b) Extension de la molécule d'ADN en fonction du temps, à 3.4 pN et +23 tours, correspondant à l'état cerclé de noir dans la figure (a). Les données brutes sont en vert, les données brutes moyennées sur 0.5 s sont en rouge. L'encart présente la distribution de taille de la molécule d'ADN dans ces conditions : elle présente deux longueurs caractéristiques distantes de 45 ± 1 nm.

Conformément à nos attentes, en augmentant la concentration en sel des tampons, on augmente la force à laquelle est observée la première déstabilisation (par transition vers la phase P) : elle apparaît respectivement à 1.5, 2.3, 3.1 et 3.4 pN pour une concentration en MgOAc de 0, 1, 3 et 10 mM. En travaillant avec un tampon salin, on pourra donc explorer une gamme de forces plus importante pour sonder la réponse du nucléosome, sans être ennuyé par ces signaux trompeurs.

Une nouvelle instabilité apparaît lors du flambage de la molécule d'ADN, en présence de sels. L'allure des courbes en chapeau (Figure 13.3), au moment du flambage des molécules d'ADN, dépend fortement des conditions salines. Alors que ce flambage se fait de manière douce à 0 ou 1 mM en MgOAc, on a une brusque réduction de longueur de la molécule d'ADN, à 3 et 10 mM en MgOAc, pour des forces supérieures à 1,2 pN. La figure 13.5 reprend, à gauche, les courbes extension-rotation pour lesquelles l'extension a été moyennée pour chaque palier, à rotation et force fixées et, à droite, les traces représentant l'extension de la molécule en fonction du temps, pour différentes forces, lorsqu'on fait varier la rotation.

Le flambage de la molécule est très dynamique : la figure 13.5(droite) montre que, pour des valeurs de force comprises entre 2.5 et 3.4 pN, on observe, à rotation et force fixées, un passage rapide d'un état où la molécule est fortement vrillée mais ne possède pas de plectonèmes, à un état pour lequel la première boucle de plectonème est formée. Notre système ne nous permet pas d'avoir la résolution temporelle pour suivre la dynamique de passage très rapide entre ces deux niveaux, pour des forces inférieures à 2.5 pN : les courbes apparaissent donc plus lisses alors que la transition brutale persiste pourtant. Pour des forces supérieures à 4.7 pN, on n'arrive plus à distinguer le flambage des autres déstabilisations dues notamment à la formation de phase P dans l'ADN. On peut néanmoins mesurer, dans la gamme de forces qui nous ait accessible (2.5 - 4.7 pN), la variation de l'extension de la molécule lors du flambage : cette variation de longueur donne directement accès à la taille de la première boucle de plectonèmes. Un modèle simple, présenté dans

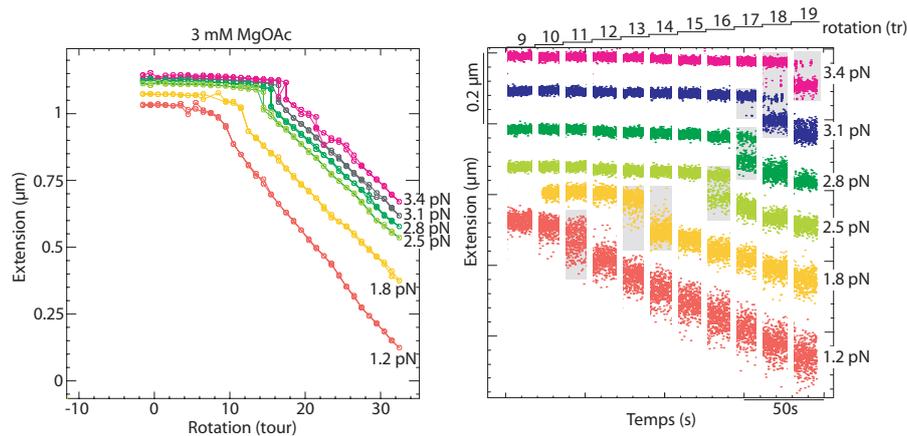


FIGURE 13.5 – (gauche) Courbes extension-rotation obtenues pour une molécule d'ADN de $1,2 \mu\text{m}$ de long, pour des forces comprises entre 1.2 et 3.4 pN, dans TE+3mM MgOAc. La valeur de l'extension est moyennée à rotation et force fixées. (droite) Extension correspondante représentée en fonction du temps, pour différentes forces, lorsqu'on fait varier la rotation. On a grisé les régions pour lesquelles a lieu le flambage de la molécule.

la Partie 2, Chapitre 5, prévoit que cette taille de boucle varie comme $F^{-0,5}$. La figure 13.6 présente les résultats obtenus pour 17 molécules d'ADN de $1,2 \mu\text{m}$ de longueur, dans le tampon TE+3 mM MgOAc : on a représenté la taille de la première boucle de plectonème formée en fonction de la force appliquée sur la molécule : les points verts sont nos points expérimentaux (99 mesures faites sur 17 molécules différentes), la courbe continue verte correspond à l'ajustement de nos résultats par une loi de puissance en $F^{-0,5}$. A titre de comparaison, nous avons fait figurer les résultats de M. Wang extraits de sa publication (Forth et al. (2008)) : elle mesure également la variation de longueur d'une molécule d'ADN lors du flambage mais pour des conditions salines différentes des nôtres (tampon phosphate + 150 mM NaCl). Les variations de longueur que ce groupe trouve sont tout à fait comparables à nos mesures (de 60 à 110 nm selon la force), ce groupe a de plus accès à une plus large gamme de force du fait de la plus haute résolution temporelle qu'offre leur expérience (grâce à l'utilisation notamment d'une bille anisotrope de plus petite dimension que celle que nous utilisons).

Là encore, il sera bon de garder en tête les conditions dans lesquelles apparaissent ces brusques variations de longueur lors du flambage de la molécule afin de ne pas confondre ces signaux avec une quelconque signature du nucléosome.

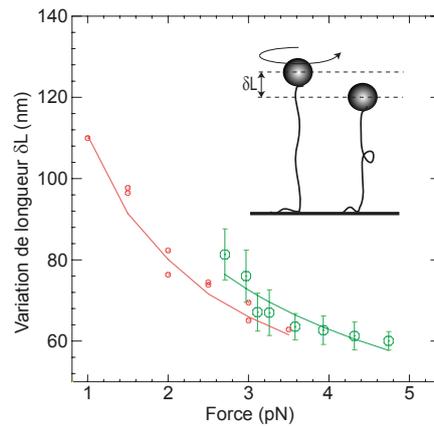


FIGURE 13.6 – Variation de l’extension de la molécule au moment du flambage en fonction de la force. Les points verts représentés ici sont obtenus à partir de 17 molécules d’ADN de $1,2 \mu\text{m}$ de long dans le tampon TE+3mM MgOAc, les barres d’erreur représentent la variance de nos mesures. Ces données sont convenablement ajustées par une loi de puissance en $F^{-0,5}$ (courbe verte). Les cercles rouges correspondent aux données obtenues par M. Wang (Forth et al. (2008)), et la courbe rouge, à l’ajustement fait par une loi de puissance en $F^{-0,5}$.

13.3.2.3 Définition des zones de travail accessibles pour l’étude du nucléosome

Fort de l’enseignement tiré des paragraphes précédents, nous avons choisi de sonder la présence d’un unique nucléosome dans un tampon relativement salin : nous avons choisi de travailler avec le tampon suivant : 10 mM Tris-Acétate pH \sim 7.4, 50 mM KOAc, 10 mM MgOAc, 1 mM DTT, 0,1 mg/mL BSA. C’est celui utilisé par le groupe de C. Bustamante, il nous sera donc plus aisé de comparer par la suite nos résultats avec les leurs. Nous avons redéfini les valeurs de rotation et de force que nous pourrions explorer, dans ces conditions de tampon, avec les molécules d’ADN de 860 nm (sur lesquelles nous positionnerons ultérieurement le nucléosome comme indiqué dans la Partie 4, Chapitre 12). Les résultats sont présentés dans la figure 13.7 : à gauche, on présente un jeu de courbes en chapeau obtenu dans ces conditions : on remarque l’apparition d’une transition abrupte lors du flambage de la molécule pour des forces supérieures à 2.1 pN, puis les premières déstabilisations dues à l’apparition de phase P pour des valeurs de rotation positives et des forces supérieures à 3.5 pN. L’extension de la molécule est à nouveau constante, à force et rotation fixée, pour des forces supérieures à 5 pN. A droite, on représente sur un diagramme force-densité de surenroulement, les zones dans lesquelles nous ne pourrions travailler pour étudier le comportement d’un nucléosome (zones hachurées) : dans la partie $\sigma < 0$, elles correspondent à l’apparition de structures cruciformes et de bulles de dénaturation ; dans la partie positive, elles correspondent à la région où le flambage fait apparaître des instabilités entre deux niveaux, puis à celle correspondant aux transitions locales vers la phase P. On a également éliminé la région correspondant à des valeurs de σ pour lesquelles la bille se retrouve au sol dû fait de l’introduction de nombreux tours positifs. Les régions vierges de cette courbe pourront être explorées pour chercher la signature d’un nucléosome.

13.3. QUELQUES SUBTILITÉS DANS LA RÉPONSE EN TORSION DE MOLÉCULES D'ADN NUES

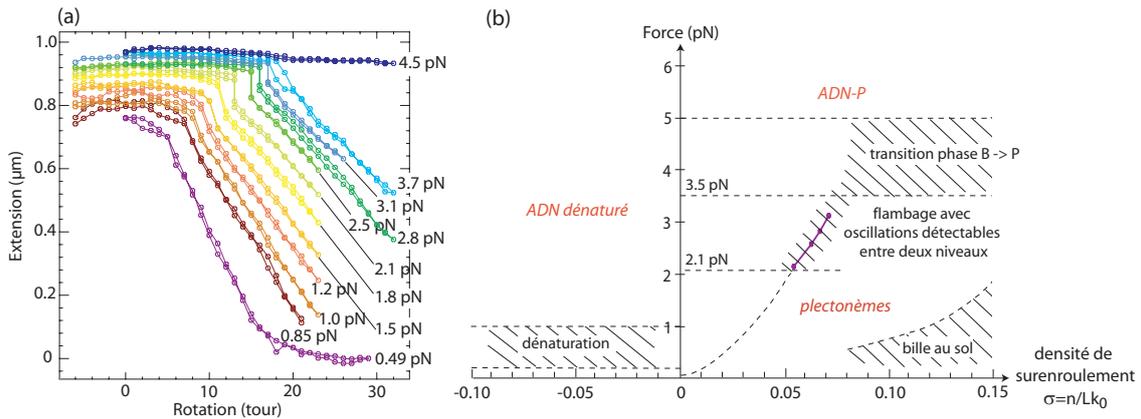


FIGURE 13.7 – (a) Jeu de courbes extension-rotation obtenu pour des molécules d'ADN de 860 nm dans le tampon 10 mM Tris-Acétate pH~7.4, 50 mM KOAc, 10 mM MgOAc, 1 mM DTT, 0,1 mg/mL BSA. (b) Diagramme force-densité de surenroulement dans lequel ont été hachurées les régions pour lesquelles on observe naturellement des instabilités de l'extension de la molécule d'ADN (structure cruciforme, bulle de dénaturation, transition phase B→P, flambage) ainsi que la zone pour laquelle la bille se retrouve au sol du fait de l'introduction de nombreux tours positifs.

Remarquons que pour $\sigma=0$ ainsi que pour des molécules d'ADN insensibles à la torsion (étude non présentée ici), l'extension de la molécule d'ADN ne subit aucune instabilité particulière dans ces conditions de tampon et pour les forces envisagées ici. On n'aura donc aucune difficulté à travailler avec ce type de substrat.

Chapitre 14

Comportement mécanique d'un mono-nucléosome

Sommaire

14.1	Identification des substrats mononucléosomaux	210
14.1.1	Deux populations de substrats coexistent	210
14.1.2	Des nucléosomes sont perdus lors des phases d'incubation et de rinçage dans la microchambre	211
14.2	Caractéristiques des allongements réversibles observés	212
14.2.1	Les allongements réversibles $\delta\ell_F$ de l'extension des substrats mononucléosomaux sont de tailles variées et se manifestent sur une large gamme de forces	212
14.2.2	Les signaux d'allongement de l'extension ℓ_F peuvent prendre des formes variées	214
14.3	Confrontation avec les expériences déjà publiées	216
14.4	Conclusions et perspectives	217

Lorsqu'on utilise des pinces magnétiques, on expérimente "en aveugle" : on n'a aucun moyen de visualiser directement le lien (ADN simple brin, double brin, doublets d'ADN, fibre de chromatine...) qui relie la bille magnétique, que l'on suit à l'écran, à la surface du capillaire. Dans la mesure où l'on souhaite travailler avec une molécule d'ADN nue, on dispose de tests très simples pour vérifier que le lien que l'on manipule est effectivement une molécule unique d'ADN : il suffit de tester son comportement élastique ou en torsion, ceux-ci étant très bien caractérisés (Partie 2, Chapitre 5).

Nous souhaitons travailler maintenant avec un substrat mononucléosomal, pour le faire interagir ensuite avec les facteurs de remodelage de la chromatine. La méthode de préparation des substrats mononucléosomaux, présentée au Chapitre 12^a, nous permet de disposer d'une préparation dans laquelle 70 % des molécules d'ADN, qui peuvent être piégées par les pinces magnétiques, portent un nucléosome en leur centre. Il nous faut donc trouver un test efficace et non destructif pour distinguer les substrats portant un nucléosome des simples molécules d'ADN nues.

Nous avons donc étudié, de manière systématique, le comportement en traction (et plus rarement en torsion) de 103 substrats, piégés par les pinces magnétiques. Toutes les molécules étudiées ici sont issues d'une seule et même préparation de mononucléosomes, celle-ci a été testée en microscopie électronique pour

a. On dispose donc de molécules d'ADN de 860 nm (~ 2500 pb), flanquées de deux extensions leur permettant de se lier d'une part à une bille magnétique et d'autre part à la surface de verre de la microchambre, et portant un unique nucléosome positionné au centre des molécules (grâce à une séquence 601).

s'assurer de sa qualité, et conservée par la suite à -20°C dans 50% glycérol pour éviter toute altération. Ce chapitre présente les principaux résultats obtenus et propose un test simple pour sonder la présence d'un nucléosome.

Note : lorsqu'on parlera de l'extension bout-à-bout d'un substrat ADN ou mononucléosomal, on la notera ℓ_F lorsqu'on ne la corrige pas par le facteur de force λ_{WLC} issu du modèle du ver, et ℓ , après correction ($\ell = \ell_F/\lambda_{WLC}$). Dans le cas d'un substrat mononucléosomal, la quantité d'ADN complexée autour du nucléosome représente un très faible pourcentage de la longueur d'ADN totale ($<6\%$), on corrigera la longueur de ces substrats en fonction de la force, de la même manière que nous le faisons pour une molécule d'ADN nue.

14.1 Identification des substrats mononucléosomaux

On suit l'extension bout-à-bout ℓ_F de 103 substrats différents, issus de la préparation de mononucléosomes^b, dans le tampon suivant : 10 mM Tris-Acétate pH \sim 7,4, 50 mM KOAc, 10 mM MgOAc, 1 mM DTT et 0.2 % BSA^c. On commence par tester si le substrat est sensible ou non à la torsion : parmi les 103 molécules testées, 72 étaient insensibles à la torsion, tandis que 31 l'étaient. Si la molécule y est insensible, on se contentera de suivre ℓ_F en fonction du temps, à différentes forces. Si elle est sensible à la torsion, il faudra veiller à toujours étudier le comportement de ℓ_F dans des gammes de forces et de rotation pour lesquelles il ne peut y avoir ambiguïté^d.

On s'est placé dans les mêmes conditions ioniques que pour l'expérience menée par l'équipe de C. Bustamante^e, on s'attend donc à des résultats similaires : ils avaient détecté un allongement réversible de 25 nm environ de l'extension de la molécule d'ADN à basse force (2-3 pN) qu'il attribuaient au détachement d'un tour d'ADN nucléosomal de la surface de l'octamère d'histones, puis un second allongement de 25 nm, à haute force (8-9 pN) qui conduisait souvent au départ irréversible du nucléosome. Nous ne souhaitons pas désassembler le nucléosome, nous allons rechercher surtout à sonder le premier détachement réversible de l'ADN nucléosomal. De toute façon, nous travaillons ici avec des billes magnétiques de 1 μm de diamètre, notre dispositif actuel ne nous permet pas d'atteindre des forces supérieures à 8 pN.

14.1.1 Deux populations de substrats coexistent

On suit l'extension bout-à-bout ℓ_F de molécules issues de la préparation de mononucléosomes, en appliquant une force de traction croissante, et sans appliquer de contrainte de torsion dans le cas de molécules sensibles à la torsion (on se place à $\sigma=0$). Parmi les 103 molécules testées, on distingue deux grands types de comportement : on en donne trois exemples dans la figure 14.1(a). On suit dans cette expérience trois molécules en parallèle, le substrat 1 se comporte comme une molécule d'ADN nue : son extension augmente de manière monotone lorsque la force augmente, et elle est constante sur chaque palier de force. Si l'on trace l'extension ℓ_F de la molécule en fonction de la force (ronds verts, Figure 14.1(b)), ces données s'ajustent très bien par le modèle du ver (Figure 14.1(b), courbe rouge) avec $L \sim 0.8 \mu\text{m}$ et $\xi \sim 30 \text{ nm}$ ^f.

b. dont le protocole a été détaillé Chapitre 12.

c. Il s'agit du tampon que l'équipe de C. Bustamante utilise pour suivre le comportement d'un mononucléosome dans un piège optique (Mihardja et al. (2006)).

d. voir Chapitre 13.

e. 10 mM TrisOAc, 50 mM KOAc, 10 mM MgOAc, 1 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA.

f. Cette valeur est plus faible que celle habituellement citée, $\xi=50 \text{ nm}$, à cause des conditions de forte salinité avec lesquelles nous travaillons.

Les deux autres substrats ont par contre un comportement différent : lorsqu'on atteint 0.27 pN (resp. 0.56 pN) pour le substrat 2 (resp. substrat 3), on observe des allongements transitoires de l'extension de la molécule d'ADN, à force fixée. Les substrats restent dans l'état allongé à partir de 0.47 pN (resp. 0.80 pN) pour le substrat 2 (resp. substrat 3). On a tracé la courbe force-extension correspondant au substrat 3 (Figure 14.1(b), carrés bleus), on retrouve des transitions, à force constante, entre deux valeurs de ℓ_F , pour des forces comprises entre 0.56 et 0.67 pN. Ce comportement n'a jamais été observé pour des molécules d'ADN nues étirées dans les mêmes conditions, on attribue donc ce comportement à la présence d'un nucléosome sur les substrats 2 et 3, le substrat 1 semble, quant à lui, n'être qu'une simple molécule d'ADN. Cet allongement transitoire de l'extension bout-à-bout de la molécule peut s'expliquer par le détachement réversible d'une partie de l'ADN nucléosomal enroulé autour de la surface de l'octamère d'histones.

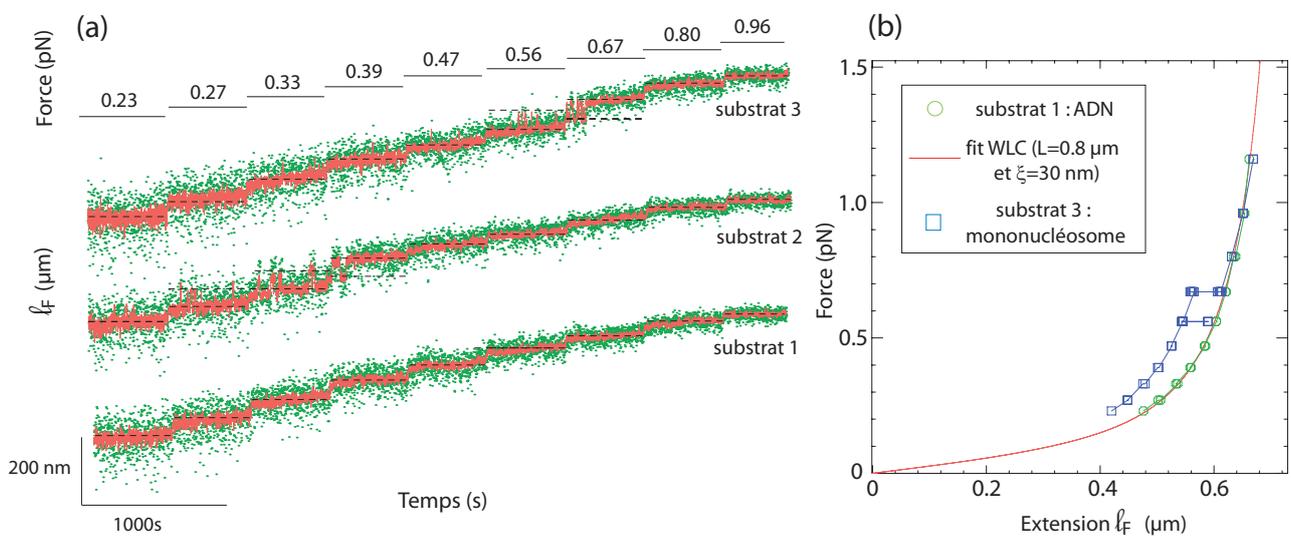


FIGURE 14.1 – (a) Suivi, en parallèle, de l'extension de 3 substrats issus de la préparation de mononucléosomes, pour des valeurs de forces croissantes. Les données vertes correspondent aux données brutes, celles-ci sont moyennées sur 0.25s (données rouges). Le substrat 1 se comporte comme une molécule d'ADN classique. Les substrats 2 et 3 présentent, dans une certaine gamme de force, un comportement bistable : on observe des allongements transitoires de l'extension bout-à-bout de la molécule. (b) Courbes force-extension des substrats 1 (ronds verts) et 3 (carrés bleus). La courbe obtenue pour le substrat 1 a été ajustée en utilisant le modèle du ver, on trouve une longueur cristallographique de la molécule $L=0.8 \mu\text{m}$ et une longueur de persistance $\xi=30 \text{ nm}$.

14.1.2 Des nucléosomes sont perdus lors des phases d'incubation et de rinçage dans la microchambre

On a répété cette étude sur 103 substrats et on a dénombré ceux qui présentaient un tel comportement, à savoir des allongements réversibles de leur extension bout-à-bout ℓ_F , à force constante : 20 substrats (resp. 9) parmi les 72 insensibles à la torsion (resp. 31 sensibles à la torsion) présentaient ce comportement singulier. 28 % de la population de substrats sondée présente donc un comportement que l'on ne retrouve pas pour des molécules d'ADN nues et que l'on attribue donc à la présence du nucléosome. On aurait pu s'attendre à un pourcentage un peu plus élevé dans la mesure où on avait estimé, par analyse des clichés de

microscopie, à 70 % le pourcentage de molécules d'ADN, de taille attendue, portant un nucléosome dans la préparation initiale. On semble donc perdre plus de la moitié des nucléosomes entre l'instant où on les prélève du stock initial et celui où on les manipule grâce aux pinces magnétiques. Ceci peut s'expliquer de plusieurs manières : il est probable que des nucléosomes s'adsorbent sur les parois de la microchambre, les rinçages successifs que l'on fait dans la microchambre pour se débarrasser des billes magnétiques libres peuvent sans doute déstabiliser aussi les nucléosomes. Enfin, lorsque l'on travaille dans la microchambre, on se trouve dans un milieu très dilué en nucléosomes, il est probable que cette situation favorise la perte du nucléosome (Gottesfeld and Luger (2001)). P. Recouvreux, un étudiant en thèse qui manipule des fibres de chromatine en pinces magnétiques, dans l'équipe de J.-L. Viovy à l'Institut Curie, constate la même chose : il a très souvent des fibres moins fournies en nucléosomes que ce que suggèrent les clichés de microscopie de ces mêmes substrats.

Pour lutter contre ceci, on a parfois ajouté des fibres de chromatine libres, dans les solutions qui servent pour le rinçage de la microchambre, afin qu'elles servent de tampon et limitent le départ des nucléosomes.

14.2 Caractéristiques des allongements réversibles observés

14.2.1 Les allongements réversibles $\delta\ell_F$ de l'extension des substrats mononucléosomaux sont de tailles variées et se manifestent sur une large gamme de forces

Les deux exemples d'allongements réversibles de ℓ_F , présentés dans le paragraphe précédent, montrent deux substrats mononucléosomaux dont l'extension oscille, avec une dynamique voisine, entre deux valeurs de ℓ_F distantes de $\delta\ell_F \sim 50$ nm. Des signaux très similaires ont été obtenus pour d'autres substrats, mais avec des distances $\delta\ell_F$ et une dynamique de passage entre les deux niveaux, très différentes.

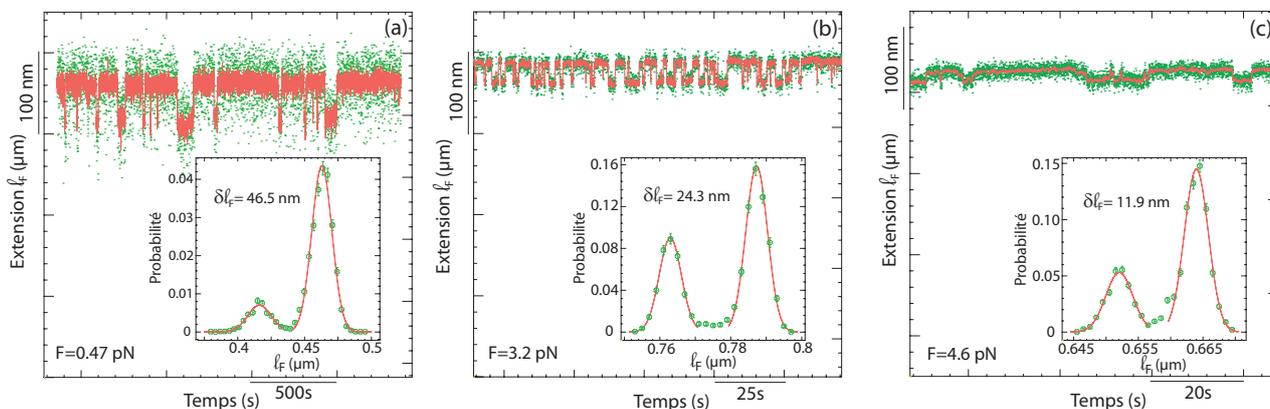


FIGURE 14.2 – Suivi de l'extension ℓ_F de trois substrats mononucléosomaux différents, à force fixée : on observe des transitions entre deux niveaux espacés de $\delta\ell_F \sim 46.5$ nm à 0.47 pN (cas (a)), de $\delta\ell_F \sim 24.3$ nm à 3.2 pN (cas (b)) et de $\delta\ell_F \sim 11.9$ nm à 4.6 pN (cas (c)).

La figure 14.2 présente trois exemples de transitions semblables, observées sur trois substrats mononucléosomaux différents : tous présentent, à force fixée, des oscillations entre deux niveaux, mais l'écart entre ceux-ci diffère : on observe des transitions entre deux niveaux distants de $\delta\ell_F \sim 46$ nm à 0.47 pN (cas (a)), de $\delta\ell_F \sim 24$ nm à 3.2 pN (cas (b)) et de $\delta\ell_F \sim 12$ nm à 4.6 pN (cas (c)). La dynamique de transition

d'un état à l'autre est également très variée : la durée caractéristique des évènements d'allongement est de l'ordre de 100s dans le cas (a), de 3s dans le cas (b) et de 20s dans le (c).

Le cas (b) est tout à fait similaire à ce qu'observe l'équipe de C. Bustamante (Mihardja et al. (2006)), à savoir des transitions de l'ordre de 25 nm pour des forces voisines de 3 pN. Cependant, il semble que nous trouvions des comportements plus variés que ceux qu'ils reportent dans leur article, nous y reviendrons par la suite.

Nous avons mesuré systématiquement, la taille $\delta\ell_F$ séparant les niveaux entre lesquels l'extension ℓ_F oscille. Nous avons reporté ces valeurs en fonction de la force de traction, après les avoir corrigé par le facteur de force pour pouvoir les comparer entre elles. Les résultats sont présentés sur la figure 14.3(a) : on a réalisé 774 mesures sur des molécules insensibles à la torsion, et 429, sur des molécules sensibles à la torsion, à $\sigma=0$.

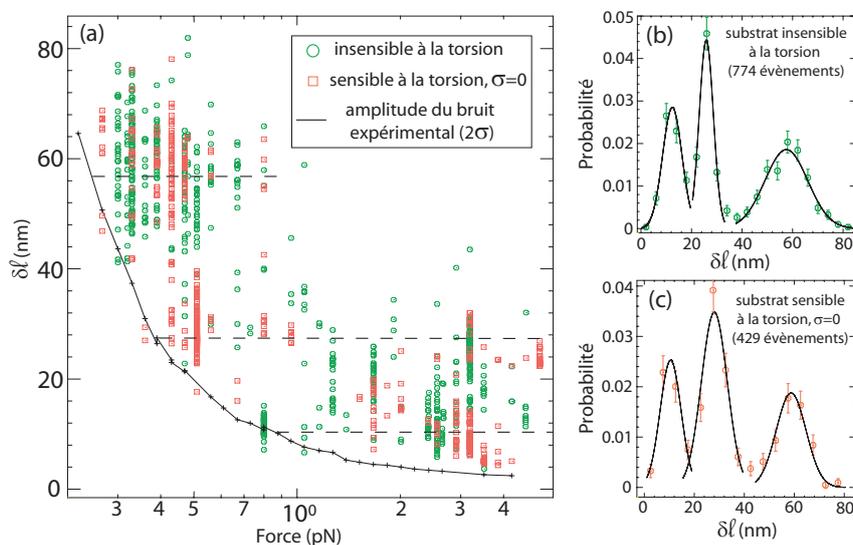


FIGURE 14.3 – (a) Taille des allongements $\delta\ell$ des substrats mononucléosomiaux, en fonction de la force de traction appliquée. Les ronds verts correspondent aux données obtenues sur des substrats insensibles à la torsion, les carrés rouges, à celles obtenues sur des substrats sensibles à la torsion, à $\sigma=0$. Pour donner une idée du bruit expérimental des mesures, on a représenté, en noir, le double de la variance du signal moyenné sur 0.25s, seuil à partir duquel on estime détecter sans ambiguïté un allongement éventuel du substrat. (b) Distribution de taille des allongements observés pour des substrats insensibles à la torsion, pour des forces comprises entre 0.3 et 4.6 pN : on identifie trois tailles caractéristiques : 57.5 ± 2.2 nm, 25.8 ± 2.8 nm et 12.4 ± 1.8 nm. (c) Distribution de taille des allongements observés pour des substrats sensibles à la torsion, à $\sigma=0$, pour des forces comprises entre 0.3 et 4.6 pN : on identifie trois tailles caractéristiques : 58.7 ± 2.8 nm, 28.0 ± 2.4 nm et 10.5 ± 2.1 nm.

Nous avons représenté sur une même figure les allongements $\delta\ell$ mesurés sur des molécules insensibles à la torsion, et sensibles à la torsion mais sans contrainte ($\sigma=0$) dans la mesure où on s'attend à trouver des résultats très similaires.

Remarquons d'abord que la gamme de forces pour laquelle nous observons des signaux réversibles est très large : elle va de 0.3 à 4.6 pN. On distingue deux principaux domaines :

Régime basse force ($F < 1 \text{ pN}$) : On observe principalement deux tailles caractéristiques d'allongement réversible : l'une autour de 58 nm, et l'autre voisine de 27 nm (Figures 14.3(b) et (c)).

L'allongement de grande taille ($\sim 58 \text{ nm}$) n'est observé que pour des forces inférieures à 1 pN. Au delà, on n'a jamais observé de sauts réversibles de cette amplitude : à plus haute force, la barrière d'énergie qu'il faudrait franchir pour former une boucle d'ADN de l'ordre de 58 nm devient trop grande pour que de tels événements soient observables. Un allongement de cette amplitude est donc systématiquement irréversible à plus haute force. Ces événements correspondent vraisemblablement au détachement réversible de près de la totalité de l'ADN nucléosomomal enroulé sur la surface de l'octamère d'histones^g.

Les allongements de plus petite taille ($\sim 27 \text{ nm}$) sont observés pour des forces supérieures à 0.4 pN. Ils peuvent éventuellement avoir lieu à plus basse force mais le bruit expérimental (essentiellement dû aux fluctuations browniennes de la bille) nous empêche de les détecter. Ces allongements sont associés au détachement de l'équivalent d'un tour d'ADN nucléosomal de la surface de l'octamère.

Régime haute force ($F > 1 \text{ pN}$) : A plus haute force, le bruit expérimental diminuant significativement, on est capable de détecter des variations d'amplitude $\delta\ell$ beaucoup plus faibles. On observe principalement deux tailles caractéristiques : celle voisine de 27 nm et correspondant au détachement d'un tour d'ADN de la surface de l'octamère, ainsi qu'une autre, plus petite, correspondant au détachement réversible d'environ 11 nm d'ADN ($\sim 32 \text{ pb}$).

Quelque soit la variation de longueur $\delta\ell$ mesurée, on l'interprète comme le détachement réversible d'une partie plus ou moins importante de l'ADN nucléosomal de la surface de l'octamère d'histones.

Les signaux présentés jusqu'ici étaient relativement simples : ils correspondaient toujours à des transitions plus ou moins rapides de l'extension de la molécule entre deux niveaux et ce, à force constante. Nous avons cependant enregistré des signaux plus complexes que les précédents : nous allons en présenter quelques uns pour montrer la variété des signaux que l'on a pu acquérir.

14.2.2 Les signaux d'allongement de l'extension ℓ_F peuvent prendre des formes variées

14.2.2.1 A force constante, on observe des allongements successifs ou imbriqués, de différentes tailles

La figure 14.4(a) présente un exemple enregistré à basse force ($\sim 1.1 \text{ pN}$), sur un substrat mononucléosomal insensible à la torsion.

Au lieu d'observer des transitions entre deux états particuliers, l'extension ℓ_F de la molécule prend successivement différentes valeurs, à force constante (Figure 14.4(a)). Elle s'allonge d'abord de $\sim 51 \text{ nm}$, est réduite de $\sim 29 \text{ nm}$, augmente de manière transitoire de 28 nm puis est réduite successivement de 20, 5 puis 10 nm. On interprète ceci de la manière suivante : la quasi-totalité de l'ADN nucléosomal enroulé autour de la surface de l'octamère se détache rapidement, puis un tour se forme à nouveau autour de l'octamère, ce dernier se détache à nouveau, puis trois portions d'ADN nucléosomal se réorganisent autour de l'octamère d'histones, de manière successive, pour réduire l'extension bout-à-bout de la molécule de 20,

^g Une interprétation similaire de ces observations pourrait être proposée en imaginant que ce ne sont pas les contacts ADN-histones qui se rompent, mais plutôt les interactions entre histones (voir Chapitre 11).

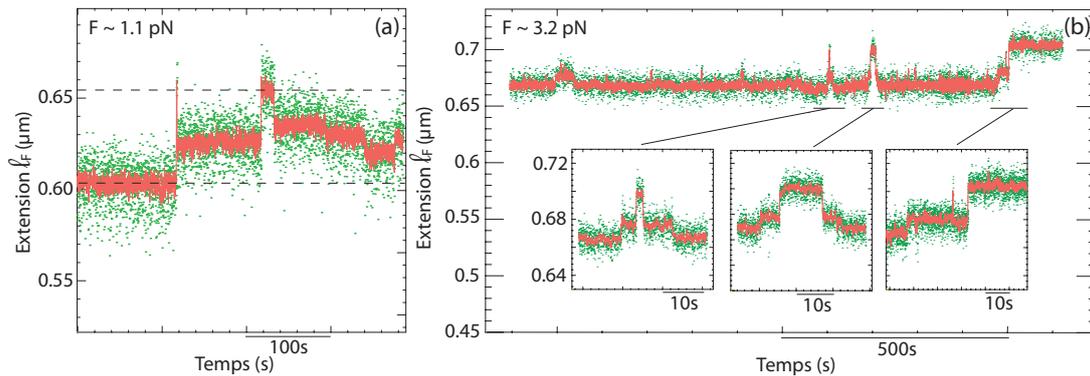


FIGURE 14.4 – Suivi de l’extension bout-à-bout de substrats mononucléosomaux. (a) Pour $F \sim 1.1$ pN, la molécule s’allonge ou se rétrécit successivement. (b) Pour $F \sim 3.2$ pN, on observe des allongements ou réductions avec deux tailles caractéristiques : 10 et 26 nm. Les données vertes correspondent aux données brutes, un moyennage de ces données est fait sur une fenêtre glissante de 0.25 s (données rouges).

5 puis 10 nm.

On peut observer des comportements très similaires à haute force, comme le montre la figure 14.4(b). On suit ici l’extension ℓ_F d’un substrat mononucléosomal à 3.2 pN. On observe d’abord des allongements transitoires de longueur de petites tailles (~ 10 nm), on a ensuite deux signaux (agrandis dans les deux premiers encarts de la figure 14.4(b)) qui montrent, qu’à ces allongements de 10 nm, s’ajoute un allongement transitoire de 26 nm, l’extension du substrat reprenant sa valeur initiale par la suite. Le dernier signal agrandi montre deux accroissements successifs de l’extension de la molécule, de 10 puis 26 nm. La longueur ℓ_F se stabilise à cette valeur dans la suite de l’acquisition.

14.2.2.2 A force constante, la dynamique des transitions entre différentes valeurs de ℓ_F est très variable

Comme précédemment, on suit l’extension d’un substrat mononucléosomal, à force constante (3.2 pN), et on regarde comment évolue son extension. La figure 14.5 présente le cas d’un substrat pour lequel la dynamique de transition est très variable selon les valeurs que prend l’extension ℓ_F : on a d’abord quelques allongements peu fréquents de l’extension de la molécule, de 15 nm, ceci suggère que la barrière d’énergie nécessaire à franchir pour passer d’une configuration à l’autre est relativement élevée, on a ensuite des oscillations très rapides entre deux niveaux distants de 24 nm, ceci correspond certainement à des transitions entre deux configurations séparées par une faible barrière énergétique. L’extension ℓ_F finit par osciller à nouveau lentement entre les deux niveaux de départ.

Ce type de signal est intéressant puisqu’il permet de deviner l’allure du profil énergétique décrivant les étapes permettant le passage d’un état où l’ADN nucléosomal est totalement enroulé autour de l’octamère d’histones à celui où l’ADN nucléosomal se retrouve libéré de la surface du nucléosome.

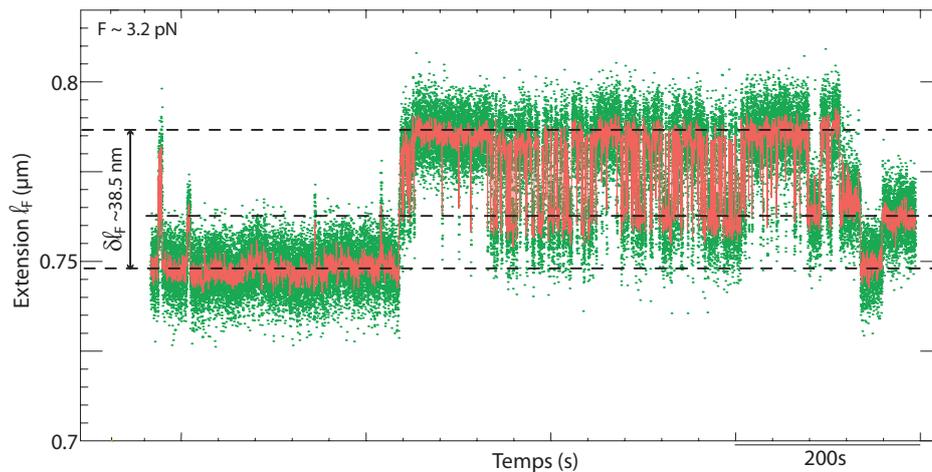


FIGURE 14.5 – Suivi de l’extension d’un substrat mononucléosomal insensible à la torsion, à force constante ~ 3.2 pN, en fonction du temps. Les données brutes correspondent aux points verts ; un moyennage de ces données, sur 0.25 s, est donné en rouge.

14.3 Confrontation avec les expériences déjà publiées

Notre étude montre que l’on est capable de distinguer un substrat mononucléosomal d’une molécule d’ADN nue, en recherchant, dans la gamme de force 0.5-4.5 pN, des allongements réversibles de l’extension du substrat, à force constante (pour les molécules sensibles à la torsion, il suffit de mener cette recherche à $\sigma=0$). Ces allongements peuvent avoir des tailles (de 10 à 58 nm), des formes (signaux bistables ou signaux imbriqués avec plusieurs tailles caractéristiques) et des dynamiques (de la fraction de seconde à la centaine de seconde) variées. Parmi ces signaux, on en trouve qui correspondent en tout point à ceux reportés par C. Bustamante dans les mêmes conditions de tampon (Mihardja et al. (2006))^h. Cependant, notre étude montre que les signaux peuvent être plus variés et plus complexes que ceux proposés par C. Bustamante. Plusieurs arguments peuvent être proposés pour justifier ces différences :

1. On pourrait penser que la variété des signaux que nous obtenons n’est qu’une conséquence de la variabilité des octamères d’histones dont nous disposons. En effet, les substrats mononucléosomaux que nous manipulons, ont des octamères d’histones variés car ceux-ci sont issus du thymus de veau et peuvent donc contenir des variants d’histones et des modifications post-traductionnelles. Il est fort probable que cette hétérogénéité des substrats fournisse des signatures de la présence du nucléosome variées, dans la mesure où l’on sonde ici la structure interne du nucléosome (en rompant divers contacts ADN-histones grâce à l’application d’une force). Cependant, cet argument ne permet pas de justifier les écarts avec les résultats de C. Bustamante dans la mesure où celui-ci utilise également des nucléosomes variés (issus d’érythrocytes de poulet).

2. Il est envisageable que l’équipe de C. Bustamante n’ait pas regardé le comportement de leurs substrats à basse force (< 1 pN), passant à côté de transitions réversibles de grande amplitude (~ 58 nm) et qu’elle n’ait pas une résolution suffisante à haute force (> 3 pN) pour détecter des transitions de l’ordre de 10-

h. On pourra comparer les signaux présentés sur la figure 14.2(b) à ceux présentés dans l’article de C. Bustamante (Mihardja et al. (2006)) où sont reportées des transitions de ~ 20 nm, à 3 pN, avec une durée typique dans chacun des états de quelques secondes.

15 nm. Ainsi, les seuls signaux qui lui soient accessibles seraient ceux ayant des tailles voisines de 22-25 nm.

14.4 Conclusions et perspectives

Quoiqu'il en soit, l'étude précédente fournit un moyen simple et non destructif pour sonder la présence d'un unique nucléosome positionné sur une molécule d'ADN. On a ici une confirmation de la nature très dynamique de la structure du nucléosome, l'ADN nucléosomal pouvant se détacher spontanément (et transitoirement) de l'octamère. Notre dispositif est très sensible et semble permettre de sonder la structure interne d'un nucléosome. Dans cette optique, il serait intéressant de produire un substrat mononucléosomal à partir d'histones recombinantes, de façon à avoir des substrats tous identiques et voir si l'on obtient une signature du nucléosome plus homogèneⁱ.

Un autre aspect manque aux résultats proposés ici : il aurait été intéressant d'obtenir ces signaux caractéristiques de la présence d'un unique nucléosome, sur une molécule d'ADN sensible à la torsion et pour des valeurs de σ différentes de zéro. On n'a malheureusement pas eu encore l'occasion d'en détecter. Ceci permettrait pourtant de compléter la caractérisation de la signature d'un nucléosome, en regardant la libération d'une certaine quantité de torsion (négative) dans la molécule d'ADN lors du détachement partiel d'un nucléosome.

Même si ces deux aspects manquent encore pour caractériser proprement le comportement d'un mononucléosome, on a à disposition un substrat contrôlé qui va nous permettre de sonder l'action des facteurs de remodelage de la chromatine sur un nucléosome. On espère ainsi mettre en évidence une différence de comportement par rapport à la situation où on les fait agir sur de l'ADN nu. Nous n'avons pas encore eu l'occasion de tester ceci, nous espérons pouvoir progresser dans ce sens, dans les prochains mois. Remarquons enfin que le mononucléosome peut ne pas être le bon substrat à considérer pour étudier l'activité de remodelage de la chromatine (il est peut être nécessaire que les facteurs de remodelage contactent plusieurs nucléosomes pour altérer la structure de la chromatine), encore une fois, il est nécessaire de comprendre d'abord ce qui se passe avec un substrat simple (contenant un nucléosome) avant de le rendre plus complet (en lui ajoutant d'abord l'histone de liaison, puis en considérant ensuite plusieurs nucléosomes). Comprendre précisément l'activité de remodelage de la chromatine, en molécules uniques, est encore un travail de longue haleine.

i. Cette caractérisation est en cours grâce à l'aide de J.-P. Quivy (Institut Curie) qui nous a aimablement fourni des histones de *Xenopus* recombinantes.

Conclusions générales

Rappels des résultats obtenus

On a d'abord étudié l'activité de trois facteurs de remodelage de la chromatine, appartenant à trois familles distinctes (yRSC de la famille Swi2/Snf2, yISW1a de la famille Iswi et yCHD1 de la famille Nurd/Mi-2/Chd). Cette étude a révélé des différences de comportement significatives entre ces complexes : alors que yISW1a et yCHD1 s'accrochent à l'ADN de manière extrêmement coopérative et réduisent son extension bout-à-bout, yRSC a besoin d'utiliser l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour se transloquer le long de l'ADN et former de larges boucles surenroulées négativement. Le substrat sur lequel on teste l'activité de ces complexes n'est pas leur substrat naturel : on ne prétend donc pas sonder ainsi leur activité de remodelage, c'est-à-dire le processus fonctionnel qui leur permet d'altérer la structure de la chromatine. Néanmoins, ce processus doit nécessiter au moins un contact entre ces complexes et l'ADN. Il est donc vraisemblable que les différences de comportement, observées ici entre ces complexes et l'ADN, se répercutent sur l'activité de remodelage à proprement parler.

Pour réellement sonder l'activité de remodelage de la chromatine de ces différents complexes, il faut pouvoir travailler avec un substrat nucléosomal. Des expériences déjà publiées nous ont encouragé à travailler avec le plus simple qui soit : le mono-nucléosome. Nous avons mis au point un protocole permettant de préparer des mononucléosomes de manière contrôlée et nous disposons d'un test, en pinces magnétiques, pour s'assurer de la présence d'un nucléosome sur le substrat piégé.

Perspectives

La suite logique de ce travail est de mettre à profit ce nouveau substrat pour étudier le comportement des facteurs de remodelage de la chromatine. On espère ainsi pouvoir sonder l'activité ATPase de yISW1a (stimulée uniquement en présence de nucléosomes) et de confirmer les résultats publiés par l'équipe de C. Bustamante concernant yRSC. Notons dès à présent que cette étude ne sera sans doute pas suffisante : il est possible qu'un unique nucléosome ne soit pas le bon substrat pour sonder le remodelage de la chromatine. Peut être sera-t-il nécessaire de complexifier encore le substrat (présence d'au moins deux nucléosomes, présence de l'histone de liaison...) pour que l'activité de remodelage ait effectivement lieu dans de bonnes conditions ?

On souhaite développer également une autre approche pour compléter ce travail : si l'on imagine que l'activité de remodelage de certains complexes ne se fasse que par une déstabilisation très locale de l'ADN nucléosomal autour de l'octamère d'histones (diffusion d'une très petite bulle ou d'une très faible portion d'ADN twistée), il est probable que ce processus permette de faire glisser un nucléosome le long de l'ADN sans que l'extension bout-à-bout du substrat ne soit modifiée. Ainsi, nous ne serions pas à même de

détecter la moindre activité en pinces magnétiques. Dans ce but, nous avons commencé à développer un dispositif qui couple micromanipulation et fluorescence. Notre collaborateur, Tom Owen-Hughes, a produit un mutant de γ RSC possédant une biotine sur laquelle on peut fixer un fluorophore, il dispose d'autre part d'histones également marquées. On souhaiterait donc mettre au point des expériences pour lesquelles on puisse à la fois manipuler une fibre de chromatine tout en visualisant, en fluorescence, les différents octamères d'histones positionnés sur la fibre ainsi que les facteurs de remodelage agissant dessus. On peut ainsi espérer répondre à différentes questions : est-ce que le facteur de remodelage a un mouvement directionnel le long de l'ADN ? peut-il changer de direction ? que se passe-t-il lorsqu'il rencontre un nucléosome ?... Ce travail, initié au cours de ma thèse, va être développé par Fangyuan Ding qui débute sa thèse au sein de l'équipe.

Annexe A

Préparation de la chambre microfluidique du dispositif de pinces magnétiques

On mène les expériences de pinces magnétiques dans un petit canal délimité par une surface de verre sur laquelle repose une fine feuille de mylar : la feuille de mylar est fixée sur la lamelle de verre par l'intermédiaire d'un scotch double face prédécoupé en son centre. La construction ainsi réalisée permet d'obtenir une chambre dont le volume typique est $50\text{mm} \times 5\text{mm} \times 60 \mu\text{m} \approx 15 \mu\text{L}$.

1. Découper un rectangle de dimension 20×6 cm dans une feuille de mylar.
2. La percer de deux trous d'environ 3 mm de diamètre aux emplacements préciser sur la figure 5.3, Partie 2, Chapitre 5.
3. Tendre la feuille de mylar sur le porte échantillon prévu à cet effet.
4. Fixer sur le dessus de la feuille de mylar les connexions, réservoirs et tubes permettant ensuite d'injecter ou de retirer le liquide contenu dans la chambre de travail.
5. Traiter la surface de verre formant le fond du capillaire comme suit :
 - (a) Prendre une lame de microscope (*Menzel-Gläser*, 24×60 mm, #1).
 - (b) La rincer avec NaOH 5 M pendant 1 min.
 - (c) La rincer à l'eau distillée.
 - (d) La placer sur une plaque chauffante réglée sur 150°C pendant 30 min.
 - (e) Ajouter dessus du Sigmacote *Sigma n° SL-2* et laisser reposer 1-2 min.
 - (f) Sécher alors la lame et la replacer sur la plaque chauffante pour 30 autres minutes.
6. Fixer la lame de verre sur la feuille de mylar (voir figure 5.3, Partie 2, Chapitre 5)
7. Faire passer de l'eau distillée pour rincer la chambre d'une part, et vérifier qu'il n'y a pas de fuites d'autre part.
8. Introduire $70 \mu\text{L}$ d'antidigoxigénine *Roche n° 1333098*, $200 \mu\text{g}$ et laisser incuber la chambre pendant 3 heures à 37°C .

Annexe B

Etude de l'activité de RSC sur l'ADN nu

Molecular Cell 21, 417–425, February 3, 2006 ©2006 Elsevier Inc. DOI 10.1016/j.molcel.2005.12.013

Direct Observation of DNA Distortion by the RSC Complex

Giuseppe Lia,¹ Elise Praly,¹ Helder Ferreira,³ Chris Stockdale,³ Yuk Ching Tse-Dinh,⁴ David Dunlap,² Vincent Croquette,¹ David Bensimon,¹ and Tom Owen-Hughes^{3,*}

¹Laboratoire de Physique Statistique and

Department Biologie
Ecole Normale Supérieure
CNRS-UMR 8550
24 rue Lhomond
75 231 Paris Cedex 05
France

²San Raffaele Institut
20132 Milan
Italy

³The Division of Gene Regulation
School of Life Sciences
University of Dundee
Dundee DD1 5EH
United Kingdom

⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology
New York Medical College
Valhalla, New York 10595

Summary

The Snf2 family represents a functionally diverse class of ATPase sharing the ability to modify DNA structure. Here, we use a magnetic trap and an atomic force microscope to monitor the activity of a member of this class: the RSC complex. This enzyme caused transient shortenings in DNA length involving translocation of typically 400 bp within 2 s, resulting in the formation of a loop whose size depended on both the force applied to the DNA and the ATP concentration. The majority of loops then decrease in size within a time similar to that with which they are formed, suggesting that the motor has the ability to reverse its direction. Loop formation was also associated with the generation of negative DNA supercoils. These observations support the idea that the ATPase motors of the Snf2 family of proteins act as DNA translocases specialized to generate transient distortions in DNA structure.

Introduction

The Snf2 family of proteins possesses distinct helicase motifs, characteristic of the superfamily II (SFII) group of helicase-related proteins. SFII includes bona fide double-stranded DNA translocases such as the DNA translocating subunits of type I restriction enzymes (Firman and Szczelkun, 2000), raising the possibility that the helicase motifs within the Snf2 protein family may also function in this way. This hypothesis is supported by recent biochemical characterization of Snf2 protein action (Havas et al., 2000; Van Komen et al., 2000; Saha et al., 2002; Whitehouse et al., 2003; Fyodorov and Kadonaga, 2002; Jaskelioff et al., 2003).

Many Snf2 proteins have been shown to alter chromatin structure in vitro in an ATP-dependent manner, and there is also evidence that some modify the chromatin structure in vivo (reviewed by Becker and Horz [2002]). However, Snf2 proteins are not adapted to function solely on nucleosomes (see for example, Sukhodolets et al. [2001]). Instead, it appears that a common feature of the Snf2 family is its ability to alter DNA structure and thereby regulate DNA-protein interactions. It remains to be established how the distortion of DNA by Snf2 proteins differs from that carried out by other DNA translocases.

In order to directly monitor the action of a Snf2 protein, we have studied the activity of the RSC chromatin remodeling complex (Cairns et al., 1996) on single DNA molecules by an approach similar to one that has previously proven to be effective in the study of topoisomerases (Strick et al., 2000), DNA helicases (Dessinges et al., 2004), and DNA translocases such as FtsK (Saleh et al., 2004) and RuvAB (Dawid et al., 2004). We find that translocation by the RSC complex is able to generate large loops (hundreds of base pairs long) within which DNA is underwound. The size of these loops was found to depend upon both the tension in DNA and the ATP concentration. Interestingly, the majority of loops were also relaxed in an ATP-dependent reaction, which suggests that translocation of the complex is reversible. This ability to reversibly modify the DNA structure could provide a potent means by which Snf2 proteins are able to control a number of protein-DNA interactions.

Results

RSC Causes Transient Shortenings in the Length of Single-Stretched DNA Molecules

In order to monitor the action of RSC on single DNA molecules, a 3.6 kbp DNA fragment was tethered at one end to a glass slide and at the other to a magnetic bead. Magnets were then used to set the force (F) stretching the molecule and to control the rotation of the bead. Video microscopy was used to monitor the position of the bead and provide a real-time measurement of the distance of the bead to the glass surface (schematically illustrated in Figure 1A). In the absence of RSC, a single nicked DNA molecule undergoes restricted Brownian fluctuations (Figure 1B, Trace A). In the presence of RSC and ATP, transient reductions in the length (l_n) of the molecule were observed with an on time (τ_{on}) (Figure 1B, Trace B, and Figure 1C, bursts 1 and 2). In ~50% of cases, an apparent stall (or pause) was observed once a maximal change in extension δl_n was reached and before the molecule reverted to its initial extension (Figure 1C, burst 2). At 100 μ M ATP and $F = 0.3$ pN, an average decrease in extension $\langle \delta l_n \rangle = 106 \pm 7$ nm ($n = 250$ events) was measured corresponding to translocation of ~420 base pairs. ATP was required for these shortenings to be detected, and increasing the ATP concentration led to larger $\langle \delta l_n \rangle$ (see Figure 2A).

The probability distribution of δl_n was found to be gaussian (see Figure 1D), whereas the distribution of

*Correspondence: t.a.owenhughes@dundee.ac.uk

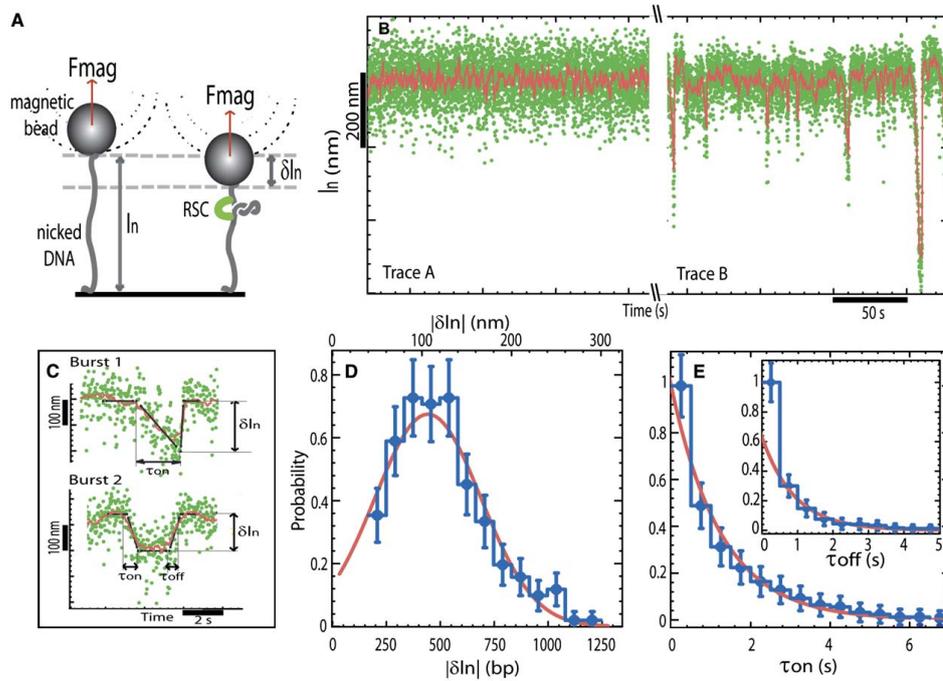


Figure 1. Loop Extrusion by RSC on a Nicked DNA Molecule

(A) A single DNA is anchored at one end to a glass surface and at the other to a magnetic bead that is pulled by small magnets placed above the sample. We monitor the molecule's extension (l_n) at a fixed force ($F \approx 0.3$ pN) and fixed [ATP] = 100 μ M. Binding of RSC to DNA decreases its extension by δl_n . (B) Time traces of the variation in DNA's extension without RSC (Trace A) and in the presence of RSC (Trace B) (nonaveraged raw data [green] and averaged over 1 s [red]). (C) Detail of two different types of events observed with RSC (raw data [green], averaged over 1 s [red], and polygonal fit [black] from which we deduce δl_n , τ_{on} , and τ_{off} ; see **Experimental Procedures** for data treatment). Burst 1, a slow decrease of the extension, followed after a short pause by a quick return to the original extension: $\delta l_n = 200$ nm, $\tau_{on} = 1.96$ s, and $\tau_{off} = 0.13$ s. Burst 2, a slow decrease of the extension, followed after a stall (or pause) by a slow return to the original length: $\delta l_n = 143$ nm, $\tau_{on} = 0.57$ s, and $\tau_{off} = 0.58$ s. (D) Histogram of the change in extension δl_n ($n = 250$ events, error bars are statistical errors). A gaussian fit yields: $\langle \delta l_n \rangle = -106 \pm 7$ nm. (E) Cumulative probability distributions of τ_{on} and τ_{off} for all bursts (error bars are statistical errors). The data for the on times were fitted by: $P_{on}(t > \tau) = \exp(-\tau / \tau_{on})$ with $\tau_{on} = 1.14 \pm 0.07$ s. The off-time data were fitted by: $P_{off}(t > \tau) = (1 - p) \exp(-\tau / \tau_{off}) + p \delta(\tau = 0)$ with $\tau_{off} = 0.90 \pm 0.13$ s and $p \approx 40\%$; p is the fraction of events with an off time below the temporal resolution of our setup (~ 0.5 s).

on times was exponential (see **Figure 1E**). This is in striking contrast with other DNA translocases (Dessinges et al., 2004; Saleh et al., 2004; Dawid et al., 2004) that operate at constant rate v and for which there is a linear relationship between processivity (δl_n) and on time: $\delta l_n = v \tau_{on}$. For these enzymes, the probability distributions of δl_n and τ_{on} are similar and exponential.

The shortening events were observed to recover their initial length in two ways. In $\sim 40\%$ of cases, shortening events reversed to their original extension in a time that was too quick (< 0.5 s) to be measured with this setup, (e.g., **Figure 1C**, burst 1). In the remaining 60% of cases, the molecule returned to its original length in a time τ_{off} similar to τ_{on} (e.g., **Figure 1C**, burst 2). Both τ_{off} and τ_{on} decreased with increasing ATP concentration; at 10 μ M ATP, $\tau_{on} = 1.61 \pm 0.16$ s and $\tau_{off} = 1.49 \pm 0.15$ s, whereas at 200 μ M ATP, $\tau_{on} = 1.03 \pm 0.1$ s and $\tau_{off} = 0.83 \pm 0.08$ s. This observation suggests that τ_{on} and τ_{off} correlate with

translocation by the ATPase motor. Reverse translocation has been reported for other DNA translocases (Dessinges et al., 2004; Saleh et al., 2004; Dawid et al., 2004). In the present case, it could occur either as a result of the concerted action of a complex comprising two or more motors or as a result of a reversal in the orientation of translocation by a single motor (as illustrated in **Figure 6**).

Both the RSC and SWI/SNF complexes contain single copies of their catalytic subunits (Saha et al., 2002; Smith et al., 2003), meaning that if two motors were involved, two complexes would need to associate with the DNA molecule. To reduce the probability of such events, all measurements were made under conditions in which shortenings were infrequent. However, as it was not possible to directly measure the number of RSC complexes acting on a DNA molecule, we decided to investigate the effect of RSC on linear DNA by atomic force microscopy (AFM), in similar buffer conditions (but at $F = 0$ pN).

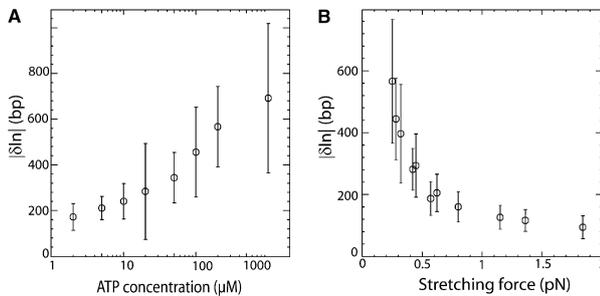


Figure 2. Dependence of DNA Shortening on ATP Concentration and Stretching Force

Dependence of δl_n (A) on ATP concentration at fixed force $F = 0.3$ pN and (B) on stretching force F at fixed $[ATP] = 100$ μ M. At large forces ($F > 1$ pN), the decrease in extension δl_n is overestimated, because we only record the few events with a size clearly larger than the noise level (with standard deviation $\sigma_n \sim 50$ bp). The error bars correspond to the standard deviation of the distribution of δl_n values.

AFM Shows that Single RSC Complexes Cause ATP-Dependent Reductions in the Contour Length of DNA

The RSC complex is large enough (it has a mass of ~ 1 MDa) that individual complexes should be observable by AFM. Indeed, imaging of a mica surface onto which RSC complexes had been adsorbed revealed the presence of isolated particles with a diameter of 30 nm and a height of 5 nm (Figures 3A and 3D). When RSC was allowed to bind DNA prior to deposition, AFM imaging revealed the presence of isolated RSC-DNA complexes (Figure 3C). The size of the RSC particles in these complexes was indistinguishable from free RSC complexes (Figure 3D), suggesting that single RSC complexes represent the predominant species bound to DNA. In addition to measuring the size of the RSC complex, it was possible to measure the contour length of DNA fragments. In the presence of RSC and 2 μ M ATP, the average DNA contour length was shorter by $\delta l_n = 103$ nm ($n = 97$ events) than in their absence (Figure 3E). These shortenings were largely ATP dependent, as the DNA shortening observed in the presence of RSC only was 17 nm. The position of the RSC complex along DNA was also affected by the presence of ATP. Without ATP, about 6% of RSC complexes (four out of 65 events) was observed at the DNA's extremities. This is slightly lower than the $\sim 20\%$ expected for a random binding of RSC along DNA. However, in the presence of 2 μ M ATP, 64% of the observed complexes (62 out of 97 events) is localized at the molecule's ends (see Figure 3C, left). For the 36% of complexes located away from the extremities, relaxed or supercoiled loops associated with the complex could sometimes be identified (see Figure 3C, middle and right). The fact that the position of RSC along DNA is significantly altered in the presence of ATP suggests that the majority of RSC complexes translocate to the molecule's ends from which they dissociate relatively slowly. In combination, these observations suggest that translocation of RSC along DNA is accompanied by loop formation.

The finding that single RSC complexes generate ATP-dependent reductions in the contour length of DNA similar to the shortenings observed with the magnetic trap setup provides good evidence that in both cases single complexes are responsible for the change in the DNA's extension. This supports the model illustrated in Figure 6 in which RSC translocates along the molecule while forming a loop of DNA whose size may be reduced either by dissociation of the complex or as a result of a reversal of its translocation direction.

DNA Shortening by RSC Is Sensitive to the Tension in DNA

Although the extent of DNA shortening observed in the AFM images and the extent measured with the magnetic trap setup were comparable, they were not identical. One difference between the two approaches is that in the AFM assay the RSC complex associates with an unstressed linear DNA, whereas in the magnetic trap experiment, the DNA is maintained under a small amount of tension (a fraction of pN, comparable to the tension existing in naturally supercoiled DNA [Charvin et al., 2004]).

To investigate how the force applied to DNA affected the action of RSC, the extent of DNA shortening was measured for different forces (at fixed $[ATP] = 100$ μ M). The results show that the average size of shortening events decreased as the tension increased, see Figure 2B. The largest average change in extension, $\langle \delta l_n \rangle = 130 \pm 7$ nm ($n = 59$ events), was observed at the lowest force investigated ($F = 0.25$ pN). It then decreased with increasing force, with no DNA distortions being detected at forces larger than about 3 pN. The finding that force has such a strong effect on the average size of the DNA shortening events suggests that the tension the motor is working against may play a role in limiting the extent of translocation.

The DNA Loop Generated by RSC Is Subject to Negative Superhelical Torsion

An attractive feature of the magnetic trap is that by rotating the magnetic bead, positive or negative turns can be introduced onto an unnicked DNA molecule. Such a supercoiled (sc)DNA may form plectonemes of either positive or negative chirality with significant reduction in the extension of the molecule. For example, at a force $F = 0.3$ pN, the introduction of one superhelical turn results in a shortening of $l_p = 60$ nm [Charvin et al., 2004]. The data presented in Figures 1 and 2 were obtained by using nicked or relaxed molecules where DNA torsion does not contribute significantly to the observed shortening events. By comparing these data to measurements made on (+) or (-)scDNA, it is possible to investigate whether the DNA shortenings induced by RSC are associated with the induction of local torsion in the molecule. Figures 4A and 4B show that on (+)scDNA (at $[ATP] = 100$ μ M), the action of RSC results in a variation of $\delta l^+ = -138 \pm 6$ nm ($n = 492$ events), slightly smaller than the shortening $\delta l_n = -106$ nm observed on nicked DNA (see Figure 1D). In contrast, on (-)scDNA, a lengthening of $\delta l^- = +259 \pm 4$ nm ($n = 221$ events) is observed.

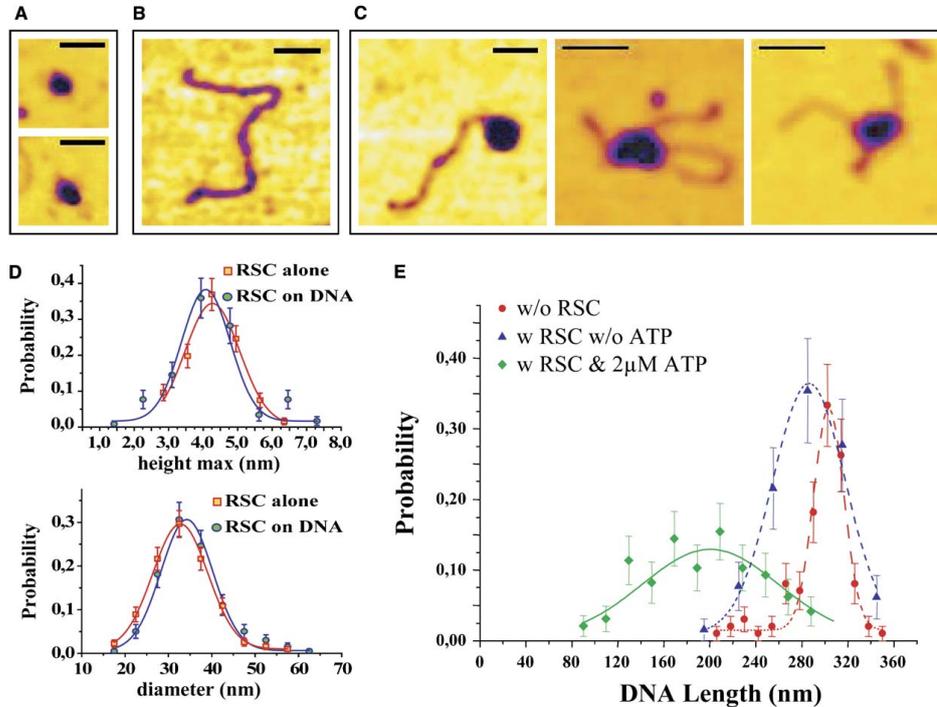


Figure 3. AFM Images of RSC Complex on Linear DNA Molecules

(A) Images of isolated RSC complexes on a mica surface.
 (B) Image of a 891 bp linear DNA molecule.
 (C) Images of RSC-DNA complexes (in presence of 2 μ M ATP) located either at the DNA's end or at a midposition. In the latter, two cases notice the presence of a (relaxed or supercoiled) loop associated with the complex (bar = 50 nm).
 (D) Histograms of the maximal height (h) and diameter (D) for isolated and DNA bound RSC complexes at 2 μ M ATP. The similarity of the histograms indicates that in the conditions of our experiments, RSC binds to DNA as a single complex.
 (E) Distribution of the DNA contour length $\langle L \rangle$; without RSC, $\langle L \rangle = 303 \pm 2$ nm; with RSC but without ATP, $\langle L \rangle = 286 \pm 5$ nm; and with RSC and 2 μ M ATP, $\langle L \rangle = 200 \pm 8$ nm (the error bars are statistical errors).

This increase in extension is most likely due to a reduction in the size of the plectonemes on (-)scDNA (schematically illustrated in Figure 4C), suggesting that negative torsion is generated in the DNA loop formed by the action of the RSC complex.

If the action of RSC results in the formation of a loop of size l_t that contains n^- negative supercoils, an identical number of compensatory positive supercoils must be formed outside the loop, which would reduce the number of plectonemes on (-)scDNA, causing an increase in the molecule's extension by $n^- l_p$ (see Figure 4C, right). The overall change in the DNA's extension is then $\delta l^- = l_t^- + n^- l_p = 259$ nm. Assuming that the average extent of DNA translocated by RSC on (-)scDNA is the same as on a nicked molecule, $l_t^- = \delta l_n^- = -106$ nm, we deduce that $n^- = 6.1$ turns. This would indicate that (at [ATP] = 100 μ M and $F = 0.3$ pN) the RSC complex caused the generation of a loop containing ~ 420 bp of DNA with 6.1 negative superhelical turns, corresponding to a degree of supercoiling $\sigma = -0.15$. However, this should be viewed as an upper bound on $|\sigma|$ (see Discussion).

In a similar manner, we can estimate the number of compensatory turns introduced on (+)scDNA, n^+ considering that the overall change in the DNA's extension is: $\delta l^+ = l_t^+ - n^+ l_p$ (see Figure 4C, left). Making the same hypothesis as for (-)scDNA, i.e., $l_t^+ = \delta l_n^+ = -106$ nm, we deduce that $n^+ = 0.6$ turns are introduced during translocation of RSC on (+)scDNA. These different results for (+) and (-)scDNA ($n^+ \neq n^-$) indicate that the extent of negative torsion introduced in the DNA loop associated with RSC is affected by the overall torsion (positive or negative) in the remaining portion of the molecule.

RSC could generate loops of DNA containing negative supercoils either in the form of unconstrained supercoils or in the form of constrained supercoils formed by wrapping the molecule around the RSC complex. The latter has to be given serious consideration given that DNA protruding from RSC complexes can only be seen in some of our AFM images and that another Snf2 protein has been proposed to wrap DNA (Beerens et al., 2005). In order to distinguish between these possibilities, we analyzed the effect of RSC on DNA topology in bulk

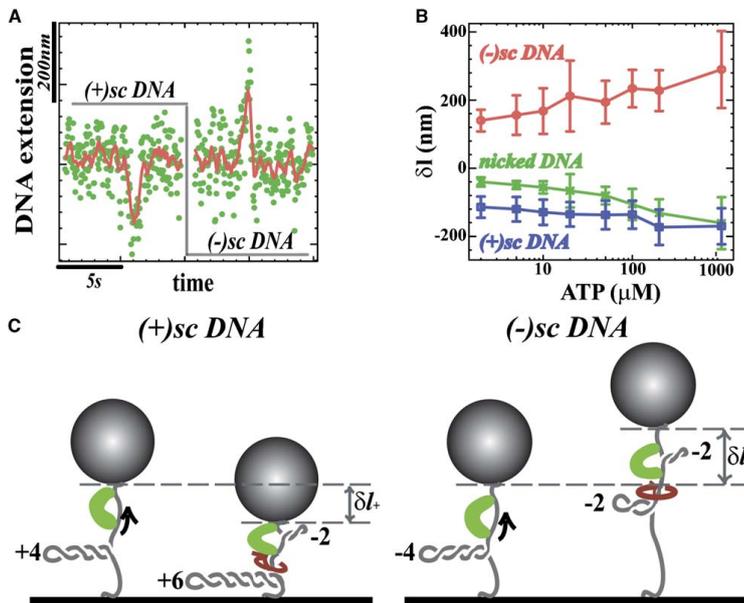


Figure 4. Transient DNA Topology Changes Associated with RSC Translocation
(A) Time traces on (+) and (-)scDNA, in presence of 100 μM ATP at $F = 0.3$ pN (raw data [green], and averaged over 1 s [red]).
(B) Dependence of Δl on ATP concentration for nicked, (-)scDNA, and (+)scDNA (the error bars correspond to the standard deviation of the Δl distribution).
(C) Sketch showing the effect of twisting during RSC translocation on (+) and (-)scDNA. On (+)scDNA, the generation of a loop negatively twisted by two turns is compensated by the addition of two positive supercoils on the remaining DNA, thus reducing the distance of the bead to the surface. On (-)scDNA, the generation of a negatively supercoiled loop reduces of the number of (-) supercoils in the rest of the molecule and increases in the overall DNA's extension.

assays. In the presence of *E. coli* topoisomerase 1A (Topo1A), which preferentially removes (-) supercoils, RSC caused an ATP-dependent increase in the linking number of plasmid DNA, which could be detected as faster-migrating bands after agarose gel electrophoresis (Figure 5A). The high mobility of these topoisomers in the presence of chloroquine indicates that (+)scDNA is generated in the presence of RSC, ATP, and Topo1A (see Figure 5C, lane 8). The level of positive supercoiling increases in the presence of increasing amounts of RSC complex and when RSC and Topo1A are incubated for longer times, indicating that alterations to topology accumulate in the presence of RSC and ATP (Figures 5C and 5E). These changes to DNA topology are unlikely to require DNA molecules to be coated with many RSC complexes, as they are detectable under conditions in which few RSC complexes interact with plasmid DNA, as shown by native gel shift assays (Figure 5F).

If RSC was wrapping DNA rather than forming the negatively supercoiled and freely accessible DNA loop suggested by the experiments with Topo1A, one would expect negatively supercoiled topoisomers to accumulate in the presence of vaccinia topoisomerase 1B (which relaxes both [+] and [-] supercoils). Instead, only a small proportion of both (+) and (-) supercoiled topoisomers is generated at high RSC concentrations (Figures 5B and 5D).

Combining these results with the single molecule measurements and AFM images, we conclude that the RSC complex generates loops of negatively supercoiled DNA, accessible to topoisomerases and similar in size to the circumference of the RSC complex.

Discussion

Using a single molecule magnetic trap setup, we found that RSC causes transient reductions in the DNA's extension. AFM imaging of surface-adsorbed RSC-DNA complexes reveals that similar shortenings in the form of relaxed or supercoiled loops are generated by single complexes. We therefore propose that RSC actively and reversibly translocates DNA, the size of the translocated loop being ATP and tension dependent (see Figure 2). We also find that the translocated DNA becomes underwound during the course of loop formation, as illustrated in Figure 6.

Although all the data (single molecule and bulk) indicate that negatively underwound DNA accumulates within the loops, there is a difference in the extent of this effect on (-) and (+)scDNA. There are a number of possible explanations for this observation. One possibility is that the size of the DNA loop l_{\pm}^{\pm} differs on (\pm)scDNA templates. Supporting this, on (-)scDNA, the total change in extension observed Δl^{-} is in the same direction

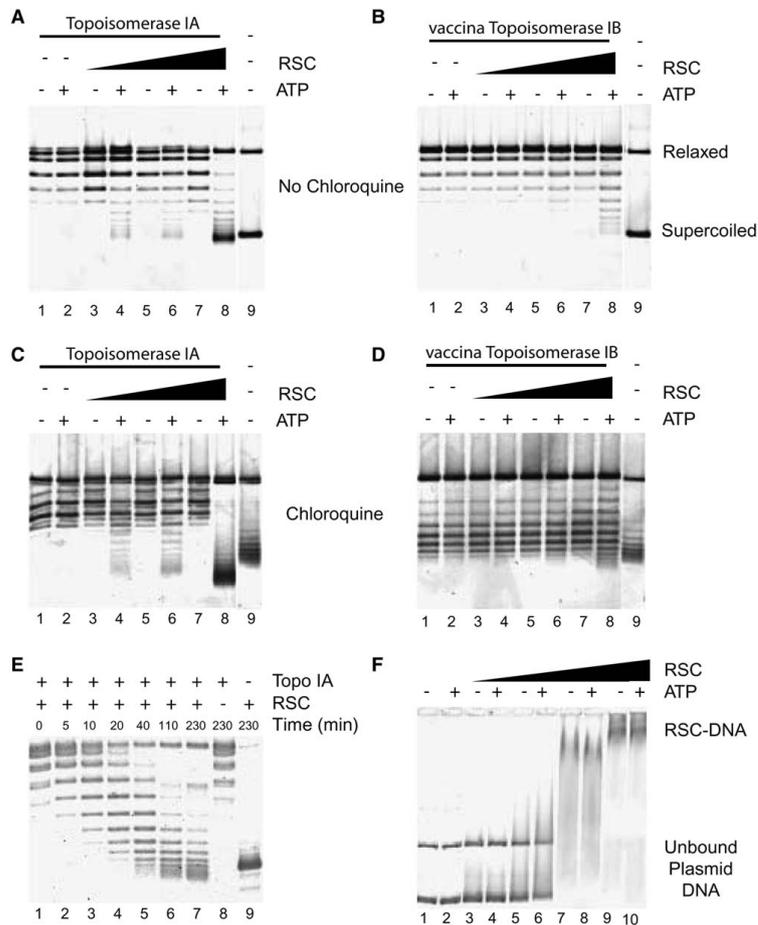


Figure 5. Detection of Unconstrained Superhelical Torsion in the Presence of RSC
 Relaxed pUC18 DNA (40 ng) was incubated in the presence of recombinant *E. coli* topoisomerase 1A (A, C, and E) or recombinant vaccina topoisomerase 1B (B and D), RSC and ATP as indicated for 1 hr at 30°C. RSC was present at 10 nM (lanes 3 and 4), 33 nM (lanes 5 and 6), 100 nM (lanes 7 and 8), and 300 nM (F, lanes 9 and 10). After incubation, proteins were removed and topoisomers resolved by agarose gel electrophoresis. Electrophoresis was performed in the absence of chloroquine (A, B, E, and F) or in the presence of 1 μ g/ml chloroquine (C and D). In the presence of RSC and ATP, faster-migrating supercoiled DNA was detected in the presence of topoisomerase 1A, which selectively removes negative supercoils. The mobility of this DNA was increased rather than reduced in the presence of chloroquine, indicating that this DNA is positively supercoiled (C). Little change in DNA topology was detected after incubation with RSC and vaccina topoisomerase 1B, indicating that RSC is not stably wrapped by the complex. In (F), reactions were performed in the absence of topoisomerases and loaded directly onto 0.3 \times TBE agarose gel. This shows that the changes in topology detected in (A) and (C) were obtained under conditions in which DNA is partially bound by RSC.

as the applied force, whereas on (+)scDNA, the contraction works against the DNA tension. The measurements on nicked DNA molecules at different forces indicate that the loop size $|\delta l_n|$ decreases with increasing work against the force (Figure 2). This would imply that $\Gamma_t \leq \delta l_n \leq l_t^* < 0$. Another explanation is that the number of negative supercoils generated in the translocated loop n^\pm differs on (\pm)scDNA. This could be due to variation in the step size on (+) and (-)scDNA or to differences in the amount

of slippage that occurs during translocation. Differences in slippage on (\pm)scDNA have been reported for another translocase: FtsK (Saleh et al., 2005). Increased slippage at high ATP concentrations could also explain why the calculated superhelical density generated by RSC decreases with ATP concentration (Figure S1 available in the Supplemental Data with this article online).

Although we cannot calculate whether n^\pm , l_t^\pm , or a combination of both are altered on (\pm)scDNA, we can

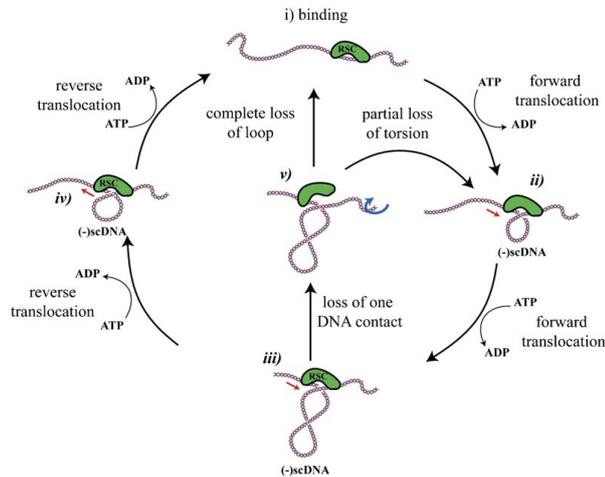


Figure 6. Model for DNA Translocation by RSC

In order to form loops on DNA, the RSC complex must make at least two contacts with DNA. If one of these contacts is capable of DNA translocation, DNA could be drawn into a loop (red arrow) in the presence of ATP as shown in (i)–(iii). Once formed, we observe that the majority of loops are removed in an ATP-dependent reaction that could occur as a result of translocation in the reverse orientation (iii), (iv), and (i). In some cases, we observe loops collapsing rapidly. This could occur if either the translocase disengages or another contact constraining DNA is lost (iii), (v), and (i). In this latter case, the translocase would be likely to restart the cycle at a different location on the DNA fragment. Consistent with this, we observed ATP-dependent redistribution of RSC complexes toward the DNA ends in the AFM images. As we observe differences in the degree of supercoiling under different conditions, it is likely that in some cases torsion could be partially relaxed as a result of slippage, (v)–(ii), in a manner similar to what has been reported for FtsK (Saleh et al., 2005).

obtain useful bounds. For example the degree of supercoiling in the loop formed by RSC on (–)scDNA (at 100 μM ATP and $F = 0.3$ pN) is bounded from above by

$$|\sigma^-| \equiv \frac{n^-}{|l_t^-|} \zeta h = \frac{\delta l^- / |l_t^-| + 1}{l_p} \zeta h < \frac{\delta l^- / |\delta l_n| + 1}{l_p} \zeta h = 0.15.$$

Here, $h = 3.6$ nm is the DNA pitch, and ζ is the molecule's relative extension derived from the WLC model (see Figure S3), which allows us to estimate the contour length of the extruded loop. Because $\delta l^- > 0$, $|\sigma^-|$ is also bounded from below: $|\sigma^-| > \zeta h / l_p = 0.04$. These bounds imply that RSC generates much less than one turn per every 10.5 bps of (–)scDNA translocated but probably enough torsion in the loop to induce its partial melting (which occurs when $\sigma^- < -0.06$).

A means by which RSC might generate negative superhelical loops involves rotation associated with translocation along the helical DNA backbone. Similar effects have been observed with other DNA translocases (Seidel et al., 2004; Saleh et al., 2005). If translocation proceeded by maintaining contact with each base along the DNA backbone, then one negative rotation would be generated for every 10.5 bp translocated (Seidel et al., 2004). In contrast, our observations indicate that the amount of negative rotation (σ^-) generated is between -0.15 and -0.04 rotations per 10.5 bp translocated. This can be explained if the motion of RSC along DNA is broken down into steps of about 12 bps (or multiples thereof), slightly greater than the helical repeat (Saleh et al., 2005). This could be an important adaptation for a translocase such as RSC that may be specialized in engaging DNA wrapped around the histone octamer.

Another distinctive feature of RSC is that although the length of the translocated loop δl_n is gaussianly distributed (Figure 1D), the time taken to form the loop τ_{on} is exponentially distributed (Figure 1E). This different statistical behavior can be explained if tensional or torsional load during translocation slows down the activity of the complex and determines the change in DNA extension.

This explanation accounts for the observation in many cases of a stall phase (Figure 1C, burst 2) and for the possibility of distinct torsion-induced slippage on (+) or (–)scDNA, accounting for the previously mentioned observation that $n^+ \neq n^-$. When the motor is working against relatively high opposing forces (or torques) there may be an increased likelihood that the translocase (1) slips (i.e., lets the DNA in the loop swivel and relaxes part of the torsion), (2) engages with the opposite strand, resulting in a gradual reduction in the molecule's extension (see Figure 6), or (3) dissociates from DNA, resulting in a rapid extension in DNA length.

A thermal ratchet model of the translocation of RSC (that will be presented elsewhere) reproduces all the features reported here. It assumes that the RSC-DNA complex proceeds upon ATP binding into a productive translocation mode with a rate that is slowed down as the energy stored in the loop increases. Translocation is thus slowed down (and eventually stalled) as more DNA is being pulled into the RSC-associated DNA loop. The different distributions of δl_n and τ_{on} are recovered as well as their dependence on force and ATP concentration.

The ability to generate both loops and torsion in DNA provides the RSC complex with potent means by which it could drive DNA over the surface of nucleosomes using variants of the twist defect diffusion and bulge diffusion mechanisms that have been proposed by many research groups (for a review see Flaus and Owen-Hughes [2003]). The reversibility with which the RSC complex acts is especially interesting in this respect, as it would provide a means by which distortions could be generated that might assist the traversing of an energetically unfavorable intermediate conformation. The subsequent reversal in orientation would enable DNA to be returned to its original state, perhaps restoring a more canonical nucleosome structure at a different location along a DNA fragment. Given that the shortening of DNA by RSC is sensitive to the tension and torsion in the molecule, we would anticipate that the size of distortions within a nucleosomal context may well differ from what we have

observed here. Although it will be fascinating to learn how different the action of the RSC complex is when it functions in a nucleosomal context, this may be technically difficult. It will, for example, be hard to guarantee that possible distortions of chromatin fragments result from the action of RSC complexes engaged with DNA on the surface of nucleosomes rather than on DNA adjacent to or between them. The observations we have made with RSC are likely to apply to other SWI/SNF-related complexes, as we have observed that recombinant BRG1 and Brm proteins, the catalytic subunits of human forms of the SWI/SNF complex, cause similar alterations to DNA (Figure S2).

Although in many cases the function of SWI/SNF complexes is closely tied to nucleosome remodeling, the possibility that they may have additional functions involving translocation along longer lengths of DNA should not be discounted. For example, the generation of non-B form DNA structures by SWI/SNF complexes may not require the presence of nucleosomes (Liu et al., 2001). Images have been obtained of SWI/SNF in association with a loop that contains several nucleosomes (Bazett-Jones et al., 1999). Some aspects of the pathway by which RSC distorts DNA are likely to be shared with other Snf2 family proteins. Of special interest in this respect is the ability of the RSC complex to reverse its translocation orientation with high probability. This potentially provides Snf2 motor proteins with multiple opportunities to reconfigure protein-DNA interactions in comparison to more processive translocases that might tend to stall on collision with a stable barrier. It will be interesting to investigate what features of RSC action are shared with other classes of Snf2-related proteins.

Experimental Procedures

Sample Preparation and Magnetic Trap Experimental Setup

A linear DNA fragment (~3.6 kbp) was obtained with KpnI and SacI restrictions of plasmid pSA580 (gift of Sankar Adhya). Two "tails" were synthesized with biotin or digoxigenin-labeled nucleotides by PCR of the multiple cloning site of a pBS plasmid comprising the restriction sites for KpnI and SacI. After restriction of these labeled tails, they were ligated to the complementary ends of the linear fragment. These DNA molecules were then attached at one end to the glass surface of a microscope flow chamber (previously coated with anti-digoxigenin) and at the other end to a 1 μm paramagnetic bead (DYNAL MyOne beads coated with streptavidin). Small magnets (Strick et al., 1998) were used to twist and pull on single DNA molecules attached to the beads. The DNA's extension was monitored by video microscopy of the tethered bead (Gosse and Croquette, 2002). By tracking its 3D position (Gosse and Croquette, 2002; Strick et al., 1996), the extension $l = \langle z \rangle$ of the molecule can be measured, with an error of ~10 nm with 1 s averaging. The horizontal motion of the bead $\langle \delta x^2 \rangle$ allows for the determination of the stretching force via the equipartition theorem $F = k_B T / \langle \delta x^2 \rangle$. F was measured with 10% accuracy. To eliminate microscope drift, differential tracking was performed via a second bead glued to the surface. All experiments were performed in the reaction buffer (RB) 50 mM KCl, 10 mM HEPES (pH 7.8), 3 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT, and 60 μM BSA. RSC, BRG1, and Brm were purified as previously described (Saha et al., 2002; Phelan et al., 1999).

Data Processing

The determination of the change in extension of a DNA molecule δl_n due to its interaction with RSC as well as the measurement of τ_{on} and τ_{off} requires the recording and processing of the elongation versus time signal $l(t)$. Each burst of activity is fitted to a polygon defined by its six vertices: l_i, t_i ($i = 1, \dots, 6$), see Figure 1C. Of the polygon's five

segments, three are set to be horizontal ones (segments 1, 3, and 5) and we further require $l_1 = l_2 = l_5 = l_6$. Segments 1 and 3 are followed by a shortening (or lengthening) event (segments 2 and 4). The coordinates of the polygon vertices were adjusted to minimize the fitting error (χ^2 test) (Maier et al., 2000). The decrease in extension is, $\delta l_n = l_3 - l_2 = l_4 - l_5$; the on time, $\tau_{on} = t_3 - t_2$; and the off time: $\tau_{off} = t_5 - t_4$. The change in extension δl_n can be given in base pairs by the formula $\delta l_n (bp) = N_0 \delta l_n (nm) / l_n (F)$, where $l_n (F)$ is the extension at force F of a DNA molecule of N_0 bps (measured or computed from the Worm-like Chain model [Strick et al., 2003]).

AFM

A 891 bp linear DNA was synthesized by PCR amplification of a segment of the plasmid pOid-01 (gift of Sankar Adhya). It was purified with a Qiagen PCR purification kit. About 100 ng of this DNA was incubated for 8 min with equimolar amounts of RSC complex in RB (without BSA and with or without ATP). After incubation, 10–20 μl were deposited at room temperature for 2–3 min on freshly cleaved mica (Ted Pella Inc., Redding, California) coated with poly-L-ornithine (MW 49,000 Sigma St. Louis, MO). The mica was then gently washed with 1 ml of ddH₂O (Sigma) and subsequently dried with nitrogen. The sample was imaged in air with a NanoScope III (Digital Instruments) atomic force microscope operating in tapping mode. The AFM images were analyzed with the Open source program ImageJ to determine the DNA contour length and RSC diameter and with the program WSxM (Nanotech, Inc.) to determine the height of the complex.

Topoisomerase Assays

Assays were performed in 40 μl of RB (without DTT and BSA). Where indicated, Mg:ATP was present at 1 mM. Reactions contained 40 ng relaxed pUC18 DNA, topoisomerase, and RSC as indicated. One unit of recombinant vaccinia topoisomerase IB or *E. coli* topoisomerase IA was included in reactions as indicated (1 U defined as the amount of enzyme required to relax 20 ng supercoiled pUC18 DNA in 2 min under the reaction conditions described above). Reactions were terminated by addition of 10 μl 50 mM Tris (pH 7.5), 3% SDS, 100 mM EDTA, and 100 μg/ml Proteinase K and incubated for 1 hr at room temperature. Products were resolved by electrophoresis on 1% agarose TBE gels with or without chloroquine (1 μg/ml) as indicated. DNA was detected by a scanning fluorimeter after staining with Sybr gold (Molecular Probes). For gel shift analysis, reactions performed in the absence of topoisomerase were loaded directly onto 0.3 × TBE 1% agarose gels at 4°C.

Supplemental Data

Supplemental Data include three figures and can be found with this article online at <http://www.molecule.org/cgi/content/full/21/3/417/DC1/>.

Acknowledgments

We would like to thank A. Sankar for providing some of the plasmids used in these experiments, C. Bustamante and B. Cairns for communicating to us results of a similar and complementary study on the action of RSC on stretched reconstituted chromatin, and K.C. Neuman, O.A. Saleh, J.F. Allemand, and L. Finzi for fruitful discussions. G.L. was funded by grants from the French Ministry of Foreign Affairs and the Association pour la Recherche sur le Cancer. D.D. acknowledges support from the Italian Ministry of Instruction, Universities and Research. H.F., C.S., and T.O.-H. acknowledge support from the Wellcome Trust. Finally, D.B. and V.C. acknowledge support from the CNRS, the ARC, and the European Union (MolSwitch grant).

Received: October 19, 2005

Revised: December 5, 2005

Accepted: December 13, 2005

Published: February 2, 2006

References

Bazett-Jones, D., Cote, J., Landel, C., Peterson, C., and Workman, J. (1999). The SWI/SNF complex creates loop domains in DNA and polynucleosome arrays and can disrupt DNA-histone contacts within these domains. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1470–1478.

- Becker, P., and Horz, W. (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 247–273.
- Beerens, N., Hoesjmakers, J., Kanaar, R., Vermeulen, W., and Wyman, C. (2005). The CSB protein actively wraps DNA. *J. Biol. Chem.* **280**, 4722–4729.
- Cairns, B., Lorch, Y., Li, Y., Zhang, M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Du, J., Laurent, B., and Kornberg, R. (1996). RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell* **87**, 1249–1260.
- Charvin, G., Allemand, J., Strick, T., Bensimon, D., and Croquette, V. (2004). Twisting DNA: single molecule studies. *Contemp. Phys.* **45**, 383–403.
- Dawid, A., Croquette, V., Grigoriev, M., and Heslot, F. (2004). Single-molecule study of RuvAB-mediated Holliday-junction migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 11611–11616.
- Dessinges, M., Lionnet, T., Xi, X., Bensimon, D., and Croquette, V. (2004). Single-molecule assay reveals strand switching and enhanced processivity of UvrD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 6439–6444.
- Firman, K., and Szczelkun, M. (2000). Measuring motion on DNA by the type I restriction endonuclease EcoR124I using triplex displacement. *EMBO J.* **19**, 2094–2102.
- Flaus, A., and Owen-Hughes, T. (2003). Mechanisms for nucleosome mobilization. *Biopolymers* **68**, 563–578.
- Fyodorov, D., and Kadonaga, J. (2002). Dynamics of ATP-dependent chromatin assembly by ACF. *Nature* **418**, 897–900.
- Gosse, C., and Croquette, V. (2002). Magnetic tweezers: micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophys. J.* **82**, 3314–3329.
- Havas, K., Flaus, A., Phelan, M., Kingston, R., Wade, P., Lilley, D., and Owen-Hughes, T. (2000). Generation of superhelical torsion by ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Cell* **103**, 1133–1142.
- Jaskelioff, M., Van Komen, S., Krebs, J., Sung, P., and Peterson, C. (2003). Rad54p is a chromatin remodeling enzyme required for heteroduplex DNA joint formation with chromatin. *J. Biol. Chem.* **278**, 9212–9218.
- Liu, R., Liu, H., Chen, X., Kirby, M., Brown, P., and Zhao, K. (2001). Regulation of CSF1 promoter by the SWI/SNF-like BAF complex. *Cell* **106**, 309–318.
- Maier, B., Bensimon, D., and Croquette, V. (2000). Replication by a single DNA polymerase of a stretched single-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 12002–12007.
- Phelan, M., Sif, S., Narlikar, G., and Kingston, R. (1999). Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits. *Mol. Cell* **3**, 247–253.
- Saha, A., Wittmeyer, J., and Cairns, B. (2002). Chromatin remodeling by RSC involves ATP-dependent DNA translocation. *Genes Dev.* **16**, 2120–2134.
- Saleh, O., Peral, C., Barre, F., and Allemand, J. (2004). Fast, DNA-sequence independent translocation by FtsK in a single-molecule experiment. *EMBO J.* **23**, 2430–2439.
- Saleh, O., Bigot, S., Barre, F., and Allemand, J. (2005). Analysis of DNA supercoil induction by FtsK indicates translocation without groove-tracking. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 436–440.
- Seidel, R., van Noort, J., van der Scheer, C., Bloom, J., Dekker, N., Dutta, C., Blundell, A., Robinson, T., Firman, K., and Dekker, C. (2004). Real-time observation of DNA translocation by the type I restriction modification enzyme EcoR124I. *Nat. Struct. Biol.* **11**, 838–843.
- Smith, C., Horowitz-Scherer, R., Flanagan, J., Woodcock, C., and Peterson, C. (2003). Structural analysis of yeast SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 141–145.
- Strick, T., Allemand, J., Bensimon, D., Bensimon, A., and Croquette, V. (1996). The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science* **271**, 1835–1837.
- Strick, T., Allemand, J., Bensimon, D., and Croquette, V. (1998). Behavior of supercoiled DNA. *Biophys. J.* **74**, 2016–2028.
- Strick, T., Croquette, V., and Bensimon, D. (2000). Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type II topoisomerase. *Nature* **404**, 901–904.
- Strick, T., Dessinges, M., Charvin, G., Dekker, N., Allemand, J., Bensimon, D., and Croquette, V. (2003). Stretching of macromolecules and proteins. *Rep. Prog. Phys.* **66**, 1–45.
- Sukhodolets, M., Cabrera, J., Zhi, H., and Jin, D. (2001). RapA, a bacterial homolog of SWI2/SNF2, stimulates RNA polymerase recycling in transcription. *Genes Dev.* **15**, 3330–3341.
- Van Komen, S., Petukhova, G., Sigurdsson, S., Stratton, S., and Sung, P. (2000). Superhelicity-driven homologous DNA pairing by yeast recombination factors Rad51 and Rad54. *Mol. Cell* **6**, 563–572.
- Whitehouse, I., Stockdale, C., Flaus, A., Szczelkun, M., and Owen-Hughes, T. (2003). Evidence for DNA translocation by the ISWI chromatin-remodeling enzyme. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1935–1945.

Annexe C

Protocoles spécifiques à la chromatine

C.1 Les plasmides pGEM3Z et pGEM3Z-mod

La figure C.1 donne une illustration de la structure du plasmide commercial pGEM3z et du plasmide dans lequel a été inséré la séquence positionnante 601.

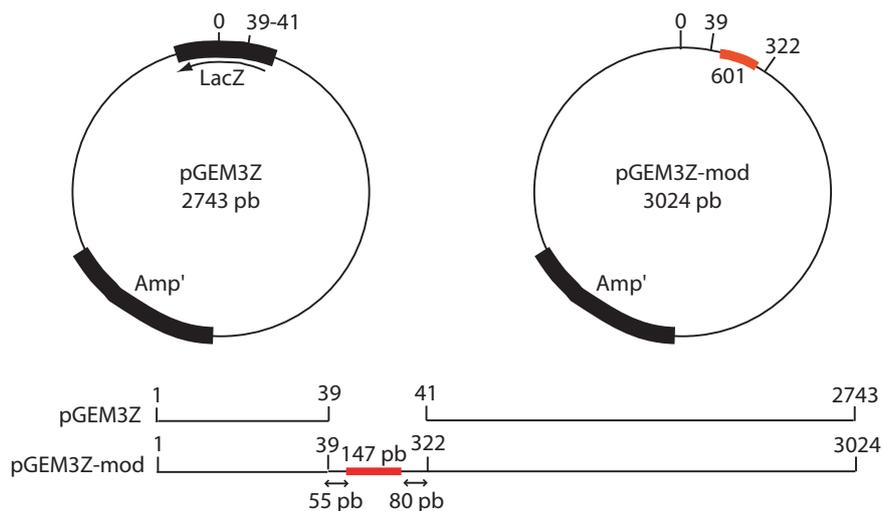


FIGURE C.1 – (en haut) Représentation schématique des plasmides pGEM3Z (2743 pb) et pGEM3Z-mod (3024pb). (en bas) Alignement de leur séquence : la seule différence consiste en l'insertion, dans pGEM3Z-mod, de 282 pb contenant les 147 pb de la séquence positionnante 601.

On rappelle ici la séquence du plasmide pGEM3Z-mod : on a mis en gras la séquence 601 de 147 pb.

ggg cga att cga gct cgg tac cgg ggg atc ctc tag agt ggg agc teg gaa cac tat cgg act ggc acc ggc aag gtc
gct gtt caa tac atg **cac agg atg tat ata tct gac acg tgc ctg gag act agg gag taa tcc cct tgg cgg**
tta aaa cgc ggg gga cag cgc gta cgt gcg ttt aag cgg tgc tag agc tgt cta cga cca att gag cgg
cct cgg cac cgg gat tct cca ggg cgg cgg cgt ata ggg tcc atc aca taa ggg atg aac teg gtg tga aga atc atg
ctt tcc ttg gtc att agg atc cgg gac ctg cag gca tgc aag ctt gag tat tct ata gtg tca cct aaa tag ctt ggc gta
atc atg gtc ata gct gtt tcc tgt gtg aaa ttg tta tcc gct cac aat tcc aca caa cat acg agc cgg aag cat aaa gtg

taa agc ctg ggg tgc cta atg agt gag cta act cac att aat tgc gtt gcg ctc act gcc cgc ttt cca gtc ggg aaa cct
 gtc gtg cca gct gca tta atg aat cgg cca acg cgc ggg gag agg cgg ttt gcg tat tgg gcg ctc ttc cgc ttc ctc gct
 cac tga ctc gct gcg ctc ggt cgt tgc gct gcg gcg agc ggt atc agc tca ctc aaa ggc ggt aat acg gtt atc cac aga
 atc agg gga taa cgc agg aaa gaa cat gtg agc aaa agg cca gca aaa ggc cag gaa ccg taa aaa ggc cgc gtt gct
 ggc gtt ttt cca tag gct cgg ccc ccc tga cga gca tca caa aaa tgc acg ctc aag tca gag gtg gcg aaa ccc gac agg
 act ata aag ata cca ggc gtt tcc ccc tgg aag ctc cct cgt gcg ctc tcc tgt tcc gac cct gcc gct tac cgg ata cct
 gtc cgc ctt tct ccc ttc ggg aag cgt ggc gct ttc tca tag ctc acg ctg tag gta tct cag ttc ggt gta ggt cgt tgc
 ctc caa gct ggg ctg tgt gca cga acc ccc cgt tca gcc cga ccg ctg cgc ctt atc cgg taa cta tgc tct tga gtc caa
 ccc ggt aag aca cga ctt atc gcc act ggc agc agc cac tgg taa cag gat tag cag agc gag gta tgt agg cgg tgc tac
 aga gtt ctt gaa gtg gtg gcc taa cta cgg cta cac tag aag aac agt att tgg tat ctg cgc tct gct gaa gcc agt tac
 ctt cgg aaa aag agt tgg tag ctc ttg atc cgg caa aca aac cac cgc tgg tag cgg tgg ttt ttt tgt ttg caa gca gca
 gat tac gcg cag aaa aaa agg atc tca aga aga tcc ttt gat ctt ttc tac ggg gtc tga cgc tca gtg gaa cga aaa ctc
 acg tta agg gat ttt ggt cat gag att atc aaa aag gat ctt cac cta gat cct ttt aaa tta aaa atg aag ttt taa atc
 aat cta aag tat ata tga gta aac ttg gtc tga cag tta cca atg ctt aat cag tga ggc acc tat ctc agc gat ctg tct
 att tgc ttc atc cat agt tgc ctg act ccc cgt cgt gta gat aac tac gat acg gga ggg ctt acc atc tgg ccc cag tgc
 tgc aat gat acc gcg aga ccc acg ctc acc ggc tcc aga ttt atc agc aat aaa cca gcc agc cgg aag ggc cga gcg cag
 aag tgg tcc tgc aac ttt atc cgc ctc cat cca gtc tat taa ttg ttg ccg gga agc tag agt aag tag ttc gcc agt taa
 tag ttt gcg caa cgt tgt tgc cat tgc tac agg cat cgt ggt gtc acg ctc gtc gtt tgg tat ggc ttc att cag ctc cgg ttc
 cca acg atc aag gcg agt tac atg atc ccc cat gtt gtg caa aaa agc ggt tag ctc ctt cgg tcc tcc gat cgt tgt cag
 aag taa gtt ggc cgc agt gtt atc act cat ggt tat ggc agc act gca taa ttc tct tac tgt cat gcc atc cgt aag atg
 ctt ttc tgt gac tgg tga gta ctc aac caa gtc att ctg aga ata gtg tat gcg gcg acc gag ttg ctc ttg ccc ggc gtc
 aat acg gga taa tac cgc gcc aca tag cag aac ttt aaa agt gct cat cat tgg aaa acg ttc ttc ggg gcg aaa act ctc
 aag gat ctt acc gct gtt gag atc cag ttc gat gta acc cac tgc tgc acc caa ctg atc ttc agc atc ttt tac ttt cac
 cag cgt ttc tgg gtg agc aaa aac agg aag gca aaa tgc cgc aaa aaa ggg aat aag ggc gac acg gaa atg ttg aat
 act cat act ctt cct ttt tca ata tta ttg aag cat tta tca ggg tta ttg tct cat gag cgg ata cat att tga atg tat tta
 gaa aaa taa aca aat agg ggt tcc gcg cac att tcc ccg aaa agt gcc acc tga cgt cta aga aac cat tat tat cat gac
 att aac cta taa aaa tag gcg tat cac gag gcc ctt tgc tct cgc gcg ttt cgg tga tga cgg tga aaa cct ctg aca cat
 gca gct ccc gga gac ggt cac agc ttg tct gta agc gga tgc cgg gag cag aca agc ccg tca ggg cgc gtc agc ggg tgt
 tgg cgg gtg tgc ggg ctg gct taa cta tgc ggc atc aga gca gat tgt act gag agt gca cca tat gcg gtg tga aat acc
 gca cag atg cgt aag gag aaa ata ccg cat cag gcg cca ttc gcc att cag gct gcg caa ctg ttg gga agg gcg atc ggt
 gcg ggc ctc ttc gct att acg cca gct ggc gaa agg ggg atg tgc tgc aag gcg att aag ttg ggt aac gcc agg gtt ttc
 cca gtc acg acg ttg taa aac gac ggc cag tga att gta ata cga ctc act ata.

C.2 Longs primers utilisés pour produire, en une étape, un fragment d'ADN avec la séquence 601 en son centre et des extrémités modifiées, pour sa manipulation ultérieure en pinces magnétiques.

C.2.1 Séquences des primers utilisés

Les deux amorces utilisées ont les séquences suivantes :

1. Amorce modifiée par des biotines (appelée Amorce-Bio) :

5' AAG GtA ACT GGC TtC AGC AGA GCG CAG AtA CCA AAT ACt GTT CTT CTA GtG TAG
 CCG TAG tTA G 3'

où t = dT-biotine.

2. Amorce modifiée par des digoxygénines (appelée Amorce-Dig) :

5' CCt CCA TCC AGT CtA TTA ATT GTt GCC GGG AAG CtA GAG TAA GTA GtT CGC CAG
 TTA AtA GTT TG 3'
 où t = dT-digoxygénine.

C.2.2 Protocole de l'amplification et construction d'ADN attendue

Le mélange utilisé pour la PCR est le suivant (on a fait des ajustements en jouant sur la concentration de plasmide pGEM3Z-mod, car on a été amené à utiliser différentes préparations de celui-ci, ayant donc des concentrations un peu variables) :

- 1 μL du plasmide pGEM3Z-mod (25 ng/ μL)
- 1 μL de l'Amorce-Bio (11 μM)
- 2 μL de l'Amorce-Dig (7 μM)
- 5 μL du tampon 10X de la Taq Polymerase
- 2 μL de MgCl_2 (25 mM)
- 1 μL de dNTP (10 mM chacun)
- 1 μL de la Taq Polymerase (Fermentas)
- 37 μL H_2O .

Les cycles de température utilisés sont les suivants :

1. 94°C pendant 2 min
- puis, 25 cycles de :
2. 95°C pendant 1 min
3. 69°C pendant 1 min
4. 72°C pendant 2 min
- enfin :
5. 72°C pendant 7 min.

La figure ci-dessous présente la construction attendue, après amplification :

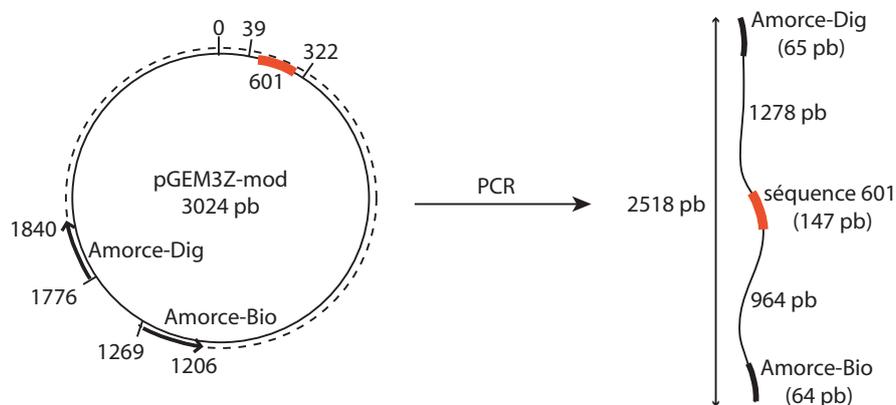


FIGURE C.2 – Construction attendue

La ligation à partir de ces longs fragments a marché mais son rendement n'a jamais été très bon. On a cependant eu suffisamment d'ADN ainsi produit pour faire nos essais.

C.3 Protocoles de reconstitution de fibres de chromatine

C.3.1 Protocole de reconstitution de fibres de chromatine par dialyses successives à partir d'histones purifiées

Le mélange de départ doit avoir des proportions proches de celles décrites ci-dessous ^a :

- 100 pmol d'ADN
 - 100 pmol d'octamères d'histones
 - 2M NaCl
 - 10 mM Tris-Cl pH ~ 7,5
- dans 40 μ L d'eau milliQ.

On conserve ce mélange sur la glace pendant 30 min.

On réalise les étapes de dialyse dans les tampons suivants, chaque étape durant 2 heures et étant effectuée à 4°C :

1. 0,85M NaCl + 10 mM Tris-Cl pH = 7,5
2. 0,65M NaCl + 10 mM Tris-Cl pH = 7,5
3. 0,50M NaCl + 10 mM Tris-Cl pH = 7,5

On termine par une dialyse, à 4°C, sur la nuit, dans le tampon suivant :

4. 0,1M NaCl + 10 mM Tris-Cl pH = 7,5.

C.3.2 Protocole de reconstitution de fibres de chromatine par dilutions successives à partir de particules de coeur

Le mélange de départ est le même que pour la reconstitution par dialyse :

- 100 pmol d'ADN
 - 100 pmol d'octamères d'histones
 - 2M NaCl
 - 10 mM Tris-Cl pH ~ 7,5
- dans 40 μ L d'eau milliQ.

On laisse ce mélange 10 min à 37°C. Puis on réalise, à température ambiante, 4 dilutions successives dans du TE (auquel on a ajouté de la BSA) pour atteindre les concentrations en NaCl suivantes : 1 M, 0.8 M, 0.6 M puis 0.4 M. On attend 20 min entre chacune de ces étapes de dilution. On dialyse le dernier échantillon à 0.4 M NaCl contre une solution de TE pendant 1h.

a. On joue sur le ratio entre les quantités d'ADN et d'histones introduites pour ajuster le nombre moyen de nucléosomes sur chaque fibre. On ne contrôle bien entendu pas exactement le nombre de nucléosomes que l'on incorpore sur les molécules d'ADN.

C.4 Construction du mononucléosome

C.4.1 Premier jeu de primers utilisés pour produire les cinq fragments d'ADN composant la construction mononucléosomale

Le nom utilisé pour les primers est le suivant : (nom du plasmide servant de support à la PCR)-(numéro de la base, sur le plasmide, où se positionne la première base en 5' du primer)-(Forward ou Reverse pour distinguer les deux primers formant un couple). On a souligné les bases composant le site de restriction des enzymes TspRI ou BbsI et les bases en gras représentent les mésappariements introduits dans les primers pour faire apparaître les sites de restriction en question. Les primers sont commandés chez eurofins, MWG GmbH, à une échelle de 0.01 μ mol, avec une purification de type HPSF dans un premier temps.

Fragment 1 (taille du fragment obtenu par PCR : 348 pb) :

pGEM3Z-mod-(24)-Forward : 5' - GGGGATCCTCGCCAGTGAGAGCT - 3'
(T_m = 67,8°C, longueur : 23 bp).

pGEM3Z-mod-(371)-Reverse : 5' - AGCTATTTAGGTGACACTGACGAATACTCAAGCTT - 3'
(T_m=67,1°C, longueur : 35 bp).

Fragment 2 (taille du fragment obtenu par PCR : 1144 pb) :

pSKp-(2448)-Forward : 5' - TCACTCATGGTTATGGCCTCACTGCCTTAA - 3'
(T_m=66,7°C, longueur : 29 bp).

pSKp-(630)-Reverse : 5' - TATTACGCGCGCTCACTGGCCGTC - 3'
(T_m = 67,8°C, longueur : 24 bp).

Fragment 3 (taille du fragment obtenu par PCR : 365 pb) :

pSA580-(1772)-Forward : 5' - ACTGCGGCCAACTTACTTCTGA - 3'
(T_m = 60,3°, longueur : 22 pb).

pSA580-(2136)-Reverse : 5' - TTACCATCTGGCGGCAGTGAGGCAAT - 3'
(T_m=66,4°C, longueur : 26 pb).

Fragment 4 (taille du fragment obtenu par PCR : 1108 pb) :

pSKp-(2466)-Forward : 5' - GCACTGCATAATTGTCTTCCTGTCATGCCAT - 3'
(T_m = 66,8°C, longueur : 31 pb).

pSKp-(612)-Reverse : 5' - GCCGTCGTTTTGTCAGTGTCGTGACT - 3'
(T_m=66,3°C, longueur : 25 pb).

Fragment 5 (taille du fragment obtenu par PCR : 486 pb) :

pSKp-(2015)-Forward : 5' - TCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCC - 3'
(T_m = 59.7°C, longueur : 25 bp).

pSKp-(2500)-Reverse : 5' - ACGGATGGCATGACAGGAAGACAATTAT - 3'
(T_m=63,7°C, longueur : 28 pb).

C.4.2 Protocole de PCR utilisé pour produire les cinq fragments d'ADN

Production des fragments 1, 2 et 4 :

- 30 ng du plasmide servant de substrat
- 0.25 μ L du primer Forward concerné (\sim 50 μ M)
- 0.25 μ L du primer Reverse associé (\sim 50 μ M)
- 2 μ L MgCl₂ (25 mM)
- 1 μ L dNTP (10 mM chacun)
- 1 μ L Taq Polymérase (E0402, Fermentas)
- 5 μ L Tampon 10X (Taq Buffer avec (NH₄)₂SO₄, Fermentas)
- complété à 50 μ L avec de l'eau.

Production du fragment 3 (biotinylé) :

- 30 ng du plasmide pSA580
- 0.25 μ L du primer Forward concerné (\sim 50 μ M)
- 0.25 μ L du primer Reverse associé (\sim 50 μ M)
- 2 μ L MgCl₂ (25 mM)
- 1 μ L dNTP (10 mM chacun)
- 2.5 μ L bio-16-dUTP
- 1 μ L Taq Polymérase (E0402, Fermentas)
- 5 μ L Tampon 10X (Taq Buffer avec (NH₄)₂SO₄, Fermentas)
- complété à 50 μ L avec de l'eau.

Production du fragment 5 (modifié par des digoxygénines) :

- 30 ng du plasmide pSA580
- 0.25 μ L du primer Forward concerné (\sim 50 μ M)
- 0.25 μ L du primer Reverse associé (\sim 50 μ M)
- 2 μ L MgCl₂ (25 mM)
- 1 μ L dNTP (10 mM chacun)
- 0.7 μ L dig-11-dUTP
- 1 μ L Taq Polymérase (E0402, Fermentas)
- 5 μ L Tampon 10X (Taq Buffer avec (NH₄)₂SO₄, Fermentas)
- complété à 50 μ L avec de l'eau.

Cycles de température :

94°C pendant 2 :00 min
puis 30 cycles de :
94°C pendant 0 :30 min
57°C pendant 0 :45 min

72°C pendant 2 :45 min
on maintient les échantillons à :
72°C pendant 7 :00
puis on les garde à 4°C.

C.4.3 Protocole de digestion utilisé pour les cinq fragments d'ADN

On digère les fragments d'ADN obtenus par PCR et resuspendus dans du TE.

Protocole de digestion pour les fragments 1, 2, 3 :

- ~ 17 μ L du fragment 1, 2 ou 3 resuspendu dans du TE
- 2 μ L Neb4 + BSA
- 1 μ L TspR I (10 000 U/mL)

incubation 2 heures à 65°C.

Protocole de digestion pour le fragment 4 :

- ~ 17 μ L du fragment 4 resuspendu dans du TE
- 2 μ L Neb4 + BSA
- 1 μ L TspR I (10 000 U/mL)
- 1 μ L Bbs I (5 000 U/mL)

incubation 2 heures à 37°C puis 25 min à 65°C.

Protocole de digestion pour le fragment 5 :

- ~ 17 μ L du fragment 5 resuspendu dans du TE
- 2 μ L Neb2
- 1 μ L Bbs I (5 000 U/mL)

incubation 2 heures à 37°C puis 25 min à 65°C.

C.5 Nouveau jeu de primers maximisant le nombre de mésappariements entre eux

Fragment 1 (taille du fragment obtenu par PCR : 348 pb) :

pGEM3Z-mod-(24)-Forward : 5' - GGGGATCCTCGCCAGTGAGAGCT - 3'

pGEM3Z-mod-(371)-Reverse : 5' - AGCTATTTAGGTAAACAGTGCAGAATACTCAAGCTT - 3'

Fragment 2 (taille du fragment obtenu par PCR : 1144 pb) :

pSKp-(2448)-Forward : 5' - TCACTCATGGTTATGGCTTACAGTGGTTAA - 3'

pSKp-(630)-Reverse : 5' - TATTACGCGCGCTCACTGGCCGTC - 3'

Fragment 3 (taille du fragment obtenu par PCR : 365 pb) :

pSA580-(1772)-Forward : 5' - ACTGCGGCCAACTTACTTCTGA - 3'

pSA580-(2136)-Reverse : 5' - TTACCATCTGGCACCACTGTAGCAAT - 3'

Fragment 4 (taille du fragment obtenu par PCR : 1108 pb) :

pSKp-(2466)-Forward : 5' - GCACTGCATAATTGTCTTCCTGTCATGCCAT - 3'

pSKp-(612)-Reverse : 5' - GCCGTCGTTTTGCACTGTTGTGACT - 3'

Fragment 5 (taille du fragment obtenu par PCR : 486 pb) :

pSKp-(2015)-Forward : 5' - TCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCC - 3'

pSKp-(2500)-Reverse : 5' - ACGGATGGCATGACAGGAAGACAATTAT - 3'

On représente schématiquement les cinq fragments d'ADN obtenus par amplification à partir de ces primers puis digestion par TspRI et BbsI :

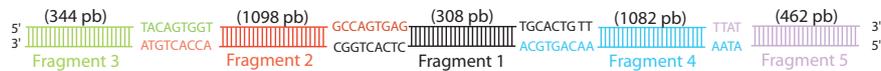


FIGURE C.3 – Représentation des extrémités cohésives et complémentaires de chacun des fragments obtenus à la suite de la digestion.

Tableau récapitulatif, pour chaque couple de fragments pouvant potentiellement interagir par leur site de restriction à TspRI, le nombre de mésappariements entre leur site :

		Fragment (1)		Fragment (2)		Fragment (3)	Fragment (4)
		CTCACTGGC	TGCACTGTT	ACCACTGTA	GCCAGTGAG	TACAGTGGT	AACAGTGCA
(1)	CTCACTGGC	5	5	4	0	4	4
	TGCACTGTT	5	5	3	4	3	0
(2)	ACCACTGTA	4	3	5	4	0	3
	GCCAGTGAG	0	4	4	5	4	5
(3)	TACAGTGGT	4	3	0	4	5	3
(4)	AACAGTGCA	4	0	3	5	3	5

Bibliographie

- 3rd Sims, R. J., Chen, C. F., Santos-Rosa, H., Kouzarides, T., Patel, S. S., and Reinberg, D. (2005). Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *J. Biol. Chem.*, 280 :41789–41792.
- Aasland, R., Stewart, A. F., and Gibson, T. (1996). The SANT domain : a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIB. *Trends Biochem. Sci.*, 21(3) :87–88.
- Abbondanzieri, E. A., Greenleaf, W. J., Shaevitz, J. W., Landick, R., and Block, S. M. (2005). Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase. *Nature*, 438(7067) :460–465.
- Alexeev, A., Mazin, A., and Kowalczykowski, S. C. (2003). Rad54 protein possesses chromatin-remodeling activity stimulated by the rad51-ssDNA nucleoprotein filament. *Nature Struct. Biol.*, 10 :182–186.
- Allemand, J.-F. (1997). Micro-manipulation de molécules d'ADN isolées. *Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie*.
- Allemand, J.-F., Bensimon, D., Lavery, R., and Croquette, V. (1998). Stretched and overwound DNA forms a pauling-like structure with exposed bases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 :14152–1157.
- Allfrey, V. G., Faulkner, R., and Mirsky, A. E. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 51 :786–794.
- Angelov, D., Molla, A., Perche, P. Y., Hans, F., Cote, J., Khochbin, S., Bouvet, P., and Dimitrov, S. (2003). The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol. Cell.*, 11 :1033–1041.
- Angus-Hill, M. L., Schlichter, A., Roberts, D., Erdjument-Bromage, H., Temps, P., and Cairns, B. R. (2001). A Rsc30Rsc3 zinc cluster dimer reveals novel roles for chromatin remodeler RSC in gene expression and cell cycle control. *Mol. Cell.*, 7 :741–751.
- Aoyagi, S., Narlikar, G., Zheng, C., Sif, S., Kingston, R. E., and Hayes, J. J. (2002). Nucleosome remodeling by the human SWI/SNF complex requires transient global disruption of histone-DNA interactions. *Mol. Cell Biol.*, 22(11) :3653–3662.
- Aoyagi, S., Wade, P. A., and Hayes, J. J. (2003). Nucleosome sliding induced by the xMi-2 complex does not occur exclusively via a simple twist-diffusion mechanism. *J. Biol. Chem.*, 278(33) :30562–30568.
- Aravind, L. and Landsman, D. (1998). AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA binding proteins. *Nucleic Acids Res.*, 26 :4413–4421.
- Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B.-C., and Love, W. E. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution : A tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 :10148–10152.
- Arents, G. and Moudrianakis, E. (1993). Topography of the histone octamer surface : repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 :10489–10493.
- Asturias, F. J., Chung, W.-H., Kornberg, R. D., and Lorch, Y. (2002). Structural analysis of the RSC chromatin-remodeling complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(21) :13477–13480.
- Badenhorst, P., Voas, M., Rebay, I., and Wu, C. (2002). Biological functions of the ISWI chromatin remodeling complex NURF. *Genes Dev.*, 16 :3186–3198.

BIBLIOGRAPHIE

- Badenhorst, P., Xiao, H., Cherbas, L., Kwon, S. Y., Voas, M., Rebay, I., Cherbas, P., and Wu, C. (2005). The drosophila nucleosome remodeling factor NURF is required for ecdysteroid signaling and metamorphosis. *Genes Dev.*, 19(21) :2540–2545.
- Baetz, K. K., Krogan, N. J., Emili, A., Greenblatt, J., and Hieter, P. (2004). The ctf13-30/CTF13 genomic haploinsufficiency modifier screen identifies the yeast chromatin remodeling complex RSC, which is required for the establishment of sister chromatid cohesion. *Mol. Cell. Biol.*, 24 :1232–1244.
- Bancaud, A., e Silva, N. C., Barbi, M., Wagner, G., Allemand, J.-F., Mozziconacci, J., Lavelle, C., Croquette, V., Victor, J.-M., Prunell, A., and Viovy, J.-L. (2006). Structural plasticity of single chromatin fibers revealed by torsional manipulation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13(5) :444–450.
- Bancaud, A., Wagner, G., e Silva, N. C., Lavelle, C., Wong, H., Mozziconacci, J., Barbi, M., Sivolob, A., Cam, E. L., Mouawad, L., Viovy, J.-L., Victor, J.-M., and Prunell, A. (2007). Nucleosome chiral transition under positive torsional stress in single chromatin fibers. *Mol. Cell.*, 27(1) :135–147.
- Baumann, C. G., Smith, S. B., Bloomfield, V. A., and Bustamante, C. (1997). Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 :6185–6190.
- Becker, P. B. and Horz, W. (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annual Reviews in Biochemistry*, 71(1) :247–273.
- Bednar, J., Horowitz, R. A., Grigoryev, S. A., Carruthers, L. M., Hansen, J. C., Koster, A. J., and Woodcock, C. L. (1998). 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. USA*, 95 :14173–14178.
- Beloin, C., Jeusset, J., Revet, B., Mirambeau, G., Hegarat, F. L., and Cam, E. L. (2003). Contribution of DNA conformation and topology in right-handed DNA-wrapping by the *Bacillus subtilis* LrpC protein. *J. Biol. Chem.*, 278(7) :5333–5342.
- Ben-Haim, E., Lesne, A., and Victor, J. (2001). Chromatin : a tunable spring at work inside chromosomes. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.*, 64 :051921.
- Bennink, M. L., Leuba, S. H., Leno, G. H., Zlatanova, J., de Groot, B. G., and Greve, J. (2001). Unfolding individual nucleosomes by stretching single chromatin fibers with optical tweezers. *Nat. Struct. Biol.*, 8(7) :606–610.
- Bensimon, A., Simon, A., Chiffaudel, A., Croquette, V., Heslot, F., and Bensimon, D. (1994). Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. *Science*, 265 :2096–2098.
- Bensimon, D., Simon, A. J., Croquette, V., and Bensimon, A. (1995). Stretching DNA with a receding meniscus : Experiments and models. *Phys. Rev. Lett.*, 76 :4754–4757.
- Bernstein, E. and Hake, S. B. (2006). The nucleosome : a little variation goes a long way. *Biochem. Cell. Biol.*, 84 :505–517.
- Bianchi, M. E. and Agresti, A. (2005). HMG proteins : dynamics players in gene regulation and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 15(5) :496–506.
- Binnig, G., Quate, C. F., and Gerber, C. (1986). Atomic force microscope. *Phys. Rev. Letter*, 56(9) :930–933.
- Bouazoune, K. and Brehm, A. (2006). ATP-dependent chromatin remodeling complexes in *Drosophila*. *Chromosome Research*, 14 :433–449.
- Bouchiat, C. and Mezard, M. (1998). Elasticity model of a supercoiled DNA molecule. *Phys. Rev. Lett.*, 80 :1556–1559.
- Bouchiat, C., Wang, M. D., Allemand, J.-F., Strick, T., Block, S. M., and Croquette, V. (1999). Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements. *Biophysical Journal*, 76 :409–413.
- Boyer, L. A., Latek, R. R., and Peterson, C. L. (2004). The SANT domain : A unique histone-tail-binding module? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 5 :158–163.
- Brower-Toland, B., Wacker, D. A., Fulbright, R. M., Lis, J. T., Kraus, W. L., and Wang, M. (2005). Specific contributions of histone tails of nucleosomes acetylation to the mechanical stability of nucleosomes. *J. Mol. Biol.*, 346 :135–146.
- Brower-Toland, B. D., Smith, C. L., Yeh, R. C., Lis, J. T., Peterson, C. L., and Wang, M. D. (2002). Mechanical disruption of individual nucleosomes reveals a reversible multistage release of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(4) :1960–1965.

BIBLIOGRAPHIE

- Brulet, A., Boué, F., and Cotton, J.-P. (1996). About the experimental determination of the persistence length of wormlike chains of polystyrene. *J. Phys. II France*, 6 :885–891.
- Bruno, M., Flaus, A., Stockdale, C., Rencurel, C., Ferreira, H., and Owen-Hughes, T. (2003). Histone H2A/H2B dimer exchange by ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Mol. Cell.*, 12 :1599–1606.
- Bryant, Z., Stone, M. D., Gore, J., Smith, S. B., Cozzarelli, N. R., and Bustamante, C. (2003). Structural transitions and elasticity from torque measurements on DNA. *Nature*, 424(6946) :338–341.
- Bustamante, C., Chemla, Y. R., Forde, N. R., and Izhaky, D. (2004). Mechanical processes in biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.*, 73 :705–748.
- Bustamante, C., Marko, J. F., Siggia, E. D., and Smith, S. (1994). Entropic elasticity of lambda-phage DNA. *Science*, 265 :15991600.
- Bustin, M. and Reeves, R. (1996). High-mobility-group chromosomal proteins : architectural components that facilitate chromatin function. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 54 :35–100.
- Cairns, B. R. (2007). Chromatin remodeling : insights and intrigue from single-molecule studies. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 14(11) :989–996.
- Cairns, B. R., Kim, Y.-J., Sayre, M. H., Laurent, B. C., and Kornberg, R. D. (1994). A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, and SNF6 gene products isolated from yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91 :1950–1954.
- Cairns, B. R., Lorch, Y., Li, Y., Zhang, M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Du, J., Laurent, B., and Kornberg, R. D. (1996). RSC, an essential abundant chromatin-remodeling complex. *Cell*, 87 :1249–1260.
- Cairns, B. R., Schlichter, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Kornberg, R. D., and Winston, F. (1999). Two functionally distinct forms of the RSC nucleosome-remodeling complex, containing essential AT hook, BAH, and bromodomains. *Mol. Cell.*, 4(5) :715–723.
- Celedon, A., Nodelman, I. M., Wildt, B., Dewan, R., Searson, P., Wirtz, D., Bowman, G. D., and Sun, S. X. (2009). Magnetic tweezers measurement of single molecule torque. *Nano Letters*, 9(4) :1720–1725.
- Celeste, A., Difilippantonio, S., Difilippantonio, M. J., Fernandez-Capetillo, O., Pilch, D. R., and Sedelnikova, O. A. (2003). H2A.X haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. *Cell*, 114 :371–383.
- Chai, B., Huang, J., Cairns, B. R., and Laurent, B. C. (2005). Distinct roles for the RSC and SWI/SNF ATP-dependent chromatin remodelers in DNA double-strand break repair. *Genes Dev.*, 19(14) :1656–1661.
- Charvin, G. (2004). Etudes des topoisomérases de type II par micromanipulation d'ADN. *Thèse de doctorat délivrée par l'Université Paris 7*.
- Charvin, G., Bensimon, D., and Croquette, V. (2003). Single-molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-II topoisomerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(17) :9820–9825.
- Claudet, C., Angelov, D., Bouvet, P., Dimitrov, S., and Bednar, J. (2005). Histone octamer instability under single molecule experiment conditions. *J. Biol. Chem.*, 280(20) :19958–19965.
- Cluzel, P., Lebrun, A., Heller, C., Lavery, R., Viovy, J.-L., Chatenay, D., and Caron, F. (1996). DNA : an extensible molecule. *Science*, 271(5250) :792–794.
- Corona, D. F. V., Längst, G., Clapier, C. R., Bonte, E. J., Ferrari, S., Tamkun, J. W., and Becker, P. B. (1999). ISWI is an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Mol. Cell.*, 3 :239–245.
- Costanzi, C. and Pehrson, J. R. (1998). Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature*, 393 :599–601.
- Crisona, N. J., Strick, T. R., Bensimon, D., Croquette, V., and Cozzarelli, N. R. (2000). Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by E. Coli Topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements. *Gen. Dev.*, 14(22) :2881–2892.

BIBLIOGRAPHIE

- Côté, J., Quinn, J., Workman, J. L., and Peterson, C. L. (1994). Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science*, 265(5168) :53–60.
- Cui, Y. and Bustamante, C. (2000). Pulling a single chromatin fiber reveals the forces that maintain its higher-order structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(1) :127–132.
- Dawid, A., Croquette, V., Grigoriev, M., and Heslot, F. (2004). Single-molecule study of RuvAB-mediated holliday-junction migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(32) :11611–11616.
- Delmas, V., Stokes, D., and Perry, R. (1993). A mammalian DNA-binding protein that contains a chromodomain and an SNF2/SWI2-like helicase domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 :2414–2418.
- Dessinges, M.-N., Lionnet, T., Xi, X. G., Bensimon, D., and Croquette, V. (2004). Single-molecule assay reveals strand switching and enhanced processivity of UvrD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(17) :6439–6444.
- Dessinges, M. N., Maier, B., Zhang, Y., Peliti, M., Bensimon, D., and Croquette, V. (2002). Stretching single stranded DNA, a model polyelectrolyte. *Phys. Rev. Lett.*, 89(24) :248102–248106.
- Deuring, R., Fanti, L., and Armstrong, J. A. (2000). The ISWI chromatin-remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure *in vivo*. *Mol. Cell.*, 5 :355–365.
- Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., Aggarwal, A. K., and Zhou, M. M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, 399 :491–496.
- Dorigo, B., Schalch, T., Kulangara, A., Duda, S., Schroeder, R. R., and Richmond, T. J. (2004). Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science*, 306 :1571–1573.
- Doyen, C. M., An, W., Angelov, D., Bondarenko, V., Mietton, F., and Studitsky, V. M. (2006). Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A. *Mol. Cell. Biol.*, 26 :1156–1164.
- Eberharter, A., Vetter, I., Ferreira, R., and Becker, P. B. (2004). ACF1 improves the effectiveness of nucleosome mobilization by ISWI through PHD-histone contacts. *EMBO*, 23 :4029–4039.
- Eickbush, T. H. and Moudrianakis, E. N. (1978). The histone core complex : an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions. *Biochemistry*, 17(23) :4955–4964.
- Eisen, J. A., Sweder, K. S., and Hanawalt, P. C. (1995). Evolution of the SNF2 family of proteins : subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res*, 23 :2715–2723.
- Elgin, S. C. R. and Workman, L. (2000). Chromatin structure and gene expression. *Oxford University Press, Second Edition*.
- Essevaz-Roulet, B., Bockelmann, U., and Heslot, F. (1997). Mechanical separation of the complementary strands of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(22) :11935–11940.
- Evans, E. and Ritchie, K. (1997). Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys. J.*, 72(4) :1541–1555.
- Felsenfeld, G. and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature*, 421 :448–453.
- Finch, J. T. and Klug, A. (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73(6) :1897–1901.
- Fixman, M. and Kovac, J. (1973). Polymer conformational statistics III : Modified gaussian models of the stiff chains. *J. Chem. Phys.*, 58 :1564–1568.
- Flanagan, J. F., Mi, L. Z., Chruszcz, M., Cymborowski, M., Clines, K. L., Kim, Y., Minor, W., Rastinejad, F., and Khorasani-zadeh, S. (2005). Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature*, 438 :1181–1185.
- Flaus, A., Martin, D. M. A., Barton, G. J., and Owen-Hughes, T. (2006). Identification of multiple distinct snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucl. Acid. Res.*, 34(10) :2887–2905.
- Flaus, A. and Owen-Hughes, T. (2001). Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodeling. *Curr. Op. Gen. Dev.*, 11 :148–154.

BIBLIOGRAPHIE

- Flaus, A. and Owen-Hughes, T. (2003). Dynamics properties of nucleosomes during thermal and ATP-driven mobilization. *Mol. Cell. Biol.*, 23 :7767–7779.
- Florin, E. L., Moy, T., and Gaub, H. E. (1994). Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science*, 264(5157) :415–417.
- Forth, S., Deufel, C., Sheinin, M. Y., Daniels, B., Sethna, J. P., and Wang, M. D. (2008). Abrupt buckling transition observed during the plectoneme formation of individual DNA molecules. *Phys. Rev. Lett.*, 100 :148301.
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K., Iyer, N. G., Pérez-Rosado, A., Calvo, E., Lopez, J. A., Cano, A., Calasanz, M. J., Colomer, D., Piris, M. A., Ahn, N., Imhof, A., Caldas, C., Jenuwein, T., and Esteller, M. (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat. Genet.*, 37 :391–400.
- Fraga, M. F. and Esteller, M. (2005). Towards the human cancer epigenome : a first draft of histone modifications. *Cell Cycle*, 4 :1377–1381.
- Fusco, A. and Fedele, M. (2007). Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 7(12) :899–910.
- Fyodorov, D. V., Blower, M. D., Karpen, G. H., and Kadonaga, J. T. (2004). Acf1 confers unique activities to ACF/CHRAC and promotes the formation rather than disruption of chromatin *in vivo*. *Genes Dev.*, 18 :170–183.
- Fyodorov, D. V. and Kadonaga, J. T. (2002). Binding of Acf1 to DNA involves a WAC motif and is important for ACF-mediated chromatin assembly. *Mol. Cell Biol.*, 22 :6344–6353.
- Gangaraju, V. K. and Bartholomew, B. (2007). Mechanisms of ATP dependent chromatin remodeling. *Mutation Research*, 618 :3–17.
- Godde, J. S., Nakatani, Y., and Wolffe, A. P. (1995). The amino-terminal tails of the core histones and the translational position of the TATA box determine TBP/TFIIA association with nucleosomal DNA. *Nucl. Acids Res.*, 23 :4557–4564.
- Godde, J. S. and Ura, K. (2008). Cracking the enigmatic linker histone code. *J. Biochem.*, 143(3) :287–293.
- Goldmark, J. P., Fazzio, T. G., Estep, P. W., Church, G. M., and Tsukiyama, T. (2000). The Isw2 chromatin remodeling complex represses early meiotic genes upon recruitment by Ume6p. *Cell*, 103 :423–433.
- Gorbalenya, A. E. and Koonin, E. V. (1993). Helicases : amino acid sequence comparisons and structure-function relationship. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3 :419–429.
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P., and Blinov, V. M. (1988). A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Lett.*, 235 :16–24.
- Gosse, C. and Croquette, V. (2002). Magnetic tweezers : micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophys. J.*, 82(6) :3314–3329.
- Gottesfeld, J. M. and Luger, K. (2001). Energetics and affinity of the histone octamer for defined DNA sequences. *Biochemistry*, 40 :10927–10933.
- Hall, J. A. and Georgel, P. T. (2007). CHD proteins : a diverse family with strong ties. *Biochem. Cell Biol.*, 85 :463–476.
- Hamiche, A., Sandaltzopoulos, R., Gdula, D. A., and Wu, C. (1999). ATP-dependent histone octamer sliding mediated by the chromatin remodeling complex NURF. *Cell*, 97 :833–842.
- Harp, J. M., Timm, B. L., and Bunick, G. J. (2000). Asymmetries in the nucleosome core particle at 2.5 Å resolution. *Acta Crystallogr.*, D56 :1513–1534.
- Havas, K., Flaus, A., Phelan, M., Kingston, R., Wade, P. A., Lilley, D. M. J., and Owen-Hughes, T. (2000). Generation of superhelical torsion by ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Cell*, 103 :1133–1142.
- Hayes, J. J., Tullius, T. D., and Wolffe, A. P. (1990). The structure of DNA in a nucleosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 :7405–7409.

BIBLIOGRAPHIE

- Heswish, D. R. and Burgoyne, L. A. (1973). Chromatine sub-structure. the digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 52 :504–510.
- Hofmann, M., Eggeling, C., Jakobs, S., and Hell, S. W. (2005). Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low intensities by using reversibly photoswitchable proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102(49) :17565–17569.
- Hogan, C. and Varga-Weisz, P. (2007). The regulation of ATP-dependent nucleosome remodelling factors. *Mut. Res.*, 618 :41–51.
- Horn, P. J. and Peterson, C. L. (2002). Chromatin higher order folding–wrapping up transcription. *Science*, 297 :1824–1827.
- Huang, J., Hsu, J.-M., and Laurent, B. C. (2004). The RSC nucleosome-remodeling complex is required for cohesin's association with chromosome arms. *Mol. Cell.*, 13 :739–750.
- Huang, M., Qian, F., Hu, Y., Ang, C., Li, Z., and Wen, Z. (2002). Chromatin-remodelling factor BRG1 selectively activates a subset of interferon-alpha-inducible genes. *Nat. Cell. Biol.*, 4 :774–781.
- Imbalzano, A. N., Kwon, H., Green, M. R., and Kingston, R. E. (1994). Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature*, 370 :481–485.
- Imbalzano, A. N., Schnitzler, G. R., and Kingston, R. E. (1996). Nucleosome disruption by human SWI/SNF is maintained in the absence of continued ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.*, 271(34) :20726–20733.
- Ito, T., Bulger, M., Pazin, M. J., Kobayashi, R., and Kadonaga, J. T. (1997). ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell*, 90 :145–155.
- Jaskelioff, M., Gavin, I. M., Peterson, C. L., and Logie, C. (2000). SWI/SNF-mediated nucleosome remodeling : role of histone octamer mobility in the persistence of the remodeled state. *Mol. Cell. Biol.*, 20(9) :3058–3068.
- Jaskelioff, M., Komen, S. V., Krebs, J. E., Sung, P., and Peterson, C. L. (2003). Rad54p is a chromatin remodeling enzyme required for heteroduplex DNA joint formation with chromatin. *J. Biol. Chem.*, 278 :9212–9218.
- Jenuwein, T. and Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*, 293 :1074–1080.
- Kassabov, S. R., Zhang, B., Persinger, J., and Bartholomew, B. (2003). SWI/SNF unwraps, slides, and rewraps the nucleosome. *Mol. Cell.*, 11(2) :391–403.
- Kaufman, P. D. (1996). Nucleosome assembly : the CAF and the HAT. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8(3) :369–373.
- Kelley, D. E., Stokes, D. G., and Perry, R. P. (1999). CHD1 interacts with SSRP1 and depends on both its chromodomain and its ATPase/helicase-like domain for proper association with chromatin. *Chromosoma*, 108 :10–25.
- Kepert, J. F., Toth, K. F., Caudron, M., Mucke, N., Langowski, J., and Rippe, K. (2003). Conformation of reconstituted mononucleosomes and effect of linker histone H1 binding studied by scanning force microscopy. *Biophys. J.*, 85 :4012–4022.
- Khattak, S., Lee, B. R., Cho, S. H., Ahn, J., and Spoerel, N. A. (2002). Genetic characterization of Drosophila Mi-2 ATPase. *Gene*, 293 :107–114.
- Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome : From genomic organization to genomic regulation. *Cell*, 116 :259–272.
- Kingston, R. E. and Narlikar, G. J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Gen. Dev.*, 13 :2339–2352.
- Koch, S. J., Shundrovsky, A., Jantzen, B. C., and Wang, M. D. (2002). Probing protein-DNA interactions by unzipping a single DNA double helix. *Biophys. J.*, 83 :1098–1105.
- Koopmans, W. J. A., Brehm, A., Logie, C., Schmidt, T., and Noort, J. V. (2007). Single-pair FRET microscopy reveals mononucleosome dynamics. *J. Fluoresc.*, 17 :785–795.
- Kornberg, R. D. (1974). Chromatin structure : a repeating unit of histones and DNA. *Science*, 184 :868–871.
- Kornberg, R. D. and Lorch, Y. (1999). Twenty-Five Years of the Nucleosome, Fundamental Particle of the Eucaryote Chromosome. *Cell*, 98 :285–294.

BIBLIOGRAPHIE

- Kovac, J. and Crabb, C. C. (1982). Modified Gaussian model for rubber elasticity. 2 The wormlike chain. *Macromolecules*, 15 :537–541.
- Krebs, J. E., Fry, C. J., Samuels, M., and Peterson, C. L. (2000). Global role for chromatin remodeling enzymes in mitotic gene expression. *Cell*, 102 :587–598.
- Kuo, M. H., Brownell, J. E., Sobel, R. E., Ranalli, T. A., Cook, R. G., Edmondson, D. G., Roth, S. Y., and Allis, C. D. (1996). Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature*, 383(6597) :269–272.
- la Serna, I. L. D., Carlson, K. A., and Imbalzano, A. N. (2001). Mammalian SWI/SNF complexes promote MyoD-mediated muscle differentiation. *Nat. Genet.*, 27 :187–190.
- Ladoux, B., Quivy, J.-P., Doyle, P., du Roure, O., Almouzni, G., and Viovy, J.-L. (2000). Fast kinetics of chromatin assembly revealed by single-molecule videomicroscopy and scanning force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(26) :14251–14256.
- Langst, G. and Becker, P. B. (2001). Nucleosome mobilization and positioning by ISWI-containing chromatin-remodeling factors. *J. Cell. Sci.*, 114 :2561–2568.
- Langst, G., Bonte, E. J., Corona, D. F., and Becker, P. B. (1999). Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans-displacement of the histone octamer. *Cell*, 97 :843–852.
- Leger, J. F., Robert, J., Bourdieu, L., Chatenay, D., and Marko, J. F. (1998). RecA binding to a single double-stranded DNA molecule : a possible role of DNA conformational fluctuations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(21) :12295–12299.
- LeRoy, G., Loyola, A., Lane, W. S., and Reinberg, D. (2000). Purification and characterization of a human factor that assembles and remodels chromatin. *J. Biol. Chem.*, 275 :14787–14790.
- LeRoy, G., Orphanides, G., Lane, W. S., and Reinberg, D. (1998). Requirement of RSF and FACT for transcription of chromatin templates in vitro. *Science*, 282 :1900–1904.
- Leschziner, A. E., Saha, A., Wittmeyer, J., Zhang, Y., Bustamante, C., Cairns, B. R., and Nogales, E. (2007). Conformational flexibility in the chromatin remodeler RSC observed by electron microscopy and the orthogonal tilt reconstruction method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(12) :4913–4918.
- Leuba, S. H., Yang, G., Robert, C., Samori, B., Holde, K. V., Zlatanova, J., and Bustamante, C. (1994). Three-dimensional structure of extended chromatin fibers as revealed by tapping-mode scanning force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91 :11621–11625.
- Li, G., Levitus, M., Bustamante, C., and Widom, J. (2005). Rapide spontaneous accessibility of nucleosomal DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12(1) :46–53.
- Lia, G. (2005). Etude du mécanisme d'action des facteurs de remodelage de la chromatine par micromanipulation et visualisation de l'ADN. *Thèse de doctorat délivrée par l'Université Paris 7*.
- Lia, G., Bensimon, D., Croquette, V., Allemand, J.-F., Dunlap, D., Lewis, D. E. A., Adhya, S., and Finzi, L. (2003). Supercoiling and denaturation in Gal repressor/heat unstable nucleoid protein (HU)-mediated DNA looping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(20) :11373–11377.
- Lia, G., Indrieri, M., Owen-Hughes, T., Finzi, L., Podesta, A., Milani, P., and Dunlap, D. (2008). ATP-dependent looping of DNA by ISWI. *J. Biophotonics*, 1(4) :280–286.
- Lia, G., Praly, E., Ferreira, H., Stockdale, C., Tse-Dinh, Y. C., Dunlap, D., Croquette, V., Bensimon, D., and Owen-Hughes, T. (2006). Direct observation of DNA distortion by the RSC complex. *Mol Cell.*, 21(3) :559–556.
- Lionnet, T. (2006). Mécanique de l'ADN et étude des hélicases en molécule unique. *Thèse de doctorat délivrée par l'Université Paris 6*.
- Lionnet, T., Spiering, M. M., Benkovic, S. J., Bensimon, D., and Croquette, V. (2007). Real-time observation of bacteriophage T4 gp41 helicase reveals an unwinding mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(50) :19790–19795.
- Liu, L. and Wang, J. (1987). Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 :7024–7027.

BIBLIOGRAPHIE

- Lorch, Y., Cairns, B. R., Zhang, M., and Kornberg, R. D. (1998). Activated RSC-nucleosome complex and persistently altered form of the nucleosome. *Cell*, 94(1) :29–34.
- Lorch, Y. and Kornberg, R. D. (2004). Isolation and assay of the RSC chromatin-remodeling complex from *Saccharomyces Cerevisiae*. *Methods Enzymol.*, 377 :316–322.
- Lorch, Y., Zhang, M., and Kornberg, R. D. (1999). Histone octamer transfert by a chromatin-remodeling complex. *Cell*, 96 :389–392.
- Lorch, Y., Zhang, M., and Kornberg, R. D. (2001). RSC unravels the nucleosome. *Mol. Cell.*, 7 :89–95.
- Lowary, P. T. and Widom, J. (1997). Nucleosome packaging and nucleosome positioning of genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(4) :1183–1188.
- Lowary, P. T. and Widom, J. (1998). New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. *J. Mol. Biol.*, 276(1) :19–42.
- Lucia, F. D., Alilat, M., Sivolob, A., and Prunell, A. (1999). Nucleosome dynamics. III. Histone tail-dependent fluctuation of nucleosomes between open and closed DNA conformations. Implications for chromatin dynamics and the linking number paradox. A relaxation study of mononucleosomes on DNA minicircles. *J. Mol. Biol.*, 285 :1101–1119.
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (1997a). Crystal structure of the nucleosome core particule at 2,8 Å resolution. *Nature*, 389 :251–260.
- Luger, K., Rechsteiner, T. J., Flaus, A. J., Wayne, M. M., and Richmond, T. J. (1997b). Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J. Mol. Biol.*, 272(3) :301–311.
- Luger, K., Rechsteiner, T. J., and Richmond, T. J. (1999). Preparation of nucleosome core particle from recombinant histones. *Methods. Enzymol.*, 304 :3–19.
- Luger, K. and Richmond, T. J. (1998a). DNA binding within the nucleosome core. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 8(1) :33–40.
- Luger, K. and Richmond, T. J. (1998b). The histone tails of the nucleosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 8 :140–146.
- Lusser, A., Urwin, D. L., and Kadonaga, J. T. (2005). Distinct activities of CHD1 and ACF in ATP-dependent chromatin assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12 :160–166.
- Mangeol, P., Côte, D., Bizebard, T., Legrand, O., and Bockelmann, U. (2006). Probing DNA and RNA single molecules with a double optical tweezer. *Eur. Phys. J. E*, 19(3) :311–317.
- Mantell, L. L., Parrish, W. R., and Ulloa, L. (2006). Hmgb-1 as a therapeutic target for infectious and inflammatory disorders. *Shock*, 25(1) :4–11.
- Marfella, C. G. A. and Imbalzano, A. N. (2007). The Chd family of chromatin remodelers. *Mutation Research*, 618 :30–40.
- Marko, J. and Siggia, E. (1995). Stretching DNA. *Macromolecules*, 28 :8759–8770.
- Marko, J. F. (2007). Torque and dynamics of linking number relaxation in stretched supercoiled DNA. *Phys. Rev. E*, 76(2) :021926.
- Marko, J. F. and Siggia, E. D. (1994). Fluctuations and supercoiling of DNA. *Science*, 265(5171) :506–508.
- Meneghini, M. D., Wu, M., and Madhani, H. D. (2003). Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell*, 112 :725–736.
- Mihardja, S., Spakowitz, A. J., Zhang, Y., and Bustamante, C. (2006). Effect of force on mononucleosomal dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(43) :15871–15876.
- Molloy, J. E. and Padgett, M. J. (2002). Lights, action : optical tweezers. *Contemporary Physics*, 43(4) :241–258.
- Montel, F. (2008). Dynamique à l'équilibre et hors-équilibre de la chromatine visualisée par microscopie à force atomique : effet des variants d'histone et des facteurs de remodelage. *Thèse de doctorat délivrée par l'Ecole Normale Supérieure de Lyon*.

BIBLIOGRAPHIE

- Montel, F., Fontaine, E., St-Jean, P., Castelnovo, M., and Faivre-Moskalenko, C. (2007). Atomic force microscopy imaging of SWI/SNF action : mapping the nucleosome remodeling and sliding. *Biophys. J.*, 93(2) :566–578.
- Moreira, J. M. and Holmberg, S. (1999). Transcriptional repression of the yeast *cha1* gene requires the chromatin-remodeling complex RSC. *EMBO*, 18 :28362844.
- Moreira, J. M. A. and Holmberg, S. (1998). Nucleosome structure of the yeast *CHA1* promoter : analysis of activation-dependent chromatin remodeling of an RNA-polymerase-II-transcribed gene in TBP and RNA pol II mutants defective *in vivo* in response to acidic activators. *EMBO J.*, 17(20) :6028–6038.
- Morillon, A., Karabetsov, N., O'Sullivan, J., Kent, N., Proudfoot, N., and Mellor, J. (2003). ISW1 chromatin remodeling ATPase coordinates transcription elongation and termination by RNA polymerase II. *Cell*, 115 :425–435.
- Moroz, J. D. and Nelson, P. (1997). Torsional directed walks, entropic elasticity, and DNA twist stiffness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 :14418–14422.
- Mosconi, F., Allemand, J.-F., Bensimon, D., and Croquette, V. (2009). Measurement of the torque on a single stretched and twisted DNA using magnetic tweezers. *Phys. Rev. Lett.*, 102(7) :078301.
- Muller, C. and Leutz, A. (2001). Chromatin remodeling in development and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 11 :167–174.
- Nakagawa, T., Bulger, M., Muramatsu, M., and Ito, T. (2001). 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) :27384–27391.
- Neely, K. E. and Workman, J. L. (2002). The complexity of chromatin remodeling and its links to cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1603 :19–29.
- Nelson, P. (2004). Biological physics. energy, information, life. *Freeman, New York*.
- Neuman, K. C. and Stock, S. M. (2004). Optical trapping. *Review of Scientific Instruments*, 75(9) :2787–2809.
- Okada, M. and Hirose, S. (1998). Chromatin remodeling mediated by drosophila GAGA factor and ISWI activates fushi tarazu gene transcription in vitro. *Mol. Cell. Biol.*, 18 :2455–2461.
- Olins, D. E. and Olins, A. L. (2003). Chromatin history : our view from the bridge. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.*, 4 :809–814.
- Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C. H., Luse, D. S., and Reinberg, D. (1998). FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell*, 92 :105–116.
- Oudet, P., Gross-Bellard, M., and Chambon, P. (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell*, 4(4) :281–300.
- Owen, D. J., Ornaghi, P., Yang, J. C., Lowe, N., Evans, P. R., Ballario, P., Neuhaus, D., Filetici, P., and Travers, A. A. (2000). The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *EMBO J.*, 19(22) :6141–6149.
- Owen-Hughes, T. and Workman, J. L. (1996). Remodeling the chromatin structure of a nucleosome array by transcription factor-targeted trans-displacement of histones. *EMBO*, 15 :4702–4712.
- Pankhurst, Q. A., Connolly, J., Jones, S. K., and Dobson, J. (2003). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Physics D-Applied Physics*, 36(13) :R167–R181.
- Pehrson, J. R. (1995). Probing the conformation of nucleosome linker DNA in situ with pyrimidine dimer formation. *J. Biol. Chem.*, 270 :22440–22444.
- Peterson, C. L., Dingwall, A., and Scott, M. P. (1994). Five SWI/SNF gene products are components of a large multisubunit complex required for transcriptional enhancement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(8) :2905–2908.
- Polach, K. J. and Widom, J. (1995). Mechanism of protein access to specific DNA sequences in chromatin : a dynamic equilibrium model for gene regulation. *J. Mol. Biol.*, 254 :130–149.

BIBLIOGRAPHIE

- Poot, R. A., Dellaire, G., Hulsmann, B. B., Grimaldi, M. A., Corona, D. F., Becker, P. B., Bickmore, W. A., and Varga-Weisz, P. D. (2000). HuCHRAC, a human ISWI chromatin remodelling complex contains hACF1 and two novel histone-fold proteins. *EMBO*, 19 :3377–3387.
- Pray-Grant, M. G., Daniel, J. A., Schieltz, D., 3rd Yates, J. R., and Grant, P. A. (2005). Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature*, 433 :434–438.
- Ramakrishnan, V., Finch, J. T., Granziano, V., Lee, P. L., and Sweet, R. M. (1993). Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature*, 362 :219–223.
- Reeves, R. and Adair, J. E. (2005). Role of high mobility group (HMG) chromatin proteins in DNA repair. *DNA Repair (Amst)*, 4(8) :926–938.
- Reif, F. (1965). Fundamentals of statistical and thermal physics. *McGraw-Hill, New York*.
- Reisman, D. N., Sciarrotta, J., Wang, W., Funkhouser, W. K., and Weissman, B. E. (2003). Loss of BRG1/BRM in human lung cancer cell lines and primary lung cancers : Correlation with poor prognosis. *Cancer Res.*, 63 :560–566.
- Richmond, T. J. and Davey, C. A. (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*, 423 :145–150.
- Robinson, P. J., Fairall, L., Huynh, V. A., and Rhodes, D. (2006). EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber : evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(17) :6506–6511.
- Saenger, W. (1988). Principle of nucleic acid structure. *Springer-Verlag*.
- Saha, A., Wittmeyer, J., and Cairns, B. R. (2002). Chromatin remodeling by RSC involves ATP-dependent translocation. *Gen. Dev.*, 16 :2120–2134.
- Saha, A., Wittmeyer, J., and Cairns, B. R. (2005). Chromatin remodeling through directional DNA translocation from an internal nucleosomal site. *Mol. Cell. Biol.*, 12(9) :747–755.
- Saha, A., Wittmeyer, J., and Cairns, B. R. (2006). Chromatin remodelling : the industrial revolution of DNA around histones. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 7(6) :437–447.
- Saleh, O. A., Péral, C., Barre, F.-X., and Allemand, J.-F. (2004). Fast, DNA-sequence independent translocation by FtsK in a single-molecule experiment. *EMBO*, 23(12) :2430–2439.
- Salma, N., Xiao, H., Mueller, E., and Imbalzano, A. N. (2004). Temporal recruitment of transcription factors and SWI/SNF chromatin-remodeling enzymes during adipogenic induction of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma nuclear hormone receptor. *Mol. Cell.*, 24 :4651–4663.
- Sarkar, A. and Marko, J. F. (2001). Removal of DNA-bound proteins by DNA twisting. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.*, 64 :061909.
- Schalch, T., Duda, S., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (2005). X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature*, 436 :138–141.
- Schiessel, H., Gelbart, W. M., and Bruinsma, R. (2001). DNA folding : structural and mechanical properties of the two-angle model for chromatin. *Biophys. J.*, 80 :1940–1956.
- Schnitzler, G., Sif, S., and Kingston, R. E. (1998). Human SWI/SNF interconverts a nucleosome between its base state and a stable remodeled state. *Cell*, 94(1) :17–27.
- Schnitzler, G. R., Cheung, C. L., Hafner, J. H., Saurin, A. J., Kingston, R. E., and Lieber, C. M. (2001). Direct imaging of human SWI/SNF-remodeled mono- and polynucleosomes by atomic force microscopy employing carbon nanotube tips. *Mol. Cell. Biol.*, 21 :8504–8511.
- Segal, E., Fondufe-Mittendorf, Y., Chen, L., Thastrom, A., Field, Y., Moore, I. K., Wang, J. P., and Widom, J. (2006). A genomic code for nucleosome positioning. *Nature*, 442(7104) :772–778.
- Sentani, K., Oue, N., Kondo, H., Kuraoka, K., Motoshita, J., Ito, R., Yokozaki, H., and Yasui, W. (2001). Increased expression but not genetic alteration of BRG1, a component of the SWI/SNF complex, is associated with the advanced stage of human gastric carcinomas. *Pathobiology*, 69 :315–320.

BIBLIOGRAPHIE

- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J. M., Pazin, M. J., Davie, J. R., and Peterson, C. L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*, 311(5762) :844–847.
- Shundrovsky, A., Smith, C. L., Lis, J. T., Peterson, C. L., and Wang, M. D. (2006). Probing SWI/SNF remodeling of the nucleosome by unzipping single DNA molecules. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13(6) :549–554.
- Singleton, M. R. and Wigley, D. B. (2002). Modularity and specialization in superfamily 1 and 2 helicases. *J. Bacteriol.*, 184 :1819–1826.
- Smith, C. L., Horowitz-Scherer, R., Flanagan, J. F., and Woodcock, C. L. (2003). Structural analysis of the yeast SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Nature Struct. Biol.*, 10(2) :141–145.
- Smith, C. L. and Peterson, C. L. (2004). ATP-dependent chromatin remodeling. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 65 :115–148.
- Smith, M. M. (2002). Centromeres and variant histones : What, where, when and why ? *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 14 :279–285.
- Smith, S. B., Cui, Y., and Bustamante, C. (1996). Overstretching B-DNA : the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science*, 271(5250) :795–799.
- Smith, S. B., Finzi, L., and Bustamante, C. (1992). Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science*, 258(5085) :1122–1126.
- Srinivasan, S., Armstrong, J. A., Deuring, R., Dahlsveen, I. K., McNeill, H., and Tamkun, J. W. (2005). The drosophila trithorax group protein kismet facilitates an early step in transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Development*, 132 :1623–1635.
- Stokes, D. and Perry, R. (1995). DNA-binding and chromatin localization properties of CHD1. *Mol. Cell. Biol.*, 15 :2745–2753.
- Stokes, D. G., Tartof, K. D., and Perry, R. P. (1996). CHD1 is concentrated in interbands and puffed regions of drosophila polytene chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93 :7137–7142.
- Strahl, B. D. and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403 :41–45.
- Strick, T. (1999). Enroulement mécanique de l'ADN et relaxation par les Topoisomérases. *Thèse de doctorat de l'Université Paris 6*.
- Strick, T. R., Allemand, J.-F., Bensimon, D., Bensimon, A., and Croquette, V. (1996). The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science*, 271(5257) :1835–1837.
- Strick, T. R., Allemand, J.-F., Bensimon, D., and Croquette, V. (1998). Behavior of supercoiled DNA. *Biophys. J.*, 74 :20162028.
- Stucki, M., Clapperton, J. A., Mohammad, D., Yaffe, M. B., Smerdon, S. J., and Jackson, S. P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2A.X to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, 123 :1213–1226.
- Subramanya, H. S., Bird, L. E., Brannigan, J. A., and Wigley, D. B. (1996). Cristal structure of a DExx box DNA helicase. *Nature*, 384 :379–383.
- Sudarsanam, P., Iyer, V. R., Brown, P. O., and Winston, F. (2000). Whole-genome expression analysis of swi/snf mutants of *S. Cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(7) :3364–3369.
- Sullivan, B. A., Blower, M. D., and Karpen, G. H. (2001). Determining centromere identity : cyclical stories and forking paths. *Nat. Rev. Genet.*, 2 :584–596.
- Svoboda, K. and Block, S. M. (1994). Biological applications of optical forces. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 23 :247–285.
- Taunton, J., Hassig, C. A., and Schreiber, S. L. (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator rpd3p. *Science*, 272 :408–411.
- Taverna, S. D., Li, H., Ruthenburg, A. J., Allis, C. D., and Patel, D. J. (2007). How chromatin-binding modules interpret histone modifications : lessons from professional pocket pickers. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 14(11) :1025–1040.

BIBLIOGRAPHIE

- Thastrom, A., Lowary, P. T., Widlund, H. R., Cao, H., Kubista, M., and Widom, J. (1999). Sequence motifs and free energies of selected natural and non-natural nucleosome positioning DNA sequences. *J. Mol. Biol.*, 288(2) :213–229.
- Tran, H. G., Steger, D. J., Iyer, V. R., and Johnson, A. D. (2000). The chromodomain protein chd1p from budding yeast is an ATP-dependent chromatin-modifying factor. *EMBO*, 19 :2323–2331.
- Tremethick, D. J. (2007). Higher-order structures of chromatin : the elusive 30 nm fiber. *Cell*, 128 :651–654.
- Tsuchiya, E., Hosotani, T., and Miyakawa, T. (1998). A mutation in NPS1/ STH1, an essential gene encoding a component of a novel chromatin remodeling complex RSC, alters the chromatin structure of *Saccharomyces Cerevisiae* centromeres. *Nucleic Acids Res.*, 26 :3286–3292.
- Tsukiyama, T., Becker, P. B., and Wu, C. (1994). ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor. *Nature*, 367 :525–532.
- Tsukiyama, T., Palmer, J., Landel, C. C., Shiloach, J., and Wu, C. (1999). Characterization of the imitation switch subfamily of ATP-dependent chromatin-remodeling factors in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Genes Dev.*, 13 :686–697.
- Tsukiyama, T. and Wu, C. (1995). Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Cell*, 83 :1011–1020.
- Unhavaithaya, Y., Shin, T. H., Miliaras, N., Lee, J., Oyama, T., and Mello, C. C. (2002). MEP-1 and a homolog of the NURD complex component Mi-2 act together to maintain germlinesoma distinctions in *C. elegans*. *Cell*, 111 :9911002.
- Vaillant, C., Audit, B., and Arnéodo, A. (2007). Experiments confirm the influence of genome long-range correlations on nucleosome positioning. *Phys. Rev. Lett.*, 99(21) :218103.
- van Attikum, H., Fritsch, O., Hohn, B., and Gasser, S. (2004). Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell*, 119 :777–788.
- Varga-Weisz, P. D., Wilm, M., Bonte, E., Dumas, K., Mann, M., and Becker, P. (1997). Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature*, 388 :598602.
- Vary, J. C. J., Gangaraju, V. K., Qin, J., Landel, C. C., Kooperberg, C., Bartholomew, B., and Tsukiyama, T. (2003). Yeast *isw1p* forms two separable complexes in vivo. *Mol. Cell. Biol.*, 23(1) :80–91.
- Vologodskii, A. V. and Marko, J. F. (1997). Extension of torsionally stressed DNA by external force. *Biophys. J.*, 73(1) :123–132.
- Wagner, G. (2006). Etude de la dynamique de la chromatine par des techniques de molécules uniques. *Thèse de doctorat délivrée par l'Université Paris 7*.
- Wang, H., Bash, R., Lindsay, S. M., and Lohr, D. (2005). Solution AFM studies of human *swi-snf* and its interactions with MMTV DNA and chromatin. *Biophys. J.*, 89(5) :3386–3398.
- Wang, H., Bash, R., Yodh, J. G., Hager, G., Lindsay, S. M., and Lohr, D. (2004). Using atomic force microscopy to study nucleosome remodeling on individual nucleosomal arrays in situ. *Biophys. J.*, 87(3) :1964–1971.
- Wang, M. D., Yin, H., Landick, R., Gelles, J., and Block, S. M. (1997). Stretching DNA with optical tweezers. *Biophys. J.*, 72(3) :1335–1346.
- Weier, H.-U. G., Wang, M., Mullikin, J. C., Zhu, Y., Cheng, J.-F., Greulich, K. M., Bensimon, A., and Gray, J. W. (1995). Quantitative DNA fiber mapping. *Hum. Mol. Genet.*, 4 :1903–1910.
- Weintraub, H. and Groudine, M. (1976). Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science*, 193 :848–856.
- White, J. H. (1969). Self-linking and gauss-integral in higher dimensions. *American Journal of Mathematics*, 91(3) :693.
- Whitehouse, I., Flaus, A., Cairns, B. R., White, M. F., Workman, J. L., and Owen-Hughes, T. (1999). Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature*, 400(6746) :784–787.
- Whitehouse, I., Stockdale, C., Flaus, A., Szczelkun, M. D., and Owen-Hughes, T. (2003). Evidence for DNA translocation by the ISWI chromatin-remodeling enzyme. *Mol. Cell. Biol.*, 23(6) :1935–1945.

BIBLIOGRAPHIE

- Willig, K. I., Rizzoli, S. O., Westphal, V., and Hell, S. W. (2006). STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature*, 440(7086) :935–939.
- Wittmeyer, J., Saha, A., and Cairns, B. (2004). DNA translocation and nucleosome remodeling assays by the RSC chromatin remodeling complex. *Methods Enzymol.*, 377 :322–343.
- Wong, A. K., Shanahan, F., Chen, Y., Lian, L., Ha, P., Hendricks, K., GhaVari, S., Iliev, D., Penn, B., Woodland, A. M., Smith, R., Salada, G., Carillo, A., Laity, K., Gupte, J., Swedlund, B., Tavtigian, S. V., Teng, D. H., and Lees, E. (2000). BRG1, a component of the SWI-SNF complex, is mutated in multiple human tumor cell lines. *Cancer Res.*, 60 :61716177.
- Wong, H., Victor, J. M., and Mozziconacci, J. (2007). An all-atom model of the chromatin fiber containing linker histones reveals a versatile structure tuned by the nucleosomal repeat length. *PLoS ONE*, 2(9) :e877.
- Wu, W. H., Alami, S., Luk, E., Wu, C. H., Sen, S., Mizuguchi, G., Wei, D., and Wu, C. (2005). Swc2 is a widely conserved H2AZ-binding module essential for ATP-dependent histone exchange. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12 :1064–1071.
- Ye, J., Osborne, A. R., Groll, M., and Rapoport, T. A. (2004). RecA-like motor ATPases - lessons from structures. *Biochim. Biophys. Acta*, 1659 :1–18.
- Yukawa, M., Katoh, S., Miyakawa, T., and Tsuchiya, E. (1999). Nps1/Sth1p, a component of an essential chromatin-remodeling complex of *Saccharomyces Cerevisiae*, is required for the maximal expression of early meiotic genes. *Genes Cell.*, 4 :99–110.
- Zhang, H., Richardson, D., Roberts, D., Utley, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Cote, J., and Cairns, B. (2004). The yaf9 component of the SWR1 and NuA4 complexes is required for proper gene expression, histone H4 acetylation, and htz1 replacement near telomeres. *Mol. Cell. Biol.*, 24 :94249436.
- Zhang, Q. and Wang, Y. (2008). High mobility group proteins and their post-translational modifications. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1784(9) :1159–1166.
- Zhang, Y., Smith, C. L., Saha, A., Grill, S. W., Mihardja, S., Smith, S. B., Cairns, B. R., Peterson, C. L., and Bustamante, C. (2006). DNA translocation and loop formation mechanism of chromatin remodeling by SWI/SNF and RSC. *Mol Cell.*, 24(4) :559–568.
- Zlatanova, J., Leuba, S. H., and Holde, K. V. (1998). Chromatin fiber structure : Morphology, molecular determinants, structural transitions. *Biophys. J.*, 74 :2554–2566.
- Zofall, M., Persinger, J., Kassabov, S. R., and Bartholomew, B. (2006). Chromatin remodeling by ISW2 and SWI/SNF requires DNA translocation inside the nucleosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13(4) :339–346.