



HAL
open science

Micro-manipulation de l'ADN Vers une visualisation directe par microscopie de fluorescence

Adrien Meglio

► **To cite this version:**

Adrien Meglio. Micro-manipulation de l'ADN Vers une visualisation directe par microscopie de fluorescence. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2010. Français. NNT: . tel-00558689

HAL Id: tel-00558689

<https://theses.hal.science/tel-00558689>

Submitted on 23 Jan 2011

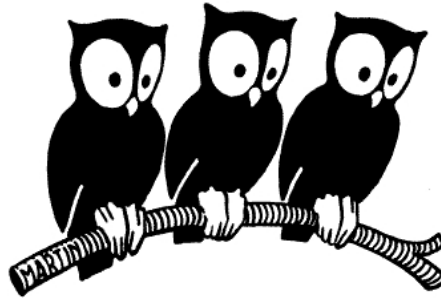
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de doctorat de l'université PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité *Interfaces Physique-Biologie*

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université PIERRE ET MARIE CURIE



**Micro-manipulation de l'ADN
Vers une visualisation directe par
microscopie de fluorescence**

Présentée par M. Adrien MEGLIO

Soutenue le 1er avril 2010 devant le jury composé de :

Prof.	Jean-François	ALLEMAND	Examineur
Dr.	Vincent	CROQUETTE	Invité
Prof.	Jean-François	JOANNY	Examineur
Dr.	Christophe	ESCUDE	Rapporteur
Dr.	Marcelo	NOLLMANN	Rapporteur
Prof.	David	SHERRATT	Examineur
Dr.	Terence	STRICK	Invité

Adrien MEGLIO

Groupe de Physique des Biomolécules
Laboratoire de Physique Statistique

Tel. +33 1 44 32 34 96

Fax. +33 1 44 32 34 33

adrien.meglio@normalesup.org

<http://www.lps.ens.fr>

Ecole Normale Supérieure - 24 rue LOMOND - 75231 PARIS CEDEX 05 FRANCE

Remerciements

Oui, c'est elle! C'est la déesse!
En ce jour qui vient nous unir,
Et fidèle à ma promesse,
Comme un frère je veux te
chérir!
C'est elle, c'est la déesse
Qui vient en ce jour nous unir!
Oui, partageons le même sort,
Soyons unis jusqu'à la mort!

(Bizet, Les Pêcheurs de Perles)

Avant d'aborder le travail scientifique que j'ai effectué pendant cette thèse, je tiens à souligner qu'à mes yeux elle n'est pas un évènement isolé et définitif, mais qu'elle s'inscrit en compagnie d'autres activités et d'autres personnes qui ont contribué à mon épanouissement.

En particulier, je suis reconnaissant à mes parents, Gilbert et Sofia, d'avoir su m'accompagner avec subtilité depuis mon enfance sans jamais me donner l'impression d'être forcé à quoi que ce soit, sinon par le plaisir de bien le faire. Les principaux enseignements que je pense avoir retirés de leur éducation sont l'obligation permanente de vérité et d'humilité. Cette pratique qu'ils m'ont transmise n'est sans doute pas étrangère à mon engagement scientifique.

Je me rappelle également de mes plus jeunes années, avec mon frère Arno qui a été à la fois un compagnon de jeux et un contradicteur formidable, et dont j'admire toujours la retenue et la profondeur de vue.

Pendant le temps passé dans les différentes sections de l'enseignement public, j'ai toujours eu la chance d'avoir d'excellents professeurs et surtout d'avoir su retirer de leur passion d'enseigner une passion d'apprendre. J'ai oublié le nom de certains d'entre eux, d'autres plus récents dont le souvenir est plus frais comme Chantal de Zamaroczy, Bernard Chambaz, Dominique Zann, Paul Watson, Gérard Mantin et Yves Dulac.

Tous ont eu l'intelligence de nous présenter la connaissance et la compréhension de notre monde (que ce soit en histoire, en littérature ou en physique) comme un mode de vie qui se concevait comme un projet personnel et pas comme une distinction reçue par certains et refusée à d'autres. Etant devenu moi-même enseignant, j'ai toujours eu à coeur de susciter chez mes élèves l'intérêt d'observer le monde qui les entoure avec des yeux vifs.

Je suis également reconnaissant de la grande diversité de recrutement des élèves que j'y ai trouvé, que ce soit pendant mes années à Neuilly ou à Louis-le-Grand, par laquelle mes amis et moi nous sommes émulés mutuellement par nos caractères complémentaires. Le travail en commun et les confrontations de points de vue sont des éléments essentiels de l'enseignement que j'ai reçu. De mes amis au collège Aryan Nikeghbali, Marc El-Kouheiri et Michaël Fribourg, ou en classes préparatoires Julien Dahan, Mario Nicolas, Laurent Cohen-Solal et Johann Walter, je garde un souvenir plein de gratitude comme s'ils avaient été mes professeurs.

En entrant à l'ENS, j'ai fait le choix de la liberté de l'apprentissage. Je pense que cette liberté provenait de la confiance que les professeurs mettaient en leurs élèves. Cette

Remerciements

philosophie a été particulièrement épanouissante pour moi puisque j'y ai commencé à être vraiment acteur de mon propre apprentissage. Certaines figures m'ont plus particulièrement marqué, parce qu'elles m'ont ouvert plus encore les yeux sur ces possibilités : Ludovic Jullien, Romain Graziani, Pierre Turq, Jean-François Allemand, Pierre Sinay, Geoffrey Bodenhausen, Clotilde Policar...

J'y ai également trouvé des camarades dont l'acuité intellectuelle, mais surtout la force de caractère, m'ont encouragé à construire une personnalité propre : Johanna Brazard, Lucie Norel, Plamen Bokov, Romain Planques, Fabien Trouselet, Fabrice Deschâtres, Fabien Montel.

Cette construction s'est faite elle aussi sous l'influence du plaisir du partage et de la jouissance de la découverte. Par l'écoute, l'observation et la dégustation, j'ai beaucoup appris du vin de François Rosenfeld, Axel Marchal et Lucile Petit, et j'ai maintenant le plaisir de le partager avec la bonne chère en compagnie de mes camarades Rémy Verdo, Lorenzo Sterzi, Mélanie Pélican, François Falconet, Guillaume Stirnemann, Pierre Lairez, Aurélien Momin, Benoît Richert, Florian Cafiero, Mathieu Valdenaire, Michaël Mestre et Matthieu Solnon.

Le temps de mes études terminé, je pense que ma personnalité et ma sensibilité scientifique se sont naturellement trouvées mises en adéquation avec mon laboratoire de thèse, et plus particulièrement avec Jean-François Allemand. Je pense que nous nous sommes mutuellement trouvés une joie d'ouvrir les yeux sur le monde devant nous, qu'il soit dans une assiette ou sur une paillasse.

J'ai également admiré le regard pénétrant que Vincent Croquette porte sur presque toute chose dont j'ai pu discuter avec lui, qualité que j'avais également appréciée chez Ludovic Jullien lorsque j'avais travaillé chez lui en compagnie de Damien Alcor et André Estevez-Torres. De mes encadrants, seul David Bensimon porte peut-être plus fort l'enthousiasme quotidien de la recherche scientifique par un sourire et un foisonnement d'idées permanent.

Je les remercie de m'avoir permis de partager ces années passionnantes en compagnie de membres du groupe plus expérimentés dont j'ai cherché à atteindre la vivacité intellectuelle, comme Terence Strick, Keir Neumann, Omar Saleh, Gilles Charvin, Pierre Neveu et Timothée Lionnet. J'ai surtout passé ce temps en compagnie d'autres jeunes chercheurs : Thomas Julou, Elise Praly, Etienne Cavatore, Fangyuan Ding, Francesco Mosconi, avec qui j'ai toujours apprécié de partager points de vue et états d'âme.

Naturellement, j'ai partagé cette joie permanente d'ouvrir les yeux sur le monde, qui n'a pas été dépourvue d'interrogations sur ce que j'y voyais ou pas, avec Alexis Bizon. De ces années de vie, professionnelle en tant que jeune chercheur autant que personnelle, je garde au moment de conclure la rédaction de ce manuscrit un sentiment de plaisir de les avoir vécues avec gourmandise, intensité et en si bonne compagnie.

Table des matières

Remerciements	i
Résumé	1
Français	1
English	1
I Réactivité biologique à l'échelle de la molécule unique	3
Réactivité biologique à l'échelle de la molécule unique	5
Introduction	5
A l'échelle de la molécule unique	5
Les translocases à ADN et protéines apparentées	6
Résultats	7
1 Techniques de micromanipulation	9
1.1 Questions d'échelle	10
1.1.1 Longueurs	10
1.1.2 Actuateurs	11
1.1.3 Pourquoi l'ADN	11
1.2 Microfibre optique	12
1.3 Microscopie à force atomique (AFM)	13
1.4 Pinces optiques	13
1.5 Pinces magnétiques	14
1.6 Comparaison	14
1.6.1 Comparaison qualitative	14
1.6.2 Résolution force-bande passante	15
1.6.3 Résolution spatiale	15
1.6.4 Conclusion	16
2 Détection de molécules uniques par fluorescence	17
Introduction	17
2.1 Fluorescence	17
2.1.1 Principe de la fluorescence	18
2.1.2 Quantification de l'absorbance	19
2.1.3 Rendement quantique et brillance	21
2.1.4 Etat électronique du fluorophore	23
2.1.5 Photodestruction	23
2.1.6 Etats sombres et clignotement	24
2.1.7 Effets du clignotement	24
2.1.8 Transferts non-radiatifs	25
2.1.9 Excitation à deux photons	26
2.2 Marqueurs fluorescents	27

2.2.1	Fluorophores organiques	27
2.2.2	Quantum Dots	28
2.2.3	Protéines fluorescentes	29
2.2.4	Conclusion	30
2.3	Techniques d'excitation en solution	30
2.3.1	Excitation directe	30
2.3.2	Excitation en ondes évanescentes	32
2.3.3	Conclusion	33
2.3.4	Techniques de modulation temporelle	35
2.3.5	Techniques de modulation spatiale transverse	36
2.3.6	Microscopie 4Pi	41
2.3.7	Excitation à deux photons	42
2.4	Techniques de détection de signaux de fluorescence de fluorophores uniques	43
2.4.1	Problématiques générales	43
2.4.2	Introduction aux détecteurs de fluorescence	45
2.4.3	Microscopie de fluorescence directe	47
2.4.4	Imagerie multicolore et Dual View	48
2.4.5	Microscopie confocale	49
2.5	Techniques de localisation de fluorophores	52
2.5.1	Le critère de Rayleigh dans le plan transverse	52
2.5.2	Localisation par calibration position-intensité	55
2.5.3	Colocalisation par FRET	56
	Conclusion	57
II	Pinces magnétiques et fluorescence en ondes évanescentes	59
3	Micro-manipulation par pinces magnétiques	61
	Introduction	61
3.1	Principe des expériences	61
3.2	Le dispositif	62
3.2.1	Description globale	62
3.2.2	Microchambre	63
3.2.3	Optique	64
3.2.4	Bâti	64
3.2.5	Aimants	65
3.3	Billes magnétiques	66
3.4	Suivi vidéo et mesure de position	66
3.5	Mesure de force	68
3.5.1	Introduction	68
3.5.2	Principe de la mesure de force	69
3.5.3	Comment est <i>vraiment</i> mesurée la force	69
3.5.4	Comment est <i>vraiment vraiment</i> mesurée la force	70
3.5.5	Effet des paramètres expérimentaux sur la bande passante	73
	Conclusion	73
4	Physique statistique de l'ADN	75
4.1	Comportement en traction	75
4.1.1	Corrections à haute force	76
4.2	Comportement en torsion	77

4.2.1	Etude des phases de l'ADN	77
4.3	Application aux expériences en molécule unique	80
III	Expériences	83
5	Caractéristiques expérimentales du montage	85
	Introduction	85
5.1	Calibrations et mesures	85
5.1.1	Rendement de transmission des optiques	85
5.1.2	Excitation TIRF	86
5.1.3	Calibration du grandissement du montage	86
5.1.4	Stabilité mécanique (pinces magnétiques)	88
5.1.5	Stabilité mécanique (fluorescence)	88
5.1.6	Correction des dérives (fluorescence)	89
5.1.7	Mesure de z (fluorescence)	90
5.1.8	Bruit de mesure de z (pinces magnétiques)	92
5.1.9	Bruit de mesure en (x,y) (pinces magnétiques)	93
5.1.10	Précision de pointé en (x,y) (fluorescence)	93
5.1.11	Contrôle indépendant de z (pinces magnétiques)	97
5.1.12	Propriétés du détecteur CCD	98
5.1.13	Conclusion sur les expériences de calibration	99
5.2	Expériences de principe	100
5.2.1	Détection transitoire d'un fluorophore unique	100
5.2.2	Excitation multicolore alternée	101
5.2.3	Suivi d'un Quantum Dot unique	102
5.2.4	Combinaison pinces magnétiques - fluorescence en ondes évanescentes	103
5.2.5	Conclusion sur les expériences de principe	104
6	Stratégies de marquage fluorescent	105
	Introduction	105
6.1	Préparation des ADN	105
6.1.1	Principe général	105
6.1.2	Préparation du fragment central	107
6.1.3	Préparation des fragments extérieurs	108
6.1.4	Cas particulier de la torsion	110
6.1.5	Conclusion	110
6.2	Préparation des protéines	111
6.2.1	FtsK	111
6.2.2	ARN Polymérase de E. Coli	111
6.2.3	ARN Polymérase de T7	112
6.3	Marquage des protéines	112
6.3.1	Introduction	112
6.3.2	Marquage direct	112
6.3.3	Marquage en excès	113
6.3.4	Pré-purification par critère de taille	113
6.3.5	Pré-purification par critère de charge	114
6.3.6	Purification par critère de taille	114
6.4	Conclusion	115
7	Etude de la transcription chez le phage T7	117

Introduction	117
7.1 Introduction à la transcription	117
7.1.1 Le dogme central de la biologie moléculaire	117
7.1.2 Les formes de transcription	118
7.1.3 La régulation de la transcription	119
7.2 Les mécanismes de la transcription des ARNm	119
7.2.1 Etudes structurales et mécanistiques des ARN polymérase	120
7.2.2 Transcription par les ARN polymérase bactériennes	121
7.2.3 Discussion	124
7.3 La transcription chez le bactériophage T7	126
7.3.1 Le bactériophage T7 et son ARN polymérase	126
7.3.2 Transcription par l'ARN Polymérase de T7	127
7.3.3 Un modèle pour la transcription	130
7.4 Conclusion	130
8 Caractérisation de l'activité de l'ARN polymérase	133
Introduction	133
8.1 Influence de la biotinylation sur l'activité	133
8.1.1 Principe de l'expérience	133
8.1.2 Résultats	133
8.1.3 Analyse	135
8.2 Eléments de cinétique	138
8.2.1 Principe de l'expérience	138
8.2.2 Attribution des bandes	139
8.2.3 Résultats	139
8.2.4 Analyse	141
8.3 Influence de la température	143
8.3.1 Principe de l'expérience	143
8.3.2 Résultats	143
8.3.3 Analyse : Cinétique	144
8.3.4 Analyse : Répartition des transcrits	144
8.3.5 Analyse : Proportion de rNTP incorporés	145
8.3.6 Conclusion	145
8.4 Influence de la concentration en nucléotides	146
8.4.1 Principe de l'expérience	146
8.4.2 Résultats	146
8.4.3 Analyse : cinétique	146
8.4.4 Analyse : Répartition des transcrits	147
8.4.5 Analyse : Proportion de rNTP incorporés	148
8.4.6 Conclusion	148
8.5 Incorporation de nucléotides modifiés	148
8.6 Couplage à un fluorophore	149
8.6.1 Protocole	149
8.6.2 Influence du couplage sur l'activité	149
Conclusion	151
9 Expériences en molécules uniques sur l'ARN polymérase	153
9.1 Introduction	153
9.1.1 Contraintes des manipulations en molécule unique	153
9.1.2 Substrats d'ADN utilisés	154

9.2	Activité mécanique en molécule unique de l'ARN Polymérase de T7	154
9.2.1	Principe de l'expérience	154
9.2.2	Dénaturation spontanée de l'ADN	156
9.2.3	Visualisation de l'insertion	156
9.2.4	Sensibilité de l'insertion à la torsion	158
9.2.5	Visualisation de l'insertion en présence de bruit	160
9.2.6	Visualisation en présence de bruit (suite)	161
9.2.7	Complexe pré-chargés	162
9.3	Marquage fluorescent de l'ARN	163
9.3.1	Incorporation de nucléotides fluorescents	163
9.3.2	Sonde fluorescente	164
9.3.3	Marquage secondaire de l'ARN	164
	Conclusion	165
10	FtsK et la ségrégation des chromosomes chez <i>Escherichia coli</i>	167
	Introduction	167
10.1	FtsK et les protéines ASCE	167
10.1.1	La superfamille FtsK/HerA	167
10.1.2	ASCE core ATPases	168
10.2	Structure et activité <i>in vitro</i> de FtsK	169
10.2.1	Structure primaire et secondaire	169
10.2.2	Activité <i>in vitro</i>	170
10.2.3	Structure tertiaire et quaternaire	171
10.2.4	FtsK-C/alpha/beta	172
10.3	Modèles structuraux et mécanistiques de FtsK	174
10.3.1	Introduction	174
10.3.2	Composition de l'unité moteur	174
10.3.3	Nombre d'unités moteur	176
10.3.4	Coordination de l'activité ATPase	177
10.3.5	Couplage mécano-chimique	179
10.3.6	Interaction avec les séquences de polarisation du chromosome	180
10.4	Conclusion	181
11	Article Crozat, Meglio et al.	183
12	Autres éléments sur l'étude de FtsK en molécule unique	195
	Introduction	195
12.1	Mutants de l'unité moteur du complexe de FtsK	195
12.2	Activité ADN translocase de mutants en molécules uniques	196
12.2.1	Introduction	196
12.2.2	Description	197
12.2.3	Comparaison avec les données connues	197
12.2.4	Activité de FtsKc	200
12.2.5	Activité des mutants WA, WB et RF	203
12.2.6	Influence de la force de tension	206
12.3	Complexes fixés	208
12.3.1	Introduction	208
12.3.2	Comportement observé	208
12.3.3	Interprétation	210
12.3.4	Perspectives	210
12.4	Résultats sur les complexes fixés	211

12.4.1	Stimulation de l'activité de formation de boucle	211
12.4.2	Etude à basse concentration en ATP	211
12.4.3	Etude du vieillissement protéique	212
12.5	Modulation de l'activité ADN translocase	214
12.5.1	Effet de la concentration en ATP	214
12.5.2	Effet de la concentration en ADP	215
12.6	Activité ATPase non processive	217
12.7	Conclusion	218
Conclusions générales		219
	Rappel des résultats	219
	Perspectives	219
IV Annexes		221
13 Remerciements		223
13.1	Collaborations	223
13.2	Financements	224
14 Protocoles		225
	Protocole 1 — Antibiotiques	226
	Protocole 2 — Préparation de milieux	228
	Protocole 3 — Préparation de cellules compétentes	229
	Protocole 4 — Transformation	230
	Protocole 5 — Sélection de colonies bactériennes	231
	Protocole 6 — Extraction d'ADN (sur colonne)	233
	Protocole 7 — Extraction d'ADN (Phénol-Chloroforme)	234
	Protocole 8 — Purification d'ADN (isopropanol/acétate)	236
	Protocole 9 — Purification d'ADN (gel d'agarose)	237
	Protocole 10 — Double restriction	238
	Protocole 11 — Dephosphorylation	240
	Protocole 12 — Hybridation	241
	Protocole 13 — Ligation	242
	Protocole 14 — Restriction simple	243
	Protocole 15 — PCR	244
	Protocole 16 — RNAP – Test in vitro	246
	Protocole 17 — RNAP – Expression de protéine biotinylée	247
	Protocole 18 — RNAP – Purification de protéine biotinylée	249
	Protocole 19 — RNAP – contrôle de l'expression	251
	Protocole 20 — Fluorescence – Nettoyage de surfaces	254
	Protocole 21 — Pincés magnétiques – Films hydrophobes	256
	Protocole 22 — Fluorescence – Film hydrophile	257
	Protocole 23 — Pincés magnétiques – Surface anti-digoxygénine	258
	Protocole 24 — Pincés magnétiques/fluorescence – Surface biot ou strep	259
	Protocole 25 — Pincés magnétiques – Greffage sur billes magnétiques	261
	Protocole 26 — Pincés magnétiques – Greffage des complexes bille-ADN	263
	Protocole 27 — Pincés magnétiques et fluorescence – Purification de marqueurs	265
	Protocole 28 — T7RNAP – Préparation de complexes bloqués	267
	Protocole 29 — T7RNAP – Test d'activité in vitro	269
	Protocole 30 — Réglage optique – Faisceau d'excitation	270

Protocole 31 — Réglage optique – Alignement de la fibre optique	272
Protocole 32 — Réglage optique – Alignement de la source	274
Protocole 33 — Réglage optique – Mise en œuvre de l’onde évanescente	276
Protocole 34 — Réglage optique – Alignement des caméras	278
15 Solutions	281
15.1 Solution de stockage au glycérol	281
15.2 Solution TfbIA	281
15.3 Solution TfbIIA	281
15.4 Tampon TAE	281
15.5 Tampon PP	281
15.6 Tampon PP-gly	282
15.7 Tampon PIPES	282
15.8 Tampon HEPES	282
15.9 Tampon Tris Acetate pH 7,9	282
15.10 Tampon PBS	282
15.11 Tampon de passivation PB	282
15.12 Tampon pour surfaces SB	283
15.13 Tampon de base pour purification de protéines APB	283
15.14 Tampon de lyse cellulaire LyB	283
15.15 Tampon bas sel LSB	283
15.16 Tampon TE	283
15.17 Tampon de transcription	283
15.18 Tampon pour FtsK	284
16 Calculs, détails et précisions	285
16.1 Etude des phases de l’ADN	285
16.1.1 Description	285
16.1.2 Transition en torsion à basse force	287
16.1.3 Transition en torsion à haute force	289
16.1.4 Transition en force à torsion négative	291
16.2 Physique du montage	292
16.2.1 Mesure de la force magnétique (dans l’espace direct)	292
16.2.2 Mesure de la force magnétique (dans l’espace réciproque)	293
16.2.3 Statistique de photons	294

Table des matières

Table des figures

1.1	Catalyse enzymatique	9
1.2	Allostérie	10
1.3	Micromanipulation	12
1.4	Méthodes de micromanipulation d'ADN	12
2.1	Transition adiabatique	18
2.2	Transition verticale	19
2.3	Transitions conduisant à l'émission de fluorescence	20
2.4	Superposition des spectres d'absorption et d'émission de Cy5	20
2.5	Déexcitation non radiative	21
2.6	Levée de l'interdiction de spin	22
2.7	Clignotement d'un fluorophore organique unique	25
2.8	Variation de l'efficacité de FRET	26
2.9	Excitation à deux photons	26
2.10	Spectres d'absorption à un et deux photons	27
2.11	Fluorescence d'une série de <i>Quantum Dots</i>	29
2.12	Optique d'excitation	31
2.13	Schéma optique d'excitation directe à deux longueurs d'onde	31
2.14	Longueur de pénétration dans l'eau pure	32
2.15	Augmentation de l'angle de déviation	33
2.16	Variation de l'intensité de fluorescence en fonction de z	34
2.17	Excitation en onde évanescente à l'aide d'un prisme	34
2.18	Excitation en onde évanescente à l'aide d'un objectif	35
2.19	Facteur de qualité de l'AOTF	36
2.20	Temps de réponse d'un filtre acousto-optique accordable	37
2.21	Obtention de figures d'interférence	38
2.22	Imagerie haute résolution	39
2.23	Principe du STED	40
2.24	Microscopie confocale versus STED	40
2.25	Principe de l'illumination structurée dans l'espace réciproque	41
2.26	Microscopie 4π	42
2.27	Zone d'excitation à un et deux photons	42
2.28	Optique d'excitation	43
2.29	Image d'un fluorophore unique	44
2.30	Principe de fonctionnement d'un capteur CCD	45
2.31	Microscopie de fluorescence directe	48
2.32	<i>Dual View</i>	49
2.33	Fluorescence hors focus	50
2.34	Effet de taille du détecteur	51
2.35	Effet d'un sténopé sur la profondeur de champ	51
2.36	Critère de Rayleigh	52
2.37	FIONA	53
2.38	SHRIMP	54

2.39	Application de SHREC	55
2.40	ALEX-FRET	57
3.1	Stratégie d’ancrage des molécules d’ADN	62
3.2	Le dispositif de pinces magnétiques	63
3.3	Principe du montage permettant la compensation thermique des dérives	65
3.4	Effet de la compensation thermique sur les dérives	65
3.5	Propriétés magnétiques des billes utilisées	67
3.6	Principe du suivi de la position de la bille	68
3.7	Calcul de la force par la mesure des fluctuations transverses	69
3.8	Spectre de puissance des fluctuations	70
3.9	Repliement du spectre	71
3.10	Anisotropie de la constante de raideur du piège magnétique	72
4.1	Courbe Force-Extension expérimentale	77
4.2	Formation de plectonemes	78
4.3	Courbes extension-torsion à basse force	79
4.4	Courbes extension-torsion à haute force	80
4.5	Diagramme de phase de l’ADN	80
5.1	Elements visibles en TIRF	87
5.2	Calibration du grandissement	87
5.3	Dérives mécaniques	88
5.4	Spectre des dérives mécaniques	89
5.5	Effet des fluctuations de plan focal	90
5.6	Correction des variations d’excitation	91
5.7	Mesure de z en fluorescence	92
5.8	Mesure de z en pinces magnétiques	93
5.9	Suivi différentiel de position	93
5.10	Suivi (x,y) en pinces magnétiques	94
5.11	Suivi (x,y) en microscopie de fluorescence	95
5.12	Précision de pointé de fluorescence en (x,y)	96
5.13	Dépendance de la précision avec le temps d’intégration	96
5.14	Mesure du nombre de photons	97
5.15	Calibration directe de la camera	98
5.16	Calibration alternative de la camera	99
5.17	Observation de fluorophores uniques	101
5.18	Excitation alternée	101
5.19	Clignotement d’un Quantum dot	102
5.20	Combinaison pinces magnétiques - fluorescence en ondes évanescentes	103
6.1	Schéma de préparation des ADN	106
6.2	Préparation du fragment central par digestion	107
6.3	Préparation du fragment central par PC	108
6.4	Attachement en épingle à cheveux	110
6.5	Purification du complexe ARNP-streptavidine	115
7.1	Dogme central de la biologie moléculaire	118
7.2	L’opéron lactose	119
7.3	Schéma de la transcription	120
7.4	Etats du complexe RNAP:ADN	121

7.5	Facteur σ	122
7.6	Complexe RP_o	122
7.7	Complexe RP_{itc} et scrunching	123
7.8	Pauses transcriptionnelles	124
7.9	Infection par le phage T4	127
7.10	Reconnaissance du promoteur T7	128
7.11	Détachement du promoteur	128
7.12	Ouverture du canal du transcrit	129
7.13	Structure de la bulle de dénaturation	129
7.14	Rotation de la RNAP	131
8.1	Test de transcription par la polymérase biotinylée	134
8.2	Linéarité de la mesure de quantité d'ARN	136
8.3	Test d'intégrité de l'ADN de référence	137
8.4	Gel de la cinétique de transcription	139
8.5	Analyse de la cinétique de transcription	140
8.6	Répartition des transcrits à 37°C	141
8.7	Répartition des nucléotides incorporés dans les transcrits à 37°C	141
8.8	Composantes de la vitesse de transcription	142
8.9	Gel de la cinétique de transcription	143
8.10	Analyse de la cinétique de transcription	144
8.11	Répartition des transcrits à 15°C et 25°C	145
8.12	Répartition des nucléotides incorporés dans les transcrits à 15°C et 25°C	145
8.13	Gel de la cinétique de transcription	146
8.14	Analyse de la cinétique de transcription	147
8.15	Répartition des transcrits à 25°C	147
8.16	Répartition des nucléotides incorporés dans les transcrits à 25°C	148
8.17	Incorporation de nucléotides modifiés	150
8.18	Activité en présence de streptavidine	151
9.1	Exemples de constructions d'ADN utilisées	155
9.2	Ouverture de bulles de dénaturation	156
9.3	Diagramme de phase des bulles de dénaturation	157
9.4	Insertion de RNAP en l'absence de rNTP	157
9.5	Insertion de RNAP en présence de rNTP	158
9.6	Décalage des courbes en chapeau	159
9.7	Décrochement à l'aller	159
9.8	Décrochement au retour	160
9.9	Evènement d'éjection d'une RNAP	161
9.10	Changement d'extension lors de l'éjection d'une RNAP	162
9.11	Ré-insertion rapide d'une RNAP	162
9.12	Evènements en présence d'ATP fluorescent	164
10.1	Resolution de dimères de chromosomes	167
10.2	Structure secondaire de FtsK	168
10.3	FtsK et les protéines apparentées	169
10.4	Structure primaire de FtsK	169
10.5	Structure de FtsK-C	171
10.6	Structure partielle de FtsK	172
10.7	Structure du complexe FtsK-ADN	172
10.8	Changement conformationnel dans FtsK	173

Table des figures

10.9	Structure de l'interaction de FtsK avec KOPS	174
10.10	Formation d'hexamères de FtsK sur l'ADN	175
10.11	Modèles de la structure du complexe actif de FtsK	176
10.12	Modèles de coopérativité de l'activité ATPase	178
10.13	Exemple d'effet du nombre de mutants sur l'activité	178
10.14	Modèles mécano-chimiques apparentés	180
12.1	Domaines de FtsK	195
12.2	Variants de FtsK	196
12.3	Translocation de FtsK-50C	198
12.4	Détection automatique des événements	198
12.5	Distribution des vitesses pour FtsK-50C	199
12.6	Processivité de FtsK-50C	200
12.7	Translocation de FtsK-C	201
12.8	Vitesse de FtsK-50C	201
12.9	Raccrochement du complexe	202
12.10	Vitesse de mutants de FtsK	203
12.11	Comparaison de l'activité des mutants de FtsK	204
12.12	Stimulation de l'activité des complexes fixés	204
12.13	Possibilités alternatives de structure du complexe actif	205
12.14	Déplacement de la liaison biotine-streptavidine par FtsK	207
12.15	Dépendance en force de la vitesse de translocation de FtsK	207
12.16	Absence d'effet de la biotinylation sur l'activité	209
12.17	Rinçage de la cellule	209
12.18	Formation de différents types de boucles d'ADN	211
12.19	Événements de FtsK à basse concentration en ATP	212
12.20	Processivité de FtsK à basse concentration en ATP	212
12.21	Viellissement rapide	213
12.22	Activité de FtsK en fonction de la concentration en ATP	215
12.23	Inhibition par l'ADP	217
14.1	Diagramme schématique du cycle de PCR	245
16.1	Torsion de l'ADN	285
16.2	Formation de plectonèmes	286
16.3	Transition plectonémique à basse force	288
16.4	Courbes extension-torsion à basse force	289
16.5	Transition de dénaturation à haute force	290
16.6	Courbes extension-torsion à haute force	291
16.7	Transition plectonèmes/dénaturation	291
16.8	Diagramme de phase de l'ADN	292
16.9	Le piège magnétique vu comme un pendule inversé	292
16.10	Fluctuations x,y,z	293

Liste des tableaux

1.1	Techniques de micromanipulation	15
4.1	Coefficients du modèle du ver	76
4.2	Quantités utiles dans le traitement du comportement de l'ADN en torsion	78
5.1	Rendement des optiques d'excitation	85
5.2	Rendement des optiques de détection	85
5.3	Calibrations et propriétés du montage	100
6.1	Préparation des fragments d'ADN	111
7.1	Données structurales sur les RNAP	120
7.2	RNAP en molécule unique	120
8.1	Influence de la biotinylation sur l'activité	134
8.2	Cinétique de transcription	138
8.3	Vitesse d'incorporation des rNTP à 37°C	140
8.4	Cinétique de transcription	143
8.5	Vitesse d'incorporation des rNTP à 25°C	144
8.6	Vitesse d'incorporation des rNTP à 25°C	147
8.7	Incorporation de ribonucléotides modifiés	149
8.8	Influence de la streptavidine	150
9.1	Plasmides utilisés pour la transcription en molécules uniques	154
9.2	Table des constructions d'ADN utilisées	155
9.3	Observation de T7 RNAP en molécule unique	165
10.1	Structure et mécanisme de protéines analogues à FtsK	175
10.2	Conséquences des modèles du complexe actif de FtsK	177
10.3	Effet de mutations selon le modèle	178
10.4	Expériences proposées sur FtsK	181
14.1	Test d'activité in vitro de RNAP	269

Résumé

Français

Dans ce travail, nous proposons un nouvel appareillage, destiné à aider à la détermination du mécanisme de certaines protéines. Cet outil, qui combine un appareil de pinces magnétiques, et un microscope de fluorescence en ondes évanescentes, a été conçu pour permettre à la fois la manipulation mécanique et l'observation de l'activité d'ADN translocases à l'échelle de la molécule unique.

Nous présentons d'abord ici la conception, la réalisation et l'expérimentation de ce montage. Nous montrons que, d'une part, il se compare favorablement à ses composants séparés (pinces magnétiques et microscope de fluorescence), et que d'autre part leur réunion dans un appareil unique permet d'obtenir des résultats d'un type nouveau.

Nous avons orienté l'étude des ADN translocases avec cet appareil sur l'exemple de deux protéines : le moteur FtsK de *Escherichia coli* et l'ARN Polymérase de T7. Nous détaillons dans cette étude les questions importantes encore en suspens concernant le mécanisme et présentons les expériences que nous avons envisagées pour y répondre.

Nous relatons ensuite également la difficulté que nous avons rencontrée à obtenir des substrats protéiques adaptés aux expériences que nous avons envisagées, et les solutions que nous avons mises en oeuvre pour y remédier.

Enfin, nous analysons les résultats obtenus dans des expériences en volume ou en pinces magnétiques seules, qui ont permis de mettre en valeur de nouveaux comportements et de préparer la réalisation de nouvelles expériences sur notre montage combiné.

English

In this work, we present an apparatus designed to help unravel the molecular mechanism of a certain class of proteins. It combines the capabilities of a magnetic tweezers apparatus with those of a fluorescence microscope in TIRF mode. It has been designed to allow for mechanical manipulation and direct observation of DNA translocases at the single molecule level.

We will first explain the design and testing of this setup. We will show that it does not only compare very well with the state of the art in magnetic tweezers or fluorescence microscope alone, but also that their combination lets us collect a new type of information.

More specifically, we studied the T7 RNAP polymerase and the FtsK motor from *Escherichia coli*. We will highlight the current questions arising concerning their mechanism of action, and propose a set of experiments to address them.

Then we will explain why we had a lot of trouble obtaining the adequate fluorescent protein substrates, and how we believe we will solve this problem.

We will finally analyze the results we obtained, either in bulk or magnetic tweezers experiments. They have unraveled new behaviours that we plan to use in new experiments on our combined MT/TIRF setup.

Première partie

Réactivité biologique à l'échelle
de la molécule unique

Réactivité biologique à l'échelle de la molécule unique

Rien ne fait voir l'avenir couleur
de rose
comme de le contempler à
travers un verre de chambertin

(Alexandre Dumas)

Introduction

Dans ce travail, nous avons entrepris de construire un appareil permettant d'étudier la réactivité de protéines en conditions de molécules uniques. C'est un objectif que de nombreux groupes de recherche ont déjà réalisé en proposant un certain nombre de techniques originales, sur lesquelles nous reviendrons rapidement ultérieurement (p. 9).

Nous allons d'abord introduire ici le cheminement scientifique qui nous a amenés à choisir un système cohérent et novateur de manipulation et d'observation de l'activité mécanique d'une certaine classe de protéines. Nous nous attacherons à expliquer pourquoi cette démarche nous semble intéressante pour la compréhension d'un certain nombre de caractéristiques biochimiques du vivant.

A cette échelle la physique, la biologie et la chimie proposent des grilles de lecture différentes issues de leur histoire propre. De manière générale, dans le corps de ce travail, nous nous attacherons à montrer combien la pratique expérimentale et théorique à la frontière de ces trois disciplines a été, et pourrait encore être, fructueuse pour leur ensemble.

Nous essaierons de montrer que, au delà de la contribution technologique de chacune des disciplines (par exemple l'optique appliquée à la microscopie ou la chimie appliquée à la synthèse de fluorophores), ces travaux, à leur tour, les enrichissent mutuellement de nouveaux modèles, et surtout de nouvelles problématiques.

A l'échelle de la molécule unique

Le cadre général de ce travail est une contribution à l'étude biochimique de certaines protéines. La plupart des techniques d'analyse biochimique utilisées sont issues du cadre conceptuel de la chimie analytique : à partir d'un modèle du comportement à l'échelle *moléculaire* (énergie d'activation d'une réaction, énergie d'interaction avec une phase stationnaire), est calculé le comportement moyen d'une assemblée de molécules (vitesse de réaction, temps de rétention dans une colonne).

L'observation du comportement collectif permet, par comparaison avec le modèle, de mesurer des paramètres moléculaires. En réalité, ces expériences ne permettent le plus souvent que de mesurer la valeur *moyenne* de ces paramètres moléculaires. Elles donnent parfois accès à l'écart-type, mais presque jamais à l'intégralité de la distribution.

Pourtant, contrairement à la plupart des objets étudiés en chimie analytique, les protéines sont des édifices moléculaires complexes, pas nécessairement bien caractérisés (repléments alternatifs, modifications post-traductionnelles, *etc.*). Une partie de leur

intérêt réside d'ailleurs dans la possibilité de moduler de façon importante leur activité par de petites modifications de structure.

Dans les cas où la distribution des activités est large autour de sa valeur moyenne, ne prendre en compte que cette dernière contribue à un *appauvrissement* de la description à l'échelle moléculaire : une vitesse moyenne mesurée sur un ensemble de protéines dont une fraction significative est inactive conduira à déduire une valeur individuelle éloignée de la réalité moléculaire. Cela compliquera l'intégration ultérieure de cette donnée dans un modèle plus général de la protéine, par exemple en lien avec des données structurales.

Dans un nombre restreint de cas, il est cependant possible d'effectuer une mesure de l'activité directement à l'échelle moléculaire, ce que nous appelons ici des «expériences en molécule unique». Nous rappellerons dans les prochains chapitres quelques techniques éprouvées permettant d'isoler une molécule parmi l'ensemble des autres et de mesurer son activité (p. 9 et 17). Par accumulation des données sur un certain nombre de molécules individuelles, la distribution des activités pourra ainsi être reconstituée, comparée aux données obtenues «en volume» (c'est à dire sur un grand nombre de molécules) et utilisée dans un modèle plus général de la protéine étudiée.

Lors de ce travail, nous avons construit un appareil combinant deux techniques classiques. Il comprend un micromanipulateur à pinces magnétiques qui permet de manipuler et d'observer des modifications mécaniques qui résultent de l'activité d'une protéine unique. Nous y avons adjoint un microscope de fluorescence qui permet d'observer, dans des cas favorables, la position et donc le déplacement d'une protéine unique consécutivement à son activité.

Bien qu'individuellement ces deux techniques soient déjà répandues, nous montrerons que leur utilisation combinée peut enrichir les informations observables sur certaines protéines.

Les translocases à ADN et protéines apparentées

Pour étudier une protéine en conditions de molécule unique, la difficulté principale réside dans la possibilité (ou non) de pouvoir isoler une molécule des autres pendant un temps suffisant pour réaliser une mesure. Il faut également que cette activité se traduise par une observable facilement mesurable, la contrepartie principale par rapport aux expériences «en volume» étant un signal très faible.

Historiquement, notre groupe de recherche a contribué au développement des pinces magnétiques pour l'étude de la physique statistique de l'ADN (p. 75). Notre appareil est le fruit de développements précédents, qui permettent de manipuler en torsion et en traction une molécule unique d'ADN, par le biais d'une bille magnétique qui la couple au monde macroscopique (p. 61).

En étudiant des protéines interagissant avec l'ADN, nous disposons ainsi d'un système où l'enzyme est séquestrée sur son substrat le temps de la mesure. Sous réserve que l'activité s'accompagne d'une modification de longueur de l'ADN, notre montage permet ainsi de mesurer l'activité en molécules uniques.

Les protéines présentant une telle activité sont à la fois très nombreuses et généralement d'un grand intérêt biologique, puisqu'elles sont par exemple impliquées dans la réplication (ADN polymérase), la transcription (ARN polymérase), la modification (gyrases, topoisomérase, ligase, enzymes de restriction), la réparation, *etc.* du génome. Cela explique le succès des pinces magnétiques comme technique d'étude, bien que les ADN translocases ne représentent finalement qu'une fraction faible du protéome.

Dans ce travail, nous avons essentiellement étudié deux protéines : FtsK (p. 167) et l'ARN Polymérase de T7 (p. 117). L'une comme l'autre ont déjà été extensivement

étudiées, dans des expériences en volume comme en molécule unique, mais des questions substantielles ont été soulevées par des études récentes sur leur mécanisme détaillé. Par ailleurs, en tant que système de «démonstration» pour notre montage, nous les avons choisies de telle manière qu'elles présentent un éventail de comportements le plus large possible. Nous en expliciterons les détails dans les chapitres consacrés à ces protéines.

Nous montrerons que les questions soulevées par les expériences présentées dans la littérature peuvent être étudiées grâce à un montage comme le nôtre, qui associe la manipulation et l'observation de l'activité mécanique (translocation, rotation) à la visualisation de la position de l'enzyme.

Résultats

L'étude des caractéristiques physiques de notre montage est réalisée pour évaluer dans quelle mesure il est compatible avec l'observation de l'activité biologique en conditions de molécules uniques (p. 85). Nous comparerons ces caractéristiques à l'état de l'art dans des montages équivalents et discuterons des possibilités d'extension à de nouvelles expériences.

Avant de procéder à l'étude de FtsK et de l'ARN Polymérase de T7 en combinant les deux techniques, nous avons effectué un certain nombre de mesures pour évaluer les propriétés biochimiques des variants que nous avons utilisés et les comparer aux données de la littérature (p. 133 et 183) sur les variants déjà connus. Nous avons également sondé un certain nombre de propriétés originales destinées à être utilisées spécifiquement dans nos expériences de molécule unique (p. 153 et 195).

Nous montrerons que le passage d'observations réalisée séparément avec l'une ou l'autre technique (pincés magnétiques ou microscopie de fluorescence) à des observations combinées a été très difficile. Nous expliciterons une partie des difficultés rencontrées lors de la préparation des protéines fluorescentes et les moyens que nous avons mis en oeuvre pour y remédier (p. 105).

Enfin, nous présenterons les protocoles que nous avons utilisés, améliorés ou mis au point pour l'ensemble des expériences effectuées dans ce travail (p. 225).

1 Techniques de micromanipulation

Introduction

A partir d'un raisonnement sur le concept de mesure mécanique de l'activité biologique, nous allons introduire ici les techniques de micromanipulation les plus courantes. Après un état de l'art rapide, nous expliquerons pourquoi notre choix s'est porté sur les pinces magnétiques et quelles en sont les caractéristiques générales.

La réactivité biochimique, au niveau du centre actif des protéines, est la traduction de déplacements électroniques stabilisant généralement l'état de transition (*cf.* Fig 1.1 p. 9).

Dans cette description, la fonction de la protéine ne serait que d'être une sorte de cargo transportant le centre actif, et ne prenant qu'une part passive à la réactivité (sous forme d'effets stériques statiques par exemple, guidant la réaction vers un certain chemin réactionnel). La catalyse biologique ne serait donc pas fondamentalement différente de la catalyse (in)organique purement chimique.

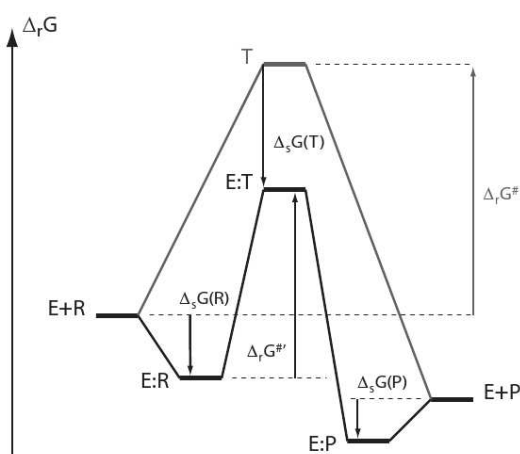


FIG. 1.1: Bilan énergétique de la catalyse enzymatique. L'enzyme (E) stabilise les réactifs (R), les produits (P) et l'état de transition (T). L'efficacité de la catalyse est liée à la capacité à stabiliser différenciellement le réactif (E:R) et l'état de transition (E:T), souvent précoce donc proche en structure des réactifs. Il est notable que la réaction inverse est généralement également catalysée, et avec une plus grande ampleur puisque les produits (EP) sont généralement mal stabilisés.

En réalité, le squelette de la protéine joue un rôle considérable, qui justifie le coût énergétique dépensé pour produire et maintenir ces immenses architectures autour de leurs petits centres actifs. Les effets statiques évoqués plus haut représentent une contribution importante à l'efficacité de la catalyse, et les études structurales actuelles (essentiellement statiques comme les rayons X ou la cryo-électromicroscopie) n'ont pas encore fini d'explorer cet aspect de la réactivité.

Mais la véritable richesse des protéines consiste en leur capacité à coupler dynamiquement des modes locaux (électroniques et vibrationnels au niveau du centre actif) avec

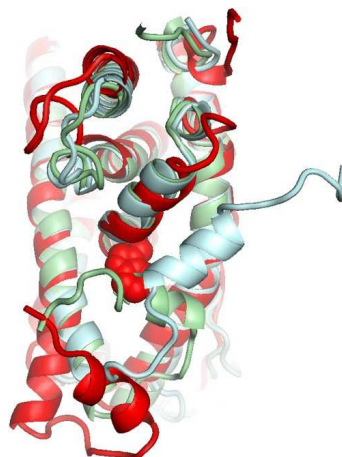


FIG. 1.2: Couplage dynamique avec un mode à grande échelle : mouvement de l'hélice 12 du *Estrogen Receptor* consécutif à l'interaction avec son ligand (en bleu pâle : avant interaction, en rouge : après interaction). Reproduit de (Ho 2009) Fig.9.

des modes de déformation globaux du squelette : rotation d'hélice α , déstabilisation sélective de sous-unités d'une holoenzyme, etc. (Brooks 1985; Brünger 1985; Xu 2003). Cette notion d'*allostérie* (Monod 1965; Swain 2006) est également fondamentale dans la compréhension de la régulation dynamique de la réactivité à l'échelle moléculaire, un concept qui est loin d'être encore maîtrisé en catalyse organique ou inorganique purement chimique.

1.1 Questions d'échelle

1.1.1 Longueurs

Que nous cherchions à sonder la réactivité moléculaire au niveau du centre actif ou de la protéine globale, les déplacements mécaniques restent au plus de l'ordre du nanomètre. Dans une expérience en volume, il faudrait discriminer des populations avec une résolution d'au moins 0.1 nm ; par des méthodes électromagnétiques, cela impose l'utilisation de rayons X, de faisceaux d'électrons ou de neutrons. Ces méthodes sont peu compatibles avec un contexte biologique.

En complément des techniques précédentes, la manipulation d'une unique molécule par une sonde mécanique permet une observation directe de la réaction. En soi, la détection mécanique de déplacements nanométriques n'est pas problématique (on en verra des exemples ci-dessous, ainsi que la détection par des méthodes d'imagerie de fluorescence). Mais la fabrication de sondes mécaniques (sub-)nanométriques utilisables dans un contexte biologique demeure relativement difficile. De même, leur couplage à un appareil de mesure à échelle humaine est souvent fastidieux.

Le compromis idéal consiste à coupler la protéine à un *actuateur*, c'est à dire un objet d'une part assez grand pour qu'il puisse être fabriqué et manipulé aisément, et d'autre part assez petit pour coupler avec une résolution suffisante avec les changements de conformation de la protéine.

1.1.2 Actuateurs

Une idée relativement naturelle est d'utiliser des actuateurs élastiques qui permettent d'exercer des forces et de mesurer les déplacements. La raideur k de ces systèmes est donnée par la balance

$$k\langle x^2 \rangle = k_B T \Rightarrow k \sim \frac{k_B T}{\delta x^2} \quad (1.1)$$

L'ordre de grandeur correspondant à une résolution $\delta x = 0.1 - 1$ nm est $k \sim 10^{-2} \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$. Dans le cas d'actuateurs mécaniques, des systèmes à grand rapport d'aspect (typiquement 100-1000) permettent de coupler des déplacements nanométriques à des objets micrométriques.

Ces éléments se comportent globalement comme des poutres élastiques de rayon R et de longueur L , dont la raideur est de l'ordre de

$$k \sim E \frac{R^4}{L^3} \quad (1.2)$$

Pour des matériaux standard, le module d'YOUNG E étant de l'ordre de 10 GPa, les actuateurs adaptés à la raideur souhaitée sont les fibres optiques ($L = 1$ mm et $R \sim 1 \mu\text{m}$, cf. 1.2 p.12) et les poutres d'AFM ($L = 100 \mu\text{m}$ et $R \sim 100$ nm, cf. 1.3 p.13)

Des actuateurs non-mécaniques peuvent également être utilisés ; dans ce cas, la force est transmise à l'actuateur *via* un champ extérieur : faisceau laser dans le cas des pinces optiques (p. 13), champ magnétique dans le cas des pinces magnétiques (p. 14). Dans ces deux cas, la dimension de l'actuateur est surtout déterminée par sa capacité à coupler suffisamment fortement avec le champ, qui dépend en bonne approximation du produit du volume et de la constante de couplage matière-rayonnement. Ces actuateurs sont donc plutôt à faible rapport d'aspect (billes sphériques généralement) et de dimension micrométrique.

1.1.3 Pourquoi l'ADN

Pour pouvoir avoir une raideur adaptée, ces actuateurs sont donc contraints à être au moins deux ordres de grandeur plus gros que les protéines sur lesquelles ils doivent agir. Or ils sont supposés pouvoir coupler très spécifiquement avec certains éléments structuraux de la protéine étudiée (hélice mobile, entrée d'un pore, etc.). Cette différence de taille et la non-spécificité de la surface de l'actuateur (silicium, polystyrène, verre) rendent expérimentalement ce couplage délicat. Il peut être parfois réalisé dans le cas de l'AFM (Puchner 2009) qui possède une pointe très fine et spécifiquement fonctionnalisable, mais cela n'entre pas dans le cadre de notre travail.

Ces méthodes de micromanipulation ne sont donc pas des systèmes universels qui permettraient d'étudier n'importe quel déplacement spatial induit par n'importe quelle réaction. En revanche, il existe un certain nombre de classes de protéines qui interagissent avec des macromolécules à grand rapport d'aspect comme l'ADN, l'actine, les microtubules, etc. Sous réserve que la réaction étudiée soit couplée à un déplacement de cette macromolécule, celle-ci va coupler relativement passivement la protéine au micromanipulateur (nous discuterons de l'opportunité de ce terme au chapitre 4 p.75).

L'ADN étant une molécule tellement centrale dans le fonctionnement de la cellule, nous disposons parmi les protéines qui interagissent avec lui de beaux défis scientifiques en biologie moléculaire : le réplisome, le transcriptome, l'étude de la régulation de la transcription, l'infection par les virus, etc. Avant de préciser dans le chapitre 3 le travail effectué dans cette thèse, nous allons détailler rapidement les caractéristiques de quelques techniques de micromanipulation.

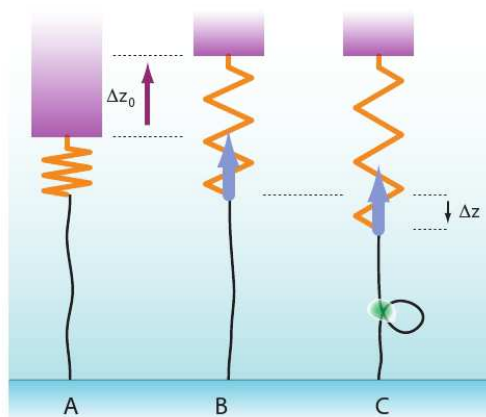


FIG. 1.3: Utilisation d'un ADN pour effectuer un couplage mécanique entre une protéine et un dispositif de micromanipulation. [A] Un actuateur (orange, représenté à échelle très réduite) est couplé au monde macroscopique (violet). Cet actuateur est également couplé à une macromolécule à grand rapport d'aspect (noir). [B] Sous l'effet d'une sollicitation macroscopique Δz_0 (flèche violette) l'actuateur exerce une tension (flèche bleue) sur la macromolécule. [C] L'action d'une protéine (vert) engendre un déplacement Δz microscopique mais mesurable de l'actuateur.

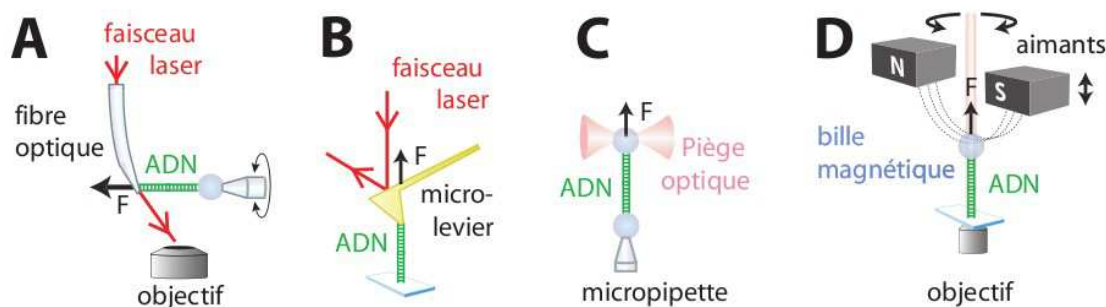


FIG. 1.4: Représentation schématique des principales techniques de micromanipulation de l'ADN. **A** : Microfibre optique. **B** : Microscopie à force atomique (AFM). **C** : Pinces optiques. **D** : Pinces magnétiques.

1.2 Microfibre optique

Dans cette technique l'ADN est maintenu par une extrémité à une micropipette, et à l'autre à une microfibre optique (*cf.* fig.1.4A et (Cluzel 1996; Leger 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, qui est recueilli dans un objectif de microscope. La déflexion du faisceau permet de remonter à la force exercée sur l'ADN en utilisant la raideur de courbure de la fibre.

La raideur est calibrée au préalable par analyse des fluctuations de position dues au mouvement brownien, ou bien 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^{-3} et 10 pN·nm⁻¹ (Cluzel 1996; Essevaz-Roulet 1997).

1.3 Microscopie à force atomique (AFM)

Le microscope à force atomique a été conçu dans le but d'imager des surfaces (avec une résolution atomique) (Binnig 1986). On peut en effet avoir accès au relief d'une surface en la balayant avec une pointe de taille submicrométrique et en enregistrant les déplacements de la pointe, comme la tête d'une platine sur un disque vinyle. Ce dispositif permet aussi de mesurer les forces nécessaires pour étirer une molécule ou briser une liaison covalente (*cf.* fig.1.4B et (Moy 1994)).

La molécule d'intérêt, par exemple une molécule d'ADN, est ancrée d'une part à la surface de l'échantillon et d'autre part à la pointe du micro-levier (Rief 1999). Celui-ci mesure typiquement 100 μm de long, 5 μm de large, et 100 nm d'épaisseur (Viani 1999). On envoie un faisceau laser sur le micro-levier, et on recueille le faisceau réfléchi, dont on enregistre la position. Lorsque l'on déplace l'échantillon par rapport au levier, celui-ci se courbe sous l'effet de la force exercée sur l'ADN. La déflexion du faisceau laser permet après calibration, de même que pour la microfibre, de remonter à la force exercée. La gamme des raideurs accessibles par ces déflecteurs varie de 1 à 10^3 pN·nm⁻¹.

1.4 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 (*cf.* Fig. 1.4C et (Svoboda 1994; Molloy 2002; Neuman 2004)). Le gradient de champ électrique résultant permet de piéger au voisinage du point focal une particule dont l'indice de réfraction est plus important que celui du milieu environnant (typiquement des billes de polystyrène dans l'eau).

Il est possible d'utiliser des particules mesurant quelques centaines de nanomètres, et d'y greffer une molécule d'ADN. En fixant l'autre extrémité de l'ADN à une bille maintenue à la pointe d'une micropipette, on obtient un système qui permet de tirer sur l'ADN. Les pincettes optiques constituent donc naturellement un système de micro-manipulation 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.

La raideur de ce système est imposée par le potentiel d'interaction entre la bille et le faisceau. Elle peut être réglée facilement 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^{-2} à 10 pN·nm⁻¹ (Molloy 2002; Abbondanzieri 2005a). Il faut dans un premier temps calibrer la raideur du piège (différente pour chaque bille) avant de mesurer le déplacement de l'actuateur (la bille) et d'en déduire la force.

On peut noter toutefois qu'une version améliorée du dispositif utilisant deux faisceaux se propageant dans des directions opposées permet, en récoltant la lumière diffusée par la bille, de calculer la force exercée en utilisant une calibration indépendante de la bille (Smith 2003).

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 à cet effet. La première consiste à utiliser des particules biréfringentes qui vont pouvoir effectuer un transfert 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 2002). Ce type d'approche permet aussi la mesure du couple exercé (La Porta 2004; Funk 2009).

1.5 Pincés magnétiques

L'actuateur est une bille superparamagnétique (de dimension $\sim 1 \mu\text{m}$) (*cf.* fig.1.4D). Un couple d'aimants permanents placés au-dessus de l'échantillon génère un gradient de champ magnétique. La bille est alors soumise d'une part à une force dans la direction de ce gradient et d'autre part à un couple qui oriente son moment magnétique dans la direction du champ magnétique (*cf.* 3 p.61) (Gosse 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 ($\sim 1 \mu\text{m}$), le gradient de 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 pincés 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. Notons toutefois que l'existence de systèmes de rétroaction permet d'une part d'exercer une force constante à l'aide de pincés optiques (Neuman 2004; Nambiar 2004; Greenleaf 2005), et d'autre part de piéger spatialement une bille à l'aide d'aimants (Gosse 2002). 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 (*cf.* 3.5.2 p.69). La raideur de l'actuateur dépend 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 transverse vaut quelques $10^{-3} \text{ pN}\cdot\text{nm}^{-1}$. Cette raideur augmente de manière importante avec la force : à 10 pN, elle vaut environ $1 \text{ pN}\cdot\text{nm}^{-1}$.

1.6 Comparaison

1.6.1 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, AFM et pincés optiques) et celles qui réalisent l'opération inverse (les pincés magnétiques). Travailler dans des conditions où la force est constante est souvent pratique en biologie, les pincés 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 pincés magnétiques permettent d'exercer une contrainte de torsion sur la molécule piégée de manière extrêmement simple.

Technique	OF	AFM	OT	MT
Conditions Bio	Natif	Possible	Natif	Natif
Traction applicable	Oui	Oui	Oui	Oui
Paramètre imposé	Position	Position	Position	Force
Force mesurable	Avec calib.	Avec calib.	Avec calib.	Sans calib.
Raideur (pN/nm)	10^{-3} –10	1– 10^3	10^{-2} –10 (réglable)	10^{-3} –1 (réglable)
Torsion applicable	Oui	Non	Oui	Oui
Paramètre imposé	Rotation	-	Rotation/Couple	Rotation
Couple mesurable	Non	-	Oui	Difficile
Parallélisation	Non	Non	Oui	Haute ($\geq 50\times$)

TAB. 1.1: Comparaison des différentes techniques de micromanipulation : *Optical Fiber* (OF), *Atomic Force Microscope* (AFM), *Optical Tweezers* (OT) et *Magnetic tweezers* (MT). Les informations représentent le comportement natif de ces dispositifs : il est par exemple possible de réaliser des pinces optiques à force imposée ou des pinces magnétiques à couple mesurable.

1.6.2 Résolution force-bande passante

La résolution ultime en force d'une technique est déterminée par la force de Langevin. Celle-ci est liée à la fréquence de coupure ω_C du système par (*cf.* eq. 4.9 p.78)

$$F_L \propto \sqrt{\eta L k_B T \omega_C} \quad (1.3)$$

La viscosité et la température sont des paramètres imposés par la biologie (les expériences sont effectuées dans l'eau à 25 ou 37°C). Pour échantillonner correctement, il faut imposer une fréquence de coupure supérieure à la fréquence caractéristique du phénomène observé (typiquement 1-100 Hz). Le paramètre de contrôle restant est la taille L 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 1998), mais peut descendre à une fraction de pN en réduisant la bande passante à quelques Hz (Essevaz-Roulet 1997).

La résolution offerte par l'AFM est elle aussi de l'ordre de quelques pN pour une bande passante de l'ordre de la centaine de Hz.

Pour les pinces optiques, la résolution typique en force vaut 0.1 pN (bille de 1 μm 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 ; la précision de la mesure de force n'est donc pas dépendante de la fréquence caractéristique du phénomène observé 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 (voir chapitre suivant). La force maximale mesurable pour une bille de diamètre 1 μm attachée à une molécule de longueur 1 μm vaut typiquement quelques pN pour une bande passante de 60 Hz.

1.6.3 Résolution spatiale

La limite théorique de résolution des méthodes de microscopie optique utilisées dans les techniques de micromanipulation est de l'ordre de 200 nm, cependant cette valeur limite

le *pouvoir de séparation* de deux objets proches ; elle ne limite donc 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 particule permettent en général de trouver la position d'une particule de taille de l'ordre de $1 \mu\text{m}$ avec une précision de l'ordre du nanomètre dans la gamme des bandes passantes typiques (*cf.* 5.1.9 p. 93).

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 par une balance des forces

$$k\sqrt{\langle\Delta x^2\rangle} \sim \sqrt{\eta L k_B T \omega_C} \quad (1.4)$$

1.6.4 Conclusion

En concevant le montage expérimental pour ce travail, nous avons souhaité combiner la mesure d'activité mécanique sur une molécule unique à un positionnement en microscopie de fluorescence.

Par son caractère de mesure à force constante, le système de pinces magnétiques était un choix naturel de micromanipulateur. Par ailleurs, la volonté d'effectuer des mesures en présence de torsion dans l'ADN a conforté ce choix.

Dans l'absolu, un système comparable aurait pu être réalisé par des pinces optiques, avec cependant comme désavantage la présence des LASER intenses ($\sim 1\text{W}$) utilisés pour le piège optique ; nous avons ainsi fait le choix d'utiliser l'expérience déjà acquise dans notre groupe sur les appareils de pinces magnétiques, pour concentrer notre effort sur leur intégration sur un système de microscopie de fluorescence.

2 Détection de molécules uniques par fluorescence

Un état de l'art

Le théisme est l'art de cacher la beauté que l'on est capable de découvrir, et de suggérer celle que l'on n'ose pas révéler.

(Kazuko, Le Livre du Thé)

Introduction

Nous allons dans ce chapitre décrire de manière générale les principales caractéristiques du phénomène de fluorescence et l'utilité qu'il a dans les expériences en molécules uniques. Nous allons aussi présenter les principales techniques d'excitation et d'observation de fluorescence existantes et expliciter celles que nous avons choisies. Nous décrirons également succinctement les caractéristiques des équipements de détection pour expliquer les choix technologiques que nous avons effectués pour construire notre montage.

La précision de positionnement d'une source lumineuse augmente avec le nombre de photons collectés par le détecteur (Thompson 2002). Les progrès accomplis dans la production de fluorophores plus brillants et plus stables ont permis d'effectuer des mesures de localisation de plus en plus précises spatialement et temporellement jusqu'à descendre simultanément sous la limite du nanomètre et de la dizaine de milli-secondes (Yildiz 2003; Yildiz 2004; Churchman 2005; Betzig 2006; Rust 2006).

Parallèlement, des techniques d'excitation sophistiquées mettant en jeu des propriétés physico-chimiques très précises des fluorophores ont été développées (Dyba 2002; Gordon 2004; Churchman 2005; Hell 2009). Elles introduisent dans l'image des longueurs caractéristiques bien plus petites que la longueur d'onde de la lumière visible et augmentent ainsi la précision du positionnement.

Par ailleurs, l'augmentation de la sensibilité des détecteurs, amenant certains à un rendement quantique proche de l'unité (APD, EM-CCD), permet la détection de signaux faibles comme ceux de fluorescence d'une molécule unique (Földes-Papp 2001; Kaji 2009; Koutsopoulos 2009), avec un signal d'environ 10 kHz. La généralisation des détecteurs refroidis permet de diminuer l'influence du bruit thermique sur les signaux faibles. Cette sensibilité, conjuguée à des cadences d'acquisition de plus en plus élevées — notamment en imagerie par CCD à double matrice et transfert de trame — permet à précision constante des mesures de plus en plus rapides (typiquement 10MHz/pix).

2.1 Introduction à la fluorescence

Les bases physiques de la fluorescence sont bien comprises; nous allons les décrire rapidement. Elles reposent principalement sur le découplage entre différentes échelles de temps et d'énergie (Gell 2006).

2.1.1 Principe de la fluorescence

Dans une petite molécule organique, la séparation entre niveaux électroniques correspond à des transitions dans le proche ultraviolet et le visible, c'est à dire $\lambda \in [100 \text{ nm} ; 1000 \text{ nm}]$. Ces transitions, d'énergie comprise entre 50 et 500 $k_B T$, ne peuvent pas être excitées thermiquement. Le niveau fondamental est généralement singulet de spin et noté S_0 . Les premiers niveaux excités singulet et triplet sont notés S_1 et T_1 respectivement.

Pour chaque niveau électronique, des sous-niveaux vibrationnels $v \in \mathbb{N}$ sont excitables dans l'infrarouge moyen ($\lambda \sim 5 \mu m$), correspondant à des énergies d'environ 10 $k_B T$. Les niveaux excités sont peu peuplés thermiquement.

En plus, les niveaux rotationnels globaux de la molécule sont excitables dans les micro-ondes et sont notablement peuplés thermiquement. Dans la suite de ce chapitre, nous les considérerons comme dégénérés à l'échelle d'énergie des niveaux vibrationnels.

Le couplage d'un photon visible avec la molécule peut conduire à une transition $S_0(v=0) \rightarrow S_1$. La transition $S_0 \rightarrow T_1$ est *interdite de spin*. Des considérations thermodynamiques indiquent que la transition la plus probable (correspondant à la longueur d'onde d'absorption maximale dans le spectre) est la transition *adiabatique* entre le fondamental vibrationnel de S_0 et le fondamental vibrationnel de S_1 : $S_0(v=0) \rightarrow S_1(v=0)$.

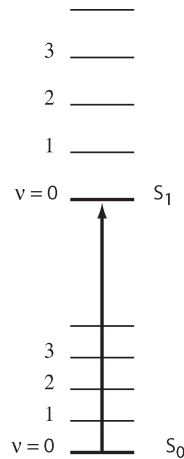


FIG. 2.1: Transition d'absorption adiabatique d'un photon $S_0(v=0) \rightarrow S_1(v=0)$.

Expérimentalement, l'absorption préférentielle se fait à énergie plus importante (c'est à dire à longueur d'onde plus courte) que la transition adiabatique. En effet, l'énergie électronique des niveaux S_0 et S_1 dépend de la conformation de la molécule. On note \mathbf{r} un paramètre d'ordre spatial qui caractérise la conformation des noyaux atomiques [1]. Au voisinage de la conformation d'équilibre, cette énergie est minimale et peut être représentée comme un puits parabolique centré sur \mathbf{r}_{eq} avec les niveaux vibrationnels associés (*cf.* Fig 2.2 p. 19).

Rien n'impose à $\mathbf{r}_{eq}(S_0)$ d'être identique à $\mathbf{r}_{eq}(S_1)$. Comme la transition électronique se fait à l'échelle de $\tau_{S_0 \rightarrow S_1} = 10^{-15} \text{ s}$ et la réorganisation vibrationnelle des noyaux à l'échelle de $10^{-12} - 10^{-10} \text{ s}$, les noyaux atomiques n'ont pas le temps de changer de position pendant le temps de l'absorption du photon.

Dans cette approximation de type BORN-OPPENHEIMER, la transition $S_0 \rightarrow S_1$ se fait à \mathbf{r} constant et égal à $\mathbf{r}_{eq}(S_0)$. On parle de *transition verticale*. Par les mêmes considérations

¹La coordonnée spatiale pertinente \mathbf{r} est le vecteur propre correspondant à la valeur propre maximale de la matrice jacobienne de l'énergie en fonction des coordonnées des noyaux atomiques.

thermodynamiques que précédemment, la transition la plus probable, donc correspondant à la longueur d'onde d'absorption maximale, se fait pour $S_0(v = 0, r = r_{eq}(S_0)) \rightarrow S_1(v \neq 0, r = r_{eq}(S_0))$ et aboutit à un état vibrationnel excité de S_1 (la transition n'est pas adiabatique).

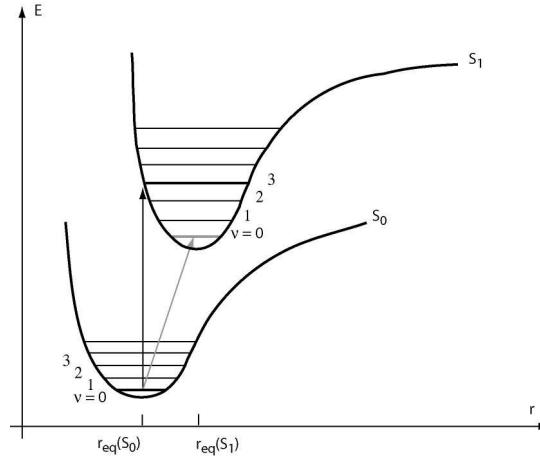


FIG. 2.2: Transitions d'absorption verticale (noir) et adiabatique (gris) dans un système singulet de spin.

Par couplage vibrationnel avec le solvant, la molécule subit une transition *non radiative* appelée *relaxation vibrationnelle* (cf. Fig 2.3 p. 20) vers l'état vibrationnel fondamental de S_1 : $S_1(v \neq 0, r = r_{eq}(S_0)) \rightarrow S_1(v = 0, r = r_{eq}(S_1))$. Le temps caractéristique de cette transition est de l'ordre de $\tau_{RV} = 10^{-12} - 10^{-10}$ s. L'état obtenu est instable et peut se désexciter en émettant un photon selon une transition *verticale* $S_1(v = 0, r = r_{eq}(S_1)) \rightarrow S_0(v \neq 0, r = r_{eq}(S_1))$ avec un temps caractéristique $\tau_{S_1 \rightarrow S_0} = 10^{-10} - 10^{-7}$ s. La molécule subit finalement une désexcitation non radiative $S_0(v \neq 0, r = r_{eq}(S_1)) \rightarrow S_0(v = 0, r = r_{eq}(S_0))$ pour retourner à son état fondamental.

Du fait de l'énergie perdue dans les transitions non radiatives, l'énergie du photon émis par fluorescence est plus basse que celle du photon absorbé. Cette différence est appelée *décalage de STOKES*. Il est généralement de l'ordre de 15-50 nm. Les spectres d'absorption et d'émission présentent donc des maxima disjoints.

2.1.2 Quantification de l'absorbance

Soit un volume de base S et de profondeur l de solution éclairé par une densité surfacique de flux de photons J_E , le débit de photons entrants vaut

$$\frac{dn}{dt} = J_E \cdot S \quad (2.1)$$

En notant J_S la densité surfacique de flux de photons sortant de ce volume, la variation totale du nombre de photons vaut $(J_S - J_E) \cdot S$. En régime *stationnaire*, cette quantité s'équilibre exactement avec le nombre de photons absorbés par les fluorophores présents à la concentration $[c]$ (en l'absence d'autres phénomènes comme la fluorescence ou l'émission stimulée).

Cette quantité s'exprime simplement comme le produit du nombre de fluorophores $[c]Sl$ par une constante de vitesse d'absorption des photons k_+

$$J_E S \cdot \left(\frac{J_S}{J_E} - 1 \right) = k_+ \cdot [c]Sl \quad (2.2)$$

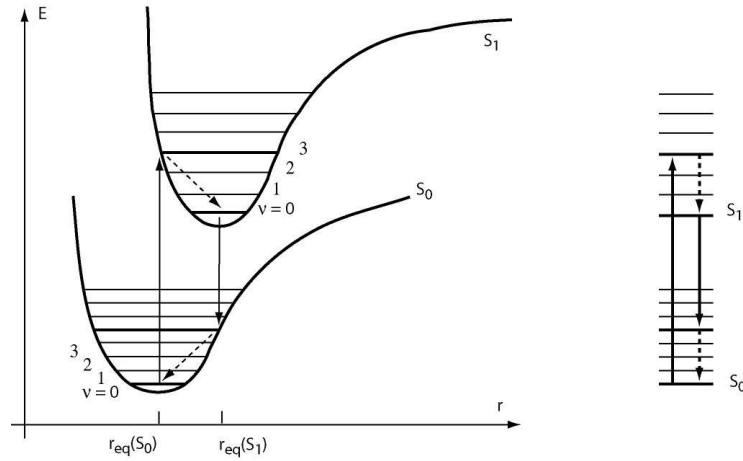


FIG. 2.3: [G] Sous l'effet de l'absorption d'un photon d'excitation, le système subit une transition verticale (trait plein) $S_0 \rightarrow S_1$ suivie d'une relaxation vibrationnelle (pointillé). Une seconde transition verticale (trait plein) correspond à l'émission radiative d'un photon de fluorescence. Cette émission est suivie d'une relaxation vibrationnelle (pointillé) dans l'état S_0 . [D] Représentation équivalente du cycle de fluorescence sans mention de la coordonnée spatiale.

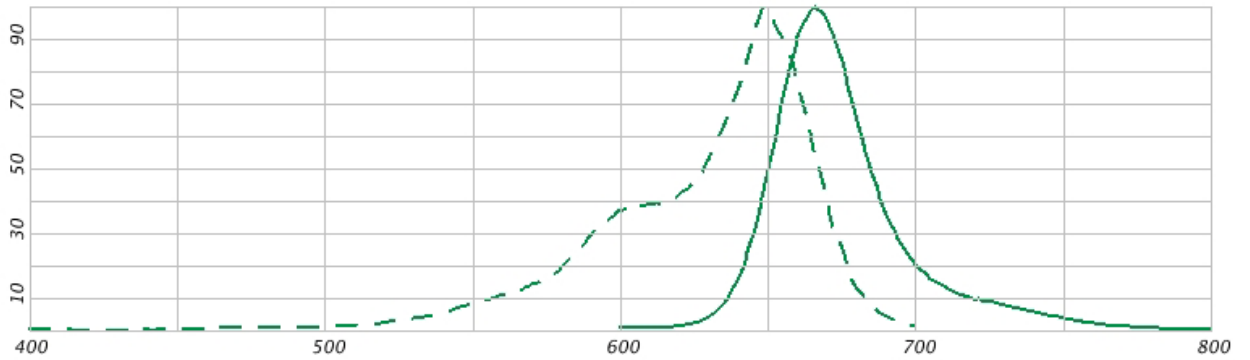


FIG. 2.4: Spectre d'absorption (tireté) et d'émission de fluorescence (plein) de Cy5 en fonction de la longueur d'onde (nm). Les ordonnées sont normalisées à 100% respectivement au maximum d'absorption et d'émission. Reproduit de *Molecular Probes (Invitrogen)*.

Par définition, on appelle *absorbance* A la quantité $A = \log(J_S/J_E)$. Dans la limite des solutions diluées et pour l'absorption à un photon, la loi de BEER-LAMBERT relie simplement A à $[c]$ par la relation (2.24) : $A = \epsilon[c]l$. La valeur de ϵ contient intégralement le comportement spécifique du fluorophore vis-à-vis de l'absorption de photons.

Dans la limite des faibles absorbances, la relation 2.2 peut donc être réécrite

$$J_E S \cdot \epsilon [c] l \cdot \ln 10 \approx k_+ \cdot [c] S l \quad (2.3)$$

Et donc $k_+ = J_E \cdot \epsilon \cdot \ln 10$. Pour une section efficace d'absorption σ pour chaque molécule, k_+ s'écrit comme le produit du débit de photons atteignant la molécule $\Phi_E =$

$J_E \cdot \sigma$ par une constante $k_{S_0 \rightarrow S_1}$ indépendante de l'éclairement qui vérifie finalement

$$\frac{dn}{dt} = (J_S - J_E) \cdot S = -k_{S_0 \rightarrow S_1} \cdot [c] \cdot \Phi_E \quad (2.4)$$

$$k_{S_0 \rightarrow S_1} = \frac{\epsilon \cdot \ln 10}{\sigma} \quad (2.5)$$

Pour un fluorophore organique classique, $\epsilon \approx 10^5 \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et $\sigma \approx 1 \text{nm}^2$, donc $k_{S_0 \rightarrow S_1} \approx 10^{22} \text{mol}^{-1} \text{s}^{-1} \equiv 10^{-2}$.

2.1.3 Rendement quantique et brillance

La désexcitation de l'état $S_1(v=0, r=r_{eq}(S_1))$ vers S_0 n'est pas forcément radiative. Si des couplages suffisants existent entre le niveau vibrationnel fondamental de S_1 et les niveaux excités de S_0 , une transition non radiative appelée *conversion interne* est possible (cf. Fig 2.5 p. 21), conduisant à un retour progressif vers l'état fondamental $S_0(v=0, r=r_{eq}(S_0))$ sans émission de photon. Le temps caractéristique du couplage S_0/S_1 est de l'ordre de $\tau_{CI} = 10^{-11} - 10^{-9} \text{s}$.

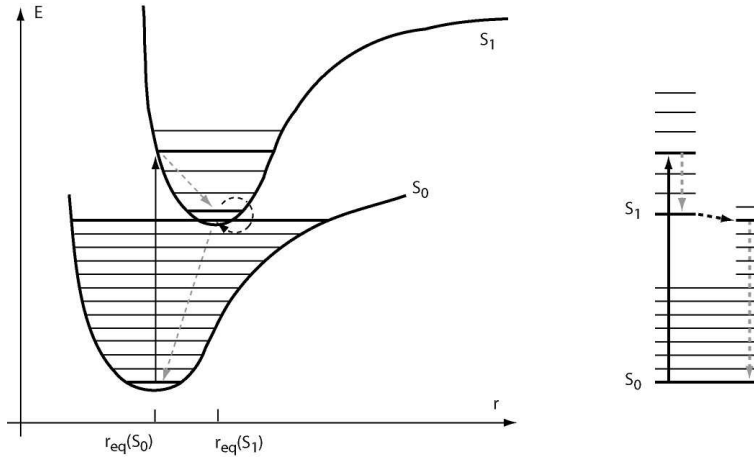


FIG. 2.5: [Gauche] Sous l'effet de l'absorption d'un photon d'excitation, le système subit une transition verticale (trait plein) $S_0 \rightarrow S_1$ suivie d'une relaxation vibrationnelle (tireté gris). Une conversion interne (tireté noir) entre les états S_1 (gris) et S_0 (noir) suivie d'une relaxation vibrationnelle (tireté gris) dans l'état S_0 permettent une désexcitation non radiative. [Droite] Représentation équivalente du cycle de désexcitation non radiative sans mention de la coordonnée spatiale.

De manière analogue, s'il existe un r_C tel que $E(S_1, r = r_C) = E(T_1, r = r_C)$, la transition interdite de spin $S_1(v \neq 0, r = r_C) \rightarrow T_1(v \neq 0, r = r_C)$ peut être réalisée par *couplage spin-orbite* ou *Croisement Inter-Système* (cf. Fig 2.6 p. 22), avec un temps caractéristique $\tau_{S_1 \rightarrow T_1} = 10^{-10} - 10^{-8} \text{s}$.

Enfin, des couplages électroniques entre l'état S_1 et d'autres molécules présentes dans le milieu (solvant, molécules dans l'état S_0 , etc.) peuvent conduire à des transitions plus compliquées : dimérisation $M_{S_0}M_{S_1}$, formation d'états sombres par formation de radicaux, photodestruction à l'état singulet, etc. Ces transitions, éventuellement réversibles, ont pour conséquence l'obtention d'un état non-fluorescent.

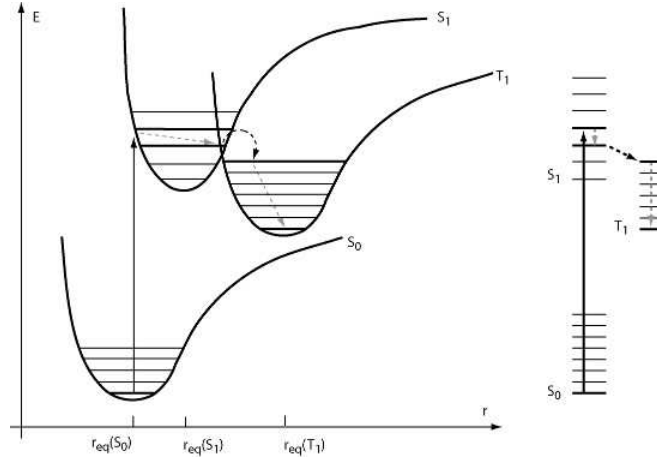


FIG. 2.6: [Gauche] Sous l'effet de l'absorption d'un photon d'excitation, le système subit une transition verticale (trait plein) $S_0 \rightarrow S_1$ suivie d'une relaxation vibrationnelle (tireté gris). Un croisement inter-système (tireté noir) entre les états S_1 (gris) et T_1 (noir) suivi d'une relaxation vibrationnelle (tireté gris) dans l'état T_1 permet le passage vers le fondamental vibrationnel de l'état triplet. [Droite] Représentation équivalente du passage vers l'état triplet sans mention de la coordonnée spatiale.

Globalement, les équations différentielles gouvernant la concentration des espèces sont

$$\partial_t[S_0(r_{eq}(S_0))] = -k_{S_0 \rightarrow S_1} \cdot [S_0(r_{eq}(S_0))] \cdot \Phi_E + k_{CI} \cdot [S_0(r_{eq}(S_1))] \quad (2.6)$$

$$\partial_t[S_1(r_{eq}(S_0))] = k_{S_0 \rightarrow S_1} \cdot [S_0(r_{eq}(S_0))] \cdot \Phi_E - k_{CI} \cdot [S_1(r_{eq}(S_0))] \quad (2.7)$$

$$\partial_t[S_1(r_{eq}(S_1))] = k_{RV} \cdot [S_1(r_{eq}(S_0))] - k_{S_1 \rightarrow X} \cdot [S_1(r_{eq}(S_1))] - k_{S_1 \rightarrow S_0} \cdot [S_1(r_{eq}(S_1))] \quad (2.8)$$

$$\partial_t[S_0(r_{eq}(S_1))] = k_{S_1 \rightarrow S_0} \cdot [S_1(r_{eq}(S_1))] - k_{CI} \cdot [S_0(r_{eq}(S_1))] \quad (2.9)$$

$$\Phi_F = k_{S_1 \rightarrow S_0} \cdot [S_1(r_{eq}(S_1))] \quad (2.10)$$

$$\Phi_A = k_{S_0 \rightarrow S_1} \cdot [S_0(r_{eq}(S_0))] \cdot \Phi_E \quad (2.11)$$

Φ_E désigne le flux de photons reçu par la molécule (qui est différent du flux absorbé Φ_A) et Φ_F le flux émis par la molécule par fluorescence. $k_{S_1 \rightarrow X}$ désigne de manière générale tous les processus conduisant à une desexcitation sans émission de photon de fluorescence. Cette constante peut contenir des termes dépendant des concentrations d'espèces présentes dans le milieu, comme par exemple dans les relations de STERN-VOLMER (Stern 1919).

Le temps caractéristique τ_t du régime transitoire est de l'ordre de $\max(k_i^{-1})$. En l'absence de transitions compliquées, $\tau_t \approx 10^{-10} - 10^{-7}$ s. En régime permanent, les équations 2.11 conduisent à

$$\Phi_F = \frac{k_{S_1 \rightarrow S_0}}{k_{S_1 \rightarrow S_0} + k_{S_1 \rightarrow X}} \cdot \Phi_A \quad (2.12)$$

On appelle respectivement *rendement quantique de fluorescence* et *brillance* les quantités

$$\phi_F = \frac{\Phi_F}{\Phi_A} = \frac{k_{S_1 \rightarrow S_0}}{k_{S_1 \rightarrow S_0} + k_{S_1 \rightarrow X}} \quad (2.13)$$

$$Q = \frac{\Phi_F}{\Phi_E} \equiv k_{S_0 \rightarrow S_1} \cdot \phi_F \quad (2.14)$$

Le rendement quantique de fluorescence peut être interprété comme le nombre de photons de fluorescence émis *sachant qu'un photon a été absorbé*. La brillance renseigne sur la capacité conjuguée d'une molécule à absorber un photon et à le réémettre par fluorescence ; elle est exprimée en photons par molécule.

2.1.4 Etat électronique du fluorophore

Dans un modèle à deux niveaux en régime permanent, la population relative du premier état singulet S_1 est donnée par

$$\frac{[S_1]}{[S_0]} \approx \frac{k_{S_0 \rightarrow S_1} \cdot \Phi_E}{k_{S_1 \rightarrow S_0}} \quad (2.15)$$

Pour un faisceau LASER de puissance $\mathcal{P} = 1$ mW de longueur d'onde $\lambda = 400$ nm et de largeur $w \approx \lambda$, une molécule de section efficace $\epsilon = 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} = (0,1 \text{ nm})^2$ est traversée par une densité de courant de photons de l'ordre de

$$\Phi_E \approx \frac{\mathcal{P} \cdot \lambda \cdot \epsilon}{w^2 \cdot h \cdot c \cdot \mathcal{N}_A} = 10^8 \text{ s}^{-1} \quad (2.16)$$

Par ailleurs, nous avons rappelé précédemment (2.1.2) que $k_{S_0 \rightarrow S_1} \approx 10^{-2}$. Enfin, $k_{S_1 \rightarrow S_0}^{-1}$ est de l'ordre de grandeur de la durée de vie de fluorescence, soit environ 10^{-10} s.

Par conséquent $\frac{[S_1]}{[S_0]} \approx 10^{-4}$. En régime stationnaire, *la très grande majorité des molécules se trouve dans l'état fondamental* S_0 . La réactivité physico-chimique du fluorophore sous irradiation est donc presque entièrement déterminée par celle de S_0 .

2.1.5 Photodestruction

Tout processus *irréversible* $S_1 \rightarrow X$ est appelé *photodestruction* ou *photoblanchiment*. Comme la molécule se trouve essentiellement dans son état fondamental S_0 , ces réactions sont relativement rares. Le *rendement quantique de photodestruction* ϕ_d est défini comme la probabilité de détruire la molécule par $S_1 \rightarrow X$ sachant qu'elle se trouve dans l'état S_1

$$\phi_d = \frac{k_{S_1 \rightarrow X}}{k_{S_1 \rightarrow X} + k_{S_1 \rightarrow S_0}} \quad (2.17)$$

Par conséquent, ϕ_d^{-1} est une mesure du nombre de photons émis par la molécule avant photodestruction (valeur moyenne d'un processus Poissonien).

Il existe deux principaux mécanismes de photodestruction : la réaction chimique dans l'état S_1 et la conversion vers l'état triplet T_1 .

Le temps caractéristique de la réaction chimique dans l'état S_1 est très variable car les mécanismes possibles sont nombreux. Cependant, les fluorophores commerciaux sont précisément optimisés pour minimiser les réactions chimiques dans l'état S_1 . Des ϕ_d^{-1} de l'ordre de 10^7 devraient donc pouvoir en théorie être aisément atteints (Yildiz 2004).

Cependant, comme $\tau_{S_1 \rightarrow T_1} \approx 10^{-6}$ s, le rendement de la conversion vers l'état triplet T_1 n'est jamais négligeable et est de l'ordre de $\phi_{S_1 \rightarrow T_1} \approx 10^{-3}$.

La conversion $S_1 \rightarrow T_1$ dépendant du couplage spin-orbite, il est possible d'optimiser ϕ_d^{-1} ; par exemple, en évitant d'inclure des atomes de numéro atomique élevé. Sans précautions particulières, un bon fluorophore commercial émet alors environ $10^4 - 10^5$ (et jusqu'à 10^7) photons avant d'être détruit (Yildiz 2005; Yildiz 2004).

En fait, la conversion $S_1 \rightarrow T_1$ est particulière : bien qu'irréversible, elle conduit à l'état T_1 qui peut avoir plusieurs destins : conversion interne non radiative vers l'état

S_0 , transition radiative $T_1 \rightarrow S_0$ avec émission d'un photon de *phosphorescence* ; photodestruction irréversible $T_1 \rightarrow X$. En négligeant la conversion interne, le rendement quantique de photodestruction se réduit puisque certains chemins conduisent à reformer l'état S_0

$$\phi_d = \frac{k_{S_1 \rightarrow X}}{k_{S_1 \rightarrow X} + k_{S_1 \rightarrow S_0}} \cdot \frac{k_{T_1 \rightarrow X}}{k_{T_1 \rightarrow X} + k_{T_1 \rightarrow S_0}} = \phi_T \cdot \phi_{d,T} \quad (2.18)$$

Les règles de sélection imposent que la réaction de photodestruction $T_1 \rightarrow X$ se fasse avec un partenaire de même état de spin. Les seules espèces notables à l'état triplet de spin sont le dioxygène moléculaire dans son état fondamental et certains complexes métallo-protéiques (en particulier les complexes de la chaîne de la respiration).

Afin de diminuer $\phi_{d,T}$ et donc d'augmenter ϕ_d^{-1} , un certain nombre de produits chimiques ont été développés pour séquestrer le dioxygène dissous (systèmes glucose oxydase/catalase (Harada 1990; Sambongi 1999; Adachi 2000)) ou agir comme quencheur de l'état triplet (Trolox (Cordes 2009) et hydroquinones) . Des ϕ_d^{-1} de l'ordre de 10^7 peuvent ainsi être atteints, mais parfois au prix de conditions expérimentales peu biocompatibles.

2.1.6 Etats sombres et clignotement

Le premier état excité S_1 peut subir une réaction *renversible* $S_1 \rightleftharpoons X$. Les fluctuations autour de l'équilibre évoluent avec un temps caractéristiques

$$\tau_s = \frac{1}{k_{S_1 \rightarrow X} + k_{X \rightarrow S_1}} \quad (2.19)$$

L'ordre de grandeur de τ_s est variable mais en tout état de cause supérieur de plusieurs ordres de grandeur à $\tau_{S_1 \rightarrow S_0}$ (Weston 1998).

A chaque cycle d'excitation, le système peut basculer dans un état sombre avec une probabilité

$$P_{off} = \frac{k_{S_1 \rightarrow X}}{k_{S_1 \rightarrow X} + k_{S_1 \rightarrow S_0}} \quad (2.20)$$

Le système peut revenir à l'état fluorescent avec un temps caractéristique $\tau_{on} = 1/k_{X \rightarrow S_1}$ et le flux de fluorescence reprend alors sa valeur stationnaire.

2.1.7 Effets du clignotement

L'allure de l'intensité de fluorescence pour un fluorophore unique est décrite sur la figure 2.7. Ce phénomène est appelé *clignotement* ou *blinking*. Dans des cas défavorables, τ_{on} peut être relativement long même si P_{off} est faible. Si le temps d'acquisition du détecteur est court, cela a pour conséquence une fluorescence apparemment irrégulière, voire réellement clignotante si τ_{on} est de l'ordre du temps d'acquisition.

Ce phénomène, diminuant le nombre de photons mesurés par le détecteur, dégrade la précision de pointé du fluorophore. De plus, le suivi de trajectoires de molécules individuelles est rendu plus difficile par le clignotement qui oblige à reconnecter des segments de déplacement. Ce phénomène, relativement maîtrisé avec les fluorophores organiques, a été un défaut courant des protéines fluorescentes (p. 29). Par ailleurs, la phosphorescence peut être considérée comme une variante d'état sombre puisqu'elle aboutit finalement à reformer l'état S_0 et qu'aucun photon de fluorescence n'est émis.

Dans le cas des nanocristaux semiconducteurs (p. 28), des phénomènes quantiques de couplage entre les niveaux d'énergie du cristal et des défauts de l'environnement

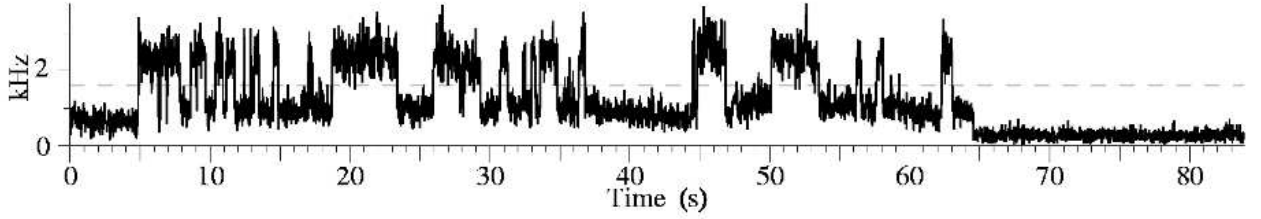


FIG. 2.7: Clignotement d'une unique molécule de DiIC₁₂ ($\lambda_{exc} = 514 \text{ nm}$). Reproduit de (Weston 1998) Fig.4d

(Nirmal 1996; Kuno 2001; Lippitz 2005) induisent un clignotement intrinsèque. Le phénomène n'étant pas entièrement caractérisé, seules des solutions partielles existent pour supprimer le clignotement (Hohng 2004; Li-Shishido 2006; Fomenko 2008).

Les désavantages du clignotement pour les fluorophores organiques peuvent être compensés dans le cas de *Quantum Dots* par deux avantages. Le premier est que, du fait de leur brillance considérable, les nanocristaux semiconducteurs émettent suffisamment de photons pour permettre une précision de pointé importante. Le second est que deux nanocristaux peuvent être rendus *discernables* (au moins statistiquement) par les propriétés de leur clignotement. L'intersection de deux trajectoires peut ainsi être théoriquement discriminée entre un croisement ou un évitement (Bonneau 2005).

2.1.8 Transferts non-radiatifs

En plus des conversions non-radiatives par couplage vibrationnel ou spin-orbite, des transferts d'énergie peuvent avoir lieu entre deux molécules de nature différente, l'une dans l'état excité S_1^D appelée *Donneur* (D) et l'autre dans l'état fondamental S_0^A appelée *accepteur* (A). L'interaction dipolaire entre A et D a pour conséquence le transfert *non-radiatif* d'énergie $S_1^D + S_0^A \rightarrow S_0^D + S_1^A$ avec une constante

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \cdot \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (2.21)$$

Le *rayon de FÖRSTER* R_0 dépend essentiellement du rendement quantique de fluorescence ϕ_F^D du donneur et de l'intégrale de recouvrement entre le spectre d'émission de D et le spectre d'absorption de A (Van Der Meer 1994). Sa valeur numérique est de l'ordre de $R_0 \approx 5 - 10 \cdot 10^{-10} \text{ m}$. Le temps caractéristique τ_D est le temps de vie du donneur en l'absence de l'accepteur.

Ce transfert résonant d'énergie, appelé *Fluorescence Resonant Energy Transfer* (FRET), s'apparente du point de vue du donneur à une désexcitation non-productive de rendement quantique

$$\phi = \frac{k_T}{k_T + (\sum k - k_T)} \quad (2.22)$$

Le second membre du dénominateur correspond précisément à τ_D^{-1} tel qu'il vient d'être défini. La contribution du FRET au rendement quantique de fluorescence du donneur (valant ϕ_F^D en l'absence de FRET) est donc

$$\Delta\phi_F^D = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \cdot \phi_F^D = E \cdot \phi_F^D \quad (2.23)$$

L'efficacité de FRET E étant un paramètre purement spatial, le rendement quantique de FRET $\Delta\phi_F^D$ peut être élevé pour un couple donneur/accepteur commercial.

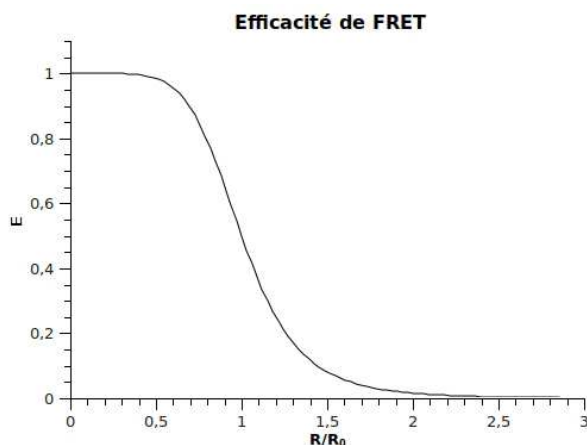


FIG. 2.8: Variation de E , l'efficacité de FRET, en fonction de la distance R entre le donneur et l'accepteur. R_0 est le rayon de FÖRSTER, caractéristique du couple donneur-accepteur.

La variation de l'efficacité de FRET en fonction de la distance séparant le donneur et l'accepteur (*cf.* Fig 2.8 p. 26) est très brutale au voisinage de R_0 . Par conséquent, le FRET est principalement utilisé comme système de mesure de *proximité moléculaire* entre le donneur et l'accepteur.

2.1.9 Excitation à deux photons

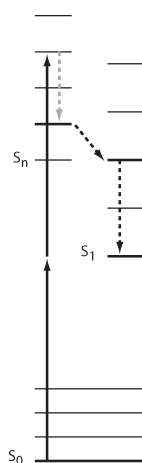


FIG. 2.9: Transitions d'absorption à deux photons (noir). Par relaxation vibrationnelle (tireté gris) et éventuellement croisement inter-systèmes (tireté noir) le système se désexcite dans le fondamental de S_1 et peut émettre un photon de fluorescence.

Dans l'absolu, rien n'impose que le passage à un état excité se fasse par l'absorption d'un seul quantum d'énergie : des transitions $S_0 \rightarrow S_i$ à N photons d'énergie $\Delta E_i/N$ sont possibles (*cf.* Fig 2.9 p. 26). Dans le cas d'une excitation à deux photons, la conservation du moment angulaire impose des transitions de type $S_0 \rightarrow S_2$ (la transition vers S_1 est interdite). L'absence de symétries dans la molécule permet de lever partiellement cette interdiction et de rendre possible la transition $S_0 \rightarrow S_1$. Selon les cas, le spectre d'absorption à deux photons sera ou non superposable au spectre d'absorption à un

photon, modulo le recalage $\lambda \rightarrow \lambda/2$ (cf. Fig 2.10 p. 27).

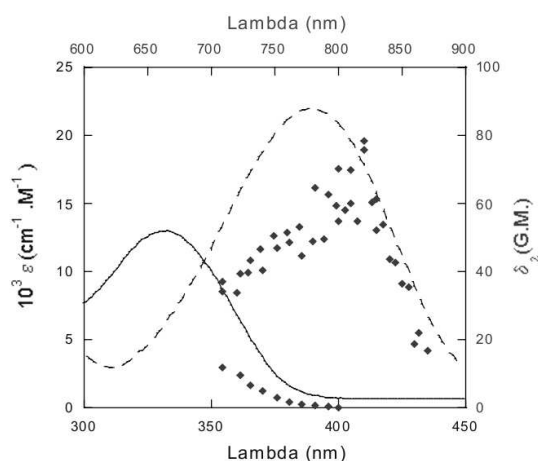


FIG. 2.10: Spectres d'absorption à un (trait) et deux (points) photons des formes basique (trait plein) et acide (trait tireté) de PYMPO, un fluorophore à grande section efficace d'absorption à deux photons (Charier 2004).

Si la section efficace d'absorption à deux photons vers S_1 est suffisante, la molécule se comporte ensuite comme si elle avait été excitée de façon classique. En particulier, le décalage spectral des photons d'excitation et de fluorescence devient considérable (de l'ordre de λ_{fl}), ce qui facilite leur séparation.

Enfin, l'absorbance étant proportionnelle au *carré* du flux traversant la molécule, l'excitation ne sera notable que dans des zones très lumineuses : au point de focalisation d'un LASER par exemple (cf. Fig 2.27 p. 42).

2.2 Marqueurs fluorescents

Le développement quantitatif et qualitatif des fluorophores commerciaux tient principalement au succès d'une approche *bottom-up* en chimie de synthèse et en physique des semiconducteurs. Bien qu'il en ait été partiellement un moteur, le développement des fluorophores est surtout le résultat de recherches fondamentales sur la synthèse d'édifices moléculaires possédant des propriétés définies à l'avance.

Nous rappelons ici les caractéristiques des principaux types de fluorophores. Nous montrerons que, en fonction du type d'expérience envisagé, le choix du type de fluorophore peut être déterminant.

2.2.1 Fluorophores organiques

Développement

Sur des familles de molécules organiques, des propriétés photophysiques — le coefficient d'extinction molaire, le rendement quantique de fluorescence ou la brillance — ont été optimisés jusqu'à atteindre des valeurs extrêmes : coefficients d'extinctions molaires de l'ordre de $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Mongin 2007a), section efficace d'absorption à deux photons de l'ordre de 10^6 GM (Mongin 2007a), rendements quantique de fluorescence proches de 1 (Krishna 2006), *Stokes shifts* de l'ordre de 80 nm (Mongin 2007b).

Simultanément, des contraintes chimiques ou biologiques — solubilité, stabilité et toxicité en milieu biologique, photostabilité — ont été prises en compte, bénéficiant pour les

applications biologiques de l'expérience de la chimie pharmaceutique.

Par ailleurs, l'exploitation de propriétés moins conventionnelles — absorption non linéaire, solvatochromisme, électrochromisme, photochimie — ont abouti à l'obtention de fluorophores aux propriétés remarquables comme l'absorption à deux photons, la sensibilité aux protons (Charier 2005) ou aux ions Ca^{2+} (indo-1, fura-2 (Grynkiewicz 1985)) en milieu intracellulaire, le cageage réversible (Neveu 2008).

Caractéristiques

L'avantage principal des fluorophores organiques est leur diamètre cristallographique modeste (de l'ordre de quelques nanomètres) qui minimise la perturbation de l'objet à étudier. La finesse du contrôle des propriétés permet de mettre au point des applications sophistiquées.

Bien que les caractéristiques photophysiques aient été fortement optimisées, la nombre moyen de photons émis avant photodestruction demeure limitant pour des applications nécessitant un suivi de molécule unique à long terme (par exemple (Yildiz 2004)). Des solutions (p. 23) ont été développées pour augmenter la durée de vie *in vitro* et *in vivo* des fluorophores organiques.

La chimie des fluorophores organiques étant bien maîtrisée, ils peuvent porter de nombreux groupes fonctionnels (biotine, digoxygénine, thiols, imides). Ces groupes servent à coupler le fluorophore à une grande variété de substrats biologiques ou non et donc d'étudier de nombreux systèmes. Le catalogue des fluorophores organiques est considérable, bien que le corpus se réduise rapidement lorsque des propriétés spécifiques sont recherchées. En tout état de cause, il existe quelques gammes de fluorophores commerciaux brillants, peu sensibles au blanchiment, et couvrant l'intégralité du spectre visible (Alexa, Cy, BODIPY).

2.2.2 Quantum Dots

Développement

Les progrès réalisés en physique des semiconducteurs ont conduit à la synthèse de nanocristaux se comportant comme des boîtes quantiques (pour une revue générale sur les *Quantum Dots*, consulter (Walling 2009)). La taille de ces nanoparticules produites par auto-assemblage (Murray 2000; Lee 2002) peut être contrôlée pour conduire à des séparations de niveaux électroniques correspondant à des photons visibles.

Les *Quantum Dots* bénéficient de l'intense recherche sur les objets quantiques à peu de particules et sur leur possible application comme *qubits*. D'une part, cela a apporté une maîtrise technologique de synthèse et de fonctionnalisation de ces nanocristaux *a priori* peu biocompatibles. D'autre part, la physique de l'émission lumineuse par les *Quantum Dots* est comprise de plus en plus finement (Nirmal 1996; Kuno 2001; Lippitz 2005), en particulier les propriétés statistiques d'émission qui sont déjà utilisées en suivi de molécules uniques pour distinguer deux *Quantum Dots* entre eux (Bonneau 2005) et augmenter la durée de suivi d'une particule.

Caractéristiques

Les *Quantum Dots* utilisés en suivi de molécules uniques sont généralement des nanocristaux de CdSe ou CdTe entourés de ZnS et enrobés d'une couche de polymère. La taille du coeur semi-conducteur est de l'ordre de 10 nm, de l'ordre de grandeur du diamètre cristallographique d'une protéine raisonnable.



FIG. 2.11: Fluorescence d'une série de *Quantum Dots* de taille croissante (de gauche à droite). La longueur d'onde d'émission varie de 500 nm à 800 nm. Reproduit de (Qi 2008)

Leur intérêt premier est leur brillance considérable. Leur coefficient d'absorption molaire décroît aux grandes longueurs d'onde mais reste de l'ordre de grandeur de $2 \cdot 10^5 - 2 \cdot 10^7 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ dans l'ensemble du spectre visible. Le rendement quantique de fluorescence est proche de 1. La relativement grande durée de vie de l'état excité (environ 200 ns à comparer aux $10^{-9} - 10^{-10} \text{ s}$ d'une molécule organique) pourrait trouver des applications en observation résolue finement en temps (Alivisatos 2004).

La cytotoxicité des *Quantum Dots* a longtemps limité leur application au marquage de cellules fixées ou à des applications *in vitro* (par exemple (Hotz 2005)) mais la passivation du nanocristal par une couche de polymères et la fonctionnalisation de la surface par des protéines a permis l'émergence de techniques cellulaires *in vivo* (Dahan 2003; Michalet 2005).

2.2.3 Protéines fluorescentes

Développement

Bien qu'il existe un certain nombre d'autres protéines fluorescentes (par exemple (Matz 1999; Shaner 2005; Habuchi 2008)), la GFP (*Green Fluorescent Protein*) est extrêmement utilisée comme marqueur protéique dans l'ensemble des applications de biologie cellulaire et moléculaire (Chudakov 2005).

La GFP sauvage (*wtGFP*) est une protéine fluorescence de 238 acides aminés, présente dans la méduse *Aequorea victoria*. L'intérêt de cette molécule est que, étant une protéine, la régulation de son expression bénéficie de toutes les techniques de biologie moléculaire de l'ADN et des protéines : clonage dans un organisme prokaryote, eukaryote unicellulaire ou pluricellulaire ; expression sous contrôle d'un promoteur dépendant d'une molécule, d'un tissu ou d'un stade de développement ; protéine de fusion entre la molécule à étudier et la GFP.

La *wtGFP* souffre cependant de défauts. Certains sont de nature photophysique : spectre d'excitation complexe, mauvaise photostabilité, clignotement (Dickson 1997). D'autres sont dus au contexte biologique dans lequel la protéine est utilisée : la *wtGFP* étant exprimée naturellement dans une méduse marine, son chemin de repliement est modifié lorsqu'elle est clonée et exprimée à 37°C, conduisant à une diminution des qualités photophysiques. Par ailleurs, lorsque la GFP est exprimée sous forme de protéine de fusion, le repliement de l'autre protéine interfère avec celui de la GFP.

Caractéristiques

Grâce à la détermination de la structure cristallographique de la *wtGFP* (Ormö 1996) et des expériences de mutagenèse (Heim 1995), un grand nombre de mutants ont été produits (Shaner 2005).

Les principales caractéristiques de cette série de mutants est de présenter des spectres d'excitation et d'émission bien définis et couvrant à eux tous la majeure partie du spectre visible. Ils présentent également une meilleure résistance à la photodestruction et au passage vers des états *sombres* à l'état excité. Certains d'entre eux ont subi une ou plusieurs mutations dites *super-folder* qui conduisent à un taux important de protéines correctement repliées à 37°C (Pédelacq 2006).

L'avantage des protéines fluorescentes, outre la puissance des outils de biologie moléculaire pour leur expression, demeure leur biocompatibilité et leur solubilité en milieu biologique. Leur photodestruction ne conduit pas, contrairement à un certain nombre de molécules organiques, à des produits cytotoxiques, permettant une exposition prolongée à la lumière *in vivo*.

En revanche, la nomenclature des mutants de la GFP demeure folklorique et ne permet souvent pas de lever l'ambiguïté entre deux protéines voisines. La caractérisation photophysique précise de chaque protéine peut être ardue à réaliser et interpréter et pas nécessairement bien documentée.

2.2.4 Conclusion

Bien qu'il soit en théorie possible de produire une protéine marquée avec n'importe quel type de fluorophore, ces derniers possèdent des caractéristiques assez différentes : en particulier, leur taille peut varier sur près de 2 ordres de grandeur. Cela a pour conséquence de grandes variations de section efficace d'absorption, donc de flux de photons émis à puissance d'excitation constante. Par ailleurs, selon la nature chimique des fluorophores, la photostabilité peut notablement varier, ce qui a des conséquences en particulier sur la durée d'observation du fluorophore avant photoblanchiment.

Nous n'avons pas construit de protéines de fusion fluorescentes dans ce travail, mais nous avons mené des expériences en utilisant des *Quantum Dots*, des fluorophores organiques isolés, et pour certains tests des nano-billes fonctionnalisées recouvertes de fluorophores organiques.

2.3 Techniques d'excitation en solution

Nous rappelons ici quelques techniques classiques de microscopie de fluorescence. Nous les évaluons en fonction des contraintes expérimentales que notre montage impose par ailleurs.

2.3.1 Excitation directe

L'excitation directe est la technique envisageable la plus simple pour observer des fluorophores. En suivant les notations du schéma 2.13, les sources S_i et S_{ii} sont recombinaison grâce au miroir M_i et au miroir dichroïque M_{ii} . Le faisceau obtenu constitue un éclairage parallèle gaussien d'extension finie. La lentille L_1 focalise ce faisceau sur le point focal arrière de l'objectif de microscope L_2 .

Dans le demi-espace avant de l'objectif, le faisceau d'excitation est parallèle et traverse les dioptries verre-huile, huile-verre et verre-solution. Afin d'éviter les phénomènes de réflexion, et donc de perte de puissance d'excitation, nous réalisons une adaptation

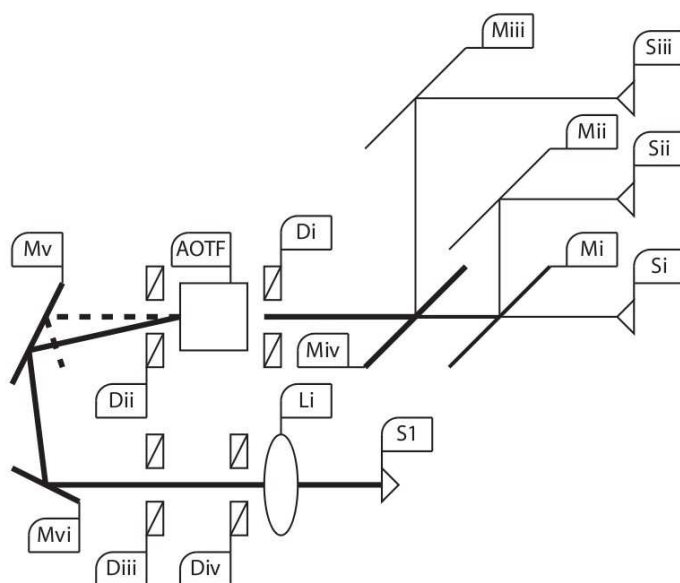


FIG. 2.12: Schémas du trajet optique jusqu'à l'entrée du microscope, tel que nous l'avons conçu et réalisé. La numérotation des éléments reprend celle utilisée dans les protocoles de réglage (p. 270)

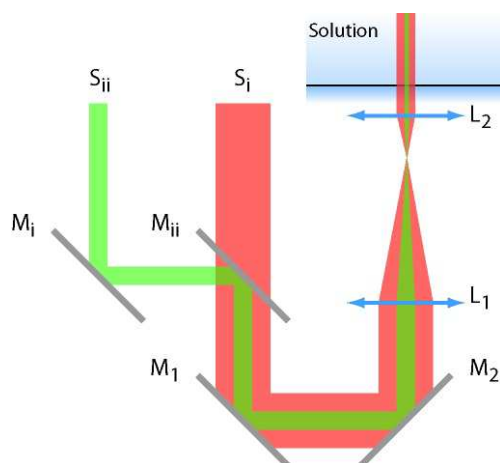


FIG. 2.13: Schéma d'excitation directe par deux LASER S_{ii} et S_i recombinaison en un faisceau unique par le miroir dichroïque M_{ii} et focalisés sur le plan focal arrière de l'objectif L_2 par la lentille L_1 . Dans l'échantillon, les faisceaux sont parallèles. La numérotation des éléments optiques reprend celle des protocoles d'alignement.

d'impédance en choisissant une huile d'immersion d'indice de réfraction le plus proche possible de celui du verre ($n \sim 1.5$).

Dans la solution, le faisceau interagit avec les molécules présentes. Par absorption ou diffusion de photons, la puissance électromagnétique disponible diminue au fur et à mesure du chemin optique. Dans la limite de solutions diluées, la variation prend la forme d'une loi de BEER-LAMBERT

$$\log \frac{P(z)}{P(0)} = z \cdot \sum_i \epsilon_i \cdot c_i \quad (2.24)$$

où ϵ_i est appelé *coefficient d'extinction molaire* et c_i est la concentration de l'espèce i .

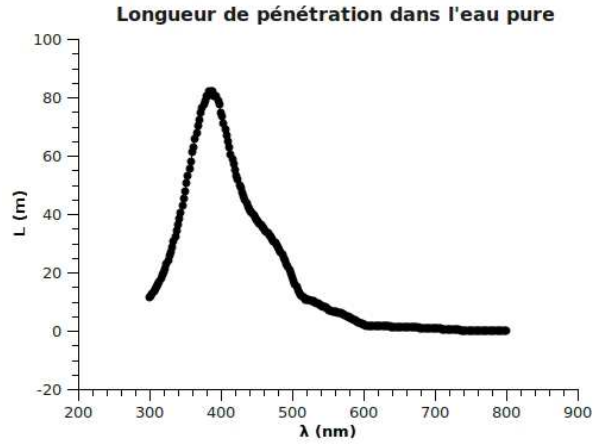


FIG. 2.14: Longueur de pénétration $L = 1/(\ln 10 \cdot \epsilon \cdot c_{eau})$ de l'eau pure en fonction de la longueur d'onde. Données tirées de (Buiteveld 1994).

Par conséquent, l'équation 2.24 fait apparaître une longueur caractéristique Λ , appelée *longueur de pénétration* définie par

$$\Lambda^{-1} = \sum_i \log 10 \cdot \epsilon_i \cdot c_i = \sum_i \Lambda_i^{-1} \quad (2.25)$$

Dans le visible, la longueur de pénétration de l'eau pure est décimétrique, comme indiqué sur la figure 2.14, et ce sont les solutés qui dominent. Pour des composés raisonnablement absorbants ($\epsilon \approx 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) à concentration millimolaire, la longueur de pénétration associée est de l'ordre de $\Lambda_i \approx 1 \text{ mm}$. Bien qu'à l'échelle d'une cellule unique, même eukaryote, l'éclairement puisse être considéré comme homogène, l'excitation directe est généralement limitée à l'étude des couches supérieures des tissus lors d'observations *in vivo*.

Dans le cas $z \ll \Lambda$, la densité d'énergie électromagnétique peut donc être considérée comme constante. L'ensemble des fluorophores situés dans le champ d'excitation est susceptible d'absorber un photon pour subir une transition $S_0 \rightarrow S_1$ avec la même probabilité, indépendamment de sa position z .

2.3.2 Excitation en ondes évanescentes

A contrario, il peut être intéressant de créer une dépendance de l'émission de fluorescence en fonction de la position, la détection se faisant par conjugaison de plan de z constant avec le détecteur. Bien qu'il soit également possible d'agir dans la partie «détection» (p. 49) du montage, le moyen le plus simple est de moduler spatialement en z la puissance lumineuse dans la solution.

Principe

Sous incidence non-normale i , le faisceau parallèle d'excitation est réfracté en sortie de l'objectif par l'interface verre-solution. Cette situation ne présente pas d'intérêt, l'excitation dans la solution se faisant alors avec un angle émergé pouvant être important, conduisant à une modulation spatiale indésirable dans le plan transverse. Cependant, au-delà d'un angle d'incidence critique i_C , l'angle du faisceau émergé devient supérieur

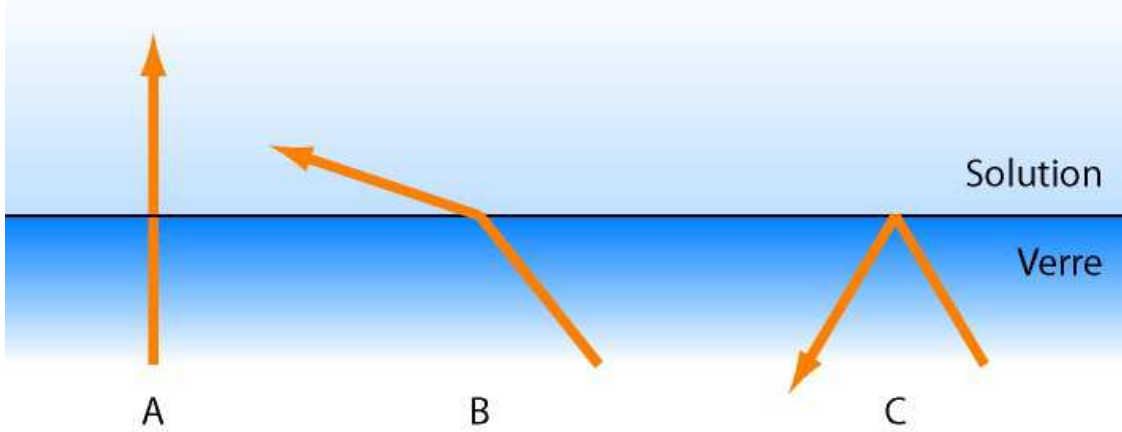


FIG. 2.15: [A] Traversée du dioptre verre-eau par le faisceau sous incidence normale. [B] Réfraction du faisceau dans le milieu le plus réfringent (eau). [C] Réflexion interne totale du faisceau dans le milieu le moins réfringent (verre).

à $\pi/2$: il y a *réflexion totale* sur l'interface. L'angle critique est donné par la loi de SNELL-DESCARTES

$$i_C = \arcsin \frac{n_{\text{solution}}}{n_{\text{verre}}} \quad (2.26)$$

Pour $i \geq i_C$, le faisceau émergent est symétrique par rapport à l'axe optique au faisceau incident et il n'y a pas de propagation d'énergie électromagnétique dans la solution. Cependant, la densité d'énergie électromagnétique n'est pas nulle dans la solution et varie comme

$$\ln \frac{\rho(z)}{\rho(0)} = \frac{2\pi \cdot z \sqrt{n_{\text{verre}}^2 \cdot \sin^2 i - 1}}{\lambda} = \frac{z}{\Lambda} \quad (2.27)$$

A l'angle critique, la longueur de pénétration dans le visible est de l'ordre de $\Lambda = \lambda / (2\pi \sqrt{n_{\text{solution}}^2 - 1}) \approx 100 \text{ nm}$

Dans une tranche de solution au voisinage de l'interface ($z = 0$) et d'épaisseur quelques Λ , la densité d'énergie électromagnétique est suffisante pour exciter la transition $S_0 \rightarrow S_1$. La probabilité de transition décroît exponentiellement et, au-delà de quelques Λ , aucun fluorophore n'est excité dans la solution.

2.3.3 Conclusion

La configuration la plus intéressante pour une localisation en molécules uniques utilise une excitation en ondes évanescentes ; c'est la solution que nous avons retenue. Cependant, nous montrerons que nous avons conçu le montage de telle sorte que nous pouvons basculer de cette situation à une excitation directe.

Réalisation expérimentale

La réalisation expérimentale d'un angle incident $i \geq i_C$ est aisée. Une première solution très simple consiste à utiliser pour l'excitation un prisme, comme présenté sur la figure 2.17. La configuration générale comprend un microscope inversé dont l'objectif (destiné uniquement à la détection) supporte la solution étudiée, entre deux surfaces de verre. La surface supérieure est surmontée d'un prisme, idéalement de demi-angle au sommet

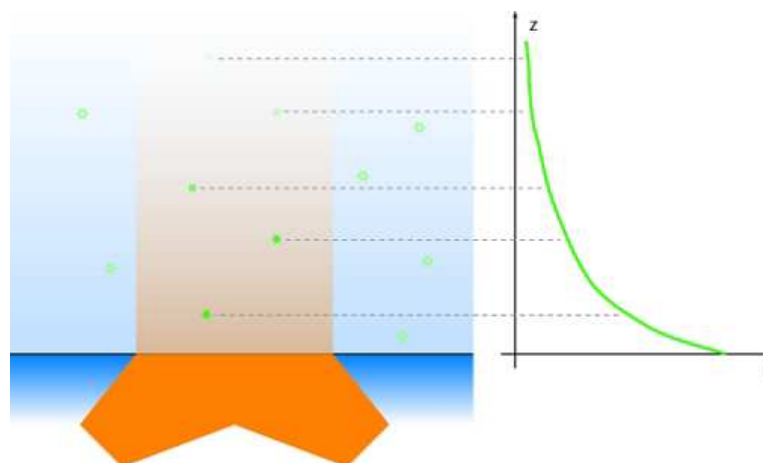


FIG. 2.16: [G] Excitation en ondes évanescentes (orange) d'une solution (bleu) contenant des fluorophores. En-dehors de l'onde évanescente, les fluorophores n'émettent pas de photons (étoiles vides). Dans l'onde évanescente, les fluorophores (étoiles pleines) émettent d'autant plus de photons de fluorescence que la densité du champ électromagnétique est grande. [D] Relation entre l'intensité de fluorescence et la distance z des fluorophores à l'interface verre-solution.

complémentaire à l'angle d'incidence critique i_C . Un faisceau LASER parallèle (non focalisé) sous incidence normale par rapport à la face du prisme se réfléchit dans ce cas totalement à l'interface verre-solution et définit un volume d'excitation de 100-200 nm d'épaisseur ; sa largeur est de l'ordre de celle du faisceau.

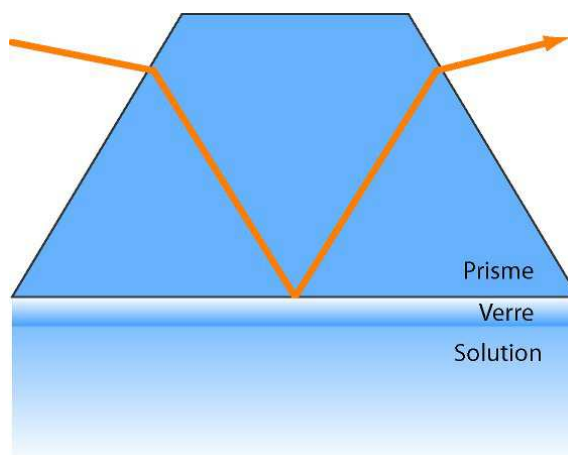


FIG. 2.17: Dispositif d'excitation en onde évanescente par réflexion totale du faisceau d'excitation à l'aide d'un prisme : le faisceau (orange) est réfracté à l'interface air-prisme de telle sorte que l'angle d'incidence sur la lamelle de verre dépasse l'angle critique verre-solution.

Une configuration d'excitation en ondes évanescentes peut également être dérivée d'un montage à excitation directe. Le faisceau d'excitation, parallèle à l'axe optique, est focalisé sur le plan focal arrière de l'objectif de microscope. Au fur et à mesure du décalage du point de focalisation par rapport à l'axe optique, l'angle d'émergence depuis l'objectif du faisceau augmente jusqu'à atteindre $\pi/2$. Il se réfléchit alors totalement sur l'interface verre-solution et engendre un volume d'excitation de dimensions comparables au cas du

prisme.

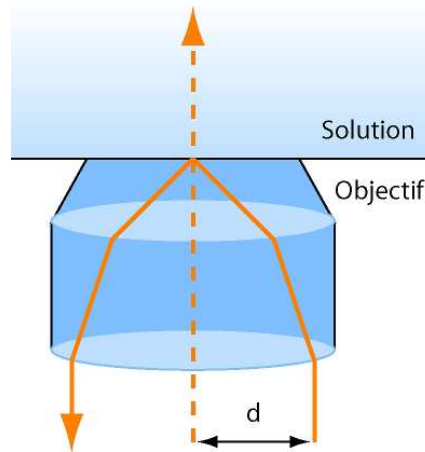


FIG. 2.18: Dispositif d'excitation en onde évanescente par réflexion totale du faisceau d'excitation à l'aide d'un objectif de microscope. Le décentrement d fixe l'angle d'incidence du faisceau (orange) sur le dioptre verre-eau entre une situation en excitation directe (tireté) et en ondes évanescentes (plein).

Comme il est décrit sur la figure 2.18, le diaphragme arrière de l'objectif ou, ce qui est équivalent, l'angle maximal d'émergence i_e , doit être suffisamment grand pour permettre d'obtenir l'angle critique. Ce paramètre est mesuré par *l'ouverture numérique* de l'objectif. Ce paramètre est défini par

$$ON = n_e \cdot i_e \quad (2.28)$$

Le milieu émergent étant de l'huile d'indice ajusté à celui du verre, $n_e = n_{verre}$. L'ouverture numérique doit par conséquent être au moins égale à $n_{verre} \cdot \sin i_C$ soit, par définition de i_C , $n_{solution} \cdot \sin \pi/2$. L'objectif doit ainsi posséder une ouverture numérique

$$ON \geq ON_C = n_{solution} \approx 1.34 \quad (2.29)$$

Ces objectifs sont généralement développés spécifiquement pour la microscopie en ondes évanescentes et sont disponibles commercialement.

Par excitation à travers l'objectif de microscope (par opposition au prisme), il est possible de passer d'une excitation directe à une excitation en ondes évanescentes par simple translation du faisceau LASER parallèlement à l'axe optique. Cela libère également au-dessus de la solution un espace permettant par exemple d'introduire un dispositif de pinces magnétiques ou de micromanipulation. C'est par conséquent la solution que nous avons retenue pour notre montage. En revanche, le faisceau réfléchi se propage dans la partie «détection» dans le même sens que le faisceau d'excitation, ce qui impose un filtrage et une réduction du rapport signal-sur-bruit.

2.3.4 Techniques de modulation temporelle

Que ce soit parce que le faisceau d'excitation comprend plusieurs longueurs d'onde et qu'on souhaite n'en utiliser qu'une à la fois, ou parce que la technique d'excitation requiert intrinsèquement une modulation temporelle, il est utile de pouvoir modifier la puissance d'excitation de chaque longueur d'onde indépendamment et rapidement.

La solution la plus élégante consiste à utiliser un dispositif diffractométrique, à fort pouvoir de séparation, modulable en temps. Un filtre acousto-optique accordable (*Acousto-Optical Tunable Filter*, AOTF) utilise la diffraction du faisceau par des ondes stationnaires d'indice formées dans un cristal, généralement d'oxyde de tellure. Par effet piezo-électrique, une modulation du potentiel électrostatique aux bords du cristal entraîne la formation d'ondes mécaniques stationnaires dans celui-ci.

La modulation spatiale de pression correspond à une modulation d'indice optique ou, ce qui est équivalent, à une interaction photon-phonon. Les plans iso-indice diffractent le faisceau, permettant d'isoler une bande étroite de longueurs d'onde, comme présenté sur la figure 2.19. La partie transmise par le cristal est éliminée et seule la partie diffractée est utilisée dans le montage d'excitation.

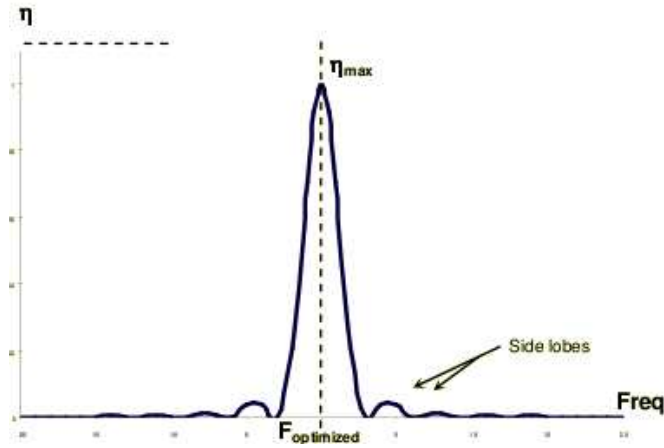


FIG. 2.19: Pourcentage de l'intensité diffractée en fonction de la fréquence acoustique dans une configuration donnée. La largeur à mi-hauteur du pic est de 30 kHz. Reproduit du manuel de spécifications techniques de l'appareil.

Dans la limite du couplage linéaire photon-phonon, la superposition de différentes modulations de potentiel électrostatique permet une modulation indépendante de différentes longueurs d'onde (typiquement jusqu'à une dizaine). Le temps de réponse τ du système est de l'ordre de grandeur du temps de parcours de l'onde acoustique dans le cristal, soit

$$\tau \approx \frac{L}{c} = 1 - 10 \mu s \quad (2.30)$$

La modulation temporelle de la puissance du faisceau, synchronisée à l'acquisition du signal de fluorescence, est réalisée dans de nombreuses techniques raffinées d'acquisition (ALEX-FRET (Koopmans 2009), STORM (Rust 2006), PALM (Betzig 2006)) par le moyen de ces filtres acousto-optiques accordables. Nous avons introduit un modulateur de ce type dans notre montage pour interfacer facilement le contrôle de puissance de nos faisceaux d'excitation. A plus long terme, nous avons également prévu ce modulateur dans l'idée de réaliser des expériences de FRET en molécule unique.

2.3.5 Techniques de modulation spatiale transverse

Bien que ne nous les ayons pas mises en oeuvre, nous présentons ici quelques techniques permettant une modulation de l'intensité d'excitation dans le plan d'observation.

La densité spatiale $\rho_{h\nu}$ de photons collectés sur le détecteur est liée à la densité ρ_{fl} de

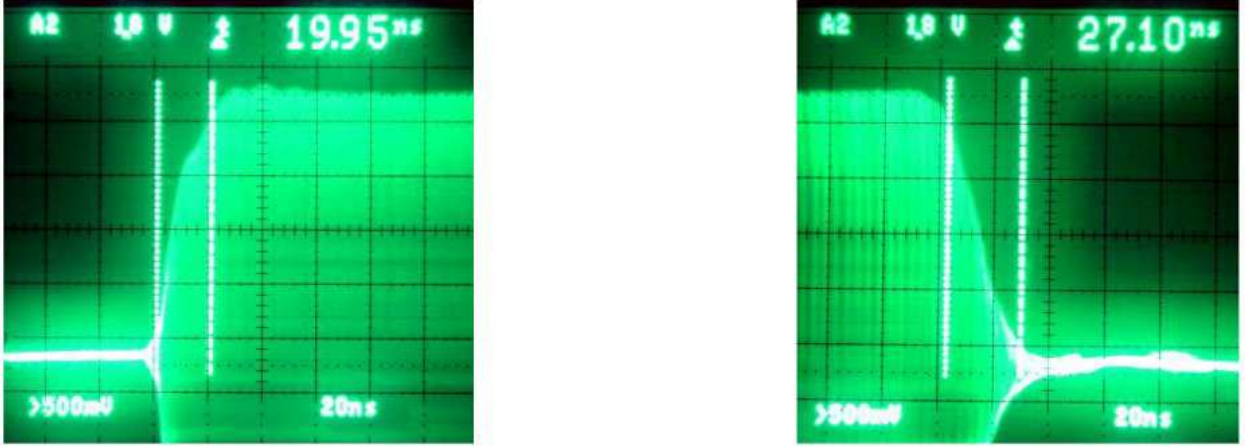


FIG. 2.20: Temps de réponse du filtre acousto-optique accordable. Dans le cas de fronts montants comme descendants, il est de l'ordre de 20 ns. Reproduit du manuel des spécifications techniques de l'appareil.

fluorophores par la relation

$$\rho_{h\nu} = G_{detect} \otimes [\mathcal{B}(G_{exc} \otimes I_{exc}) \times \rho_{fl}] \quad (2.31)$$

La densité de fluorophores (qui est la quantité à laquelle on souhaite remonter) est un champ de diracs. Il est excité par un profil qui est la convolution du profil de la source d'excitation I_{exc} par la réponse impulsionnelle G_{exc} du système optique d'excitation. Chaque fluorophore émet des photons de fluorescence selon une brillance \mathcal{B} qui est une fonction éventuellement non-linéaire de l'intensité d'excitation. Cette densité d'émission de photons est ensuite convoluée par la fonction de réponse G_{detect} de l'optique de détection (qui sera traitée dans la partie suivante).

Dans une illumination classique en champ large, du fait de la structure gaussienne du faisceau LASER d'excitation, le profil transverse I_{exc} du faisceau d'excitation dans la solution est une gaussienne convoluée par la fonction de réponse impulsionnelle G_{exc} . Cependant, la dimension caractéristique ξ de cette résultante, de l'ordre de $\xi \approx 100 \mu m$, ainsi que la mollesse de sa variation spatiale permettent de considérer que la puissance d'excitation est homogène jusqu'à au moins quatre ordres de grandeur au-dessus de la taille du fluorophore.

Toutefois, comme les fonctions G , I et \mathcal{B} sont susceptibles d'améliorer la finesse de la fonction $\rho_{h\nu}$, diverses techniques plus raffinées ont été développées à cet effet.

Illumination structurée en champ large (1)

Pour un fluorophore unique en mouvement (par exemple fixé sur une molécule de myosine V se déplaçant le long d'une fibre d'actine (Cappello 2007; Pierobon 2009)), le problème principal vient de la résolution temporelle. En effet, pendant le temps d'acquisition Δt du détecteur, le fluorophore se déplace de $\nu \Delta t$ alors que la précision de pointé ne varie que comme $a\sqrt{\nu \Delta t}$, où ν est la fréquence d'émission de photons de fluorescence et a la largeur caractéristique de la fonction de réponse impulsionnelle de l'optique de détection. Par conséquent, la précision relative de la localisation ne s'améliore que lentement avec le temps d'acquisition, ce qui diminue la bande passante.

Cependant, dans la mesure où les changements d'intensité de fluorescence (variant comme le nombre $N = \nu \Delta t$ de photons collectés) sont plus faciles à détecter que les

changements de position (variant comme \sqrt{N}), la position d'un fluorophore se déplaçant dans un champ d'éclairage $G_{exc} \otimes I_{exc}$ inhomogène mais connu sera déterminée avec une précision accrue grâce à ce couplage position-intensité.

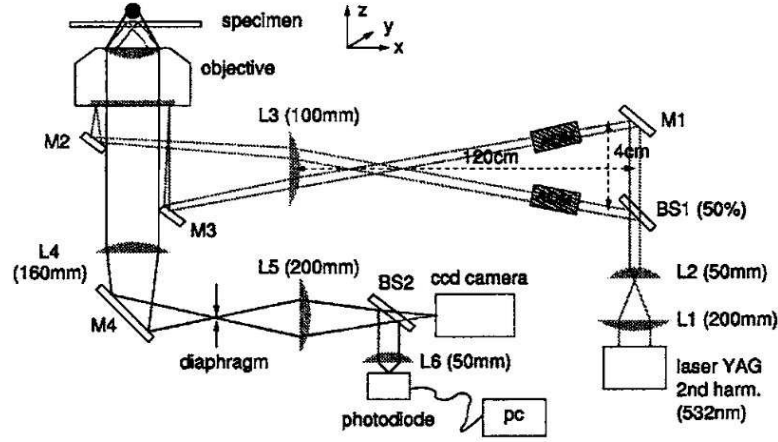


FIG. 2.21: Schéma de l'optique utilisée pour générer l'illumination structurée utilisée dans les références (Cappello 2007; Pierobon 2009). Reproduit de (Busoni 2005).

La solution la plus simple pour construire un motif d'éclairage contrôlé est de produire des figures d'interférence I_{exc} entre faisceaux d'excitation cohérents, comme cela est décrit dans la figure 2.21. La modulation temporelle induite par le déplacement du fluorophore permet de remonter à la position instantanée avec une précision relative plus élevée (Busoni 2005).

Illumination structurée en champ large (2)

Par interférence entre deux faisceaux LASER, l'illumination dans le plan focal est structurée en un réseau de franges $I_{exc}(\vec{r}) = I_0 \cdot \left(1 + C(z) \cdot \sin(\vec{k} \cdot \vec{r}_\perp + \phi)\right)$. L'intensité de fluorescence correspondante en chaque point est proportionnelle à $\rho_{fl}(\vec{r}_\perp) \cdot I_{exc}(\vec{r}_\perp)$.

Une série d'images $S_i(\vec{r}_\perp); i \in [1; N]$ est enregistrée pour des illuminations déphasées avec $\phi_i = i \cdot (2\pi/N)$. En moyennant simplement ces images, on retrouve l'image correspondant à une illumination continue $I_{exc}(\vec{r}_\perp) = I_0$:

$$\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N S_i(\vec{r}_\perp) \propto I_0 \cdot \rho_{fl}(\vec{r}_\perp) \quad (2.32)$$

De manière plus intéressante, la composante de fluorescence synchrone avec l'illumination est proportionnelle au contraste des franges

$$\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N S_i(\vec{r}_\perp) \cdot \sin(\phi_i) \propto I_0 C \cdot \rho_{fl}(\vec{r}_\perp) \quad (2.33)$$

La structure du faisceau d'excitation fait que $C(z)$ décroît rapidement avec $|z - z_F|$. Par conséquent, l'observation de la composante de fluorescence synchrone avec l'excitation permet de rejeter naturellement la fluorescence émise hors du plan focal d'excitation de manière équivalente à un microscope confocal (Wilson 1998; Neil 1998).

Sculpture de surfaces d'onde (STED)

Quelle que soit la bonne volonté de l'expérimentateur, la diffraction d'un faisceau gaussien conduit à un terme I_{exc} d'extension latérale de l'ordre de $\lambda/2$. Même en se plaçant dans des conditions d'excitation G_{exc} non pas en champ large mais en *éclairage ponctuel*, la séparation de fluorophores uniques fixes plus rapprochés que cette distance sera problématique.

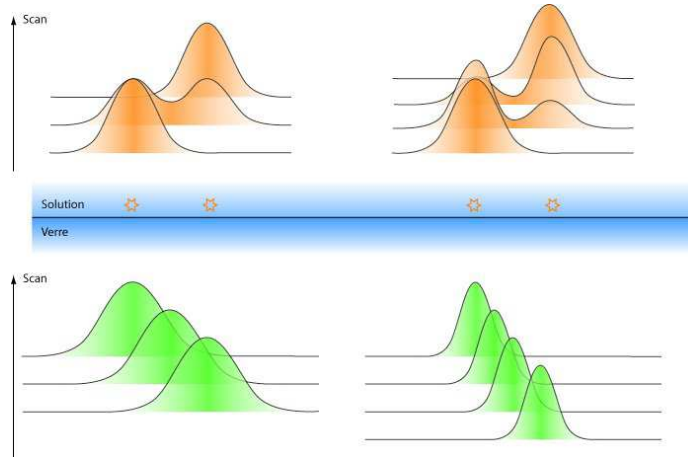


FIG. 2.22: [Gauche] Balayage de la surface par un faisceau (vert) de largeur comparable à la distance entre les deux fluorophores. La fluorescence (orange) telle qu'observée après convolution par l'optique de détection permet difficilement de séparer l'émission des deux molécules. [Droite] Balayage par un faisceau trois fois plus fin que la distance entre les fluorophores. Le signal de fluorescence après convolution par le même système optique illustre l'augmentation de la résolution.

La technique de *STimulated Emission Depletion* (STED) exploite une non-linéarité de l'émission stimulée (cf. Fig 2.23 p. 40). Une impulsion LASER à profil spatial gaussien excite la distribution de fluorophores sur une largeur $\sim \lambda$ selon une transition verticale $S_0(v = 0, r = r_{eq}(S_0)) \rightarrow S_1(v \neq 0, r = r_{eq}(S_0))$. Après relaxation dans le fondamental vibrationnel de S_1 (quelques nanosecondes), elle est immédiatement suivie d'une seconde impulsion à longueur d'onde légèrement plus grande (dite de *déplétion*) qui stimule la relaxation $S_1(v = 0, r = r_{eq}(S_1)) \rightarrow S_0(v \neq 0, r = r_{eq}(S_1))$.

L'originalité de cette impulsion de déplétion est que son profil est celui d'un mode non-gaussien, possédant un zéro d'intensité en son centre. Par conséquent, après les deux impulsions, la plupart des molécules a relaxé dans son état fondamental; il ne reste que celles situées au centre du faisceau de déplétion. Comme l'émission stimulée ne se produit qu'au-dessus d'un seuil, il est possible en utilisant un faisceau de déplétion très puissant de restreindre la zone intacte à des longueurs arbitrairement proches du centre du faisceau.

De cette façon, bien que la région à imager contienne de nombreux fluorophores, il est possible *en déplaçant le faisceau* d'avoir une résolution spatiale (33 nm) qui commence à avoir une légitimité à l'échelle de la molécule (Meyer 2008; Eggeling 2009; Nägerl 2008; Hein 2008; Wildanger 2009). L'inconvénient principal de cette technique sont les illuminations intenses et les nombreux cycles abortifs nécessaires à l'obtention d'une image, ainsi que le coût élevé du LASER de déplétion.

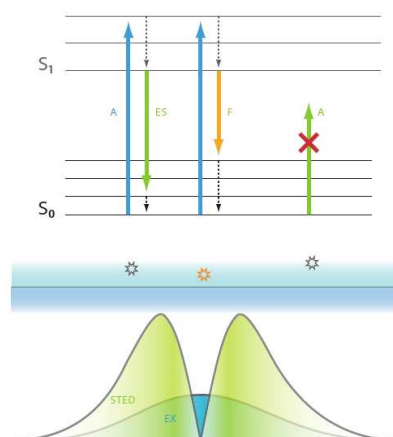


FIG. 2.23: Le LASER d'excitation (EX, bleu) excite les fluorophores dans l'état S_1 ; par conversion interne (pointillé), ils retombent dans le fondamental vibrationnel de S_1 . Deux deveniris sont possibles : dans la zone où le LASER STED (vert) est suffisamment intense, l'émission stimulée desexcite le fluorophore sans émission de fluorescence (gris). Dans la zone où le LASER STED n'est pas assez intense, le fluorophore se desexcite par émission d'un photon de fluorescence (jaune). Le LASER STED ne peut jamais exciter les molécules depuis leur état S_0 (flèche verte barrée). La taille de la zone centrale où la fluorescence a lieu ne dépend que du rapport de la puissance du LASER STED sur le seuil d'excitation stimulée.

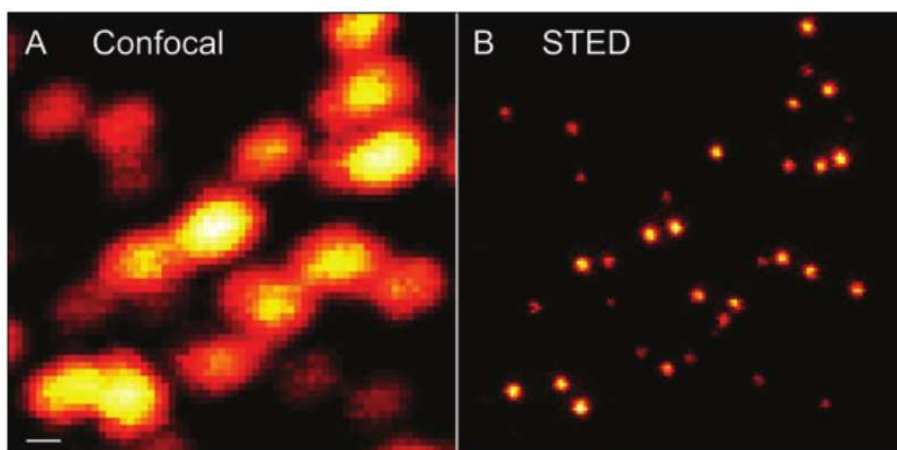


FIG. 2.24: Fluorescence de nanobilles (40 nm) observées en imagerie [G] confocale et [D] STED. Reproduit de (Wildanger 2009).

Illumination structurée dans l'espace réciproque

Dans l'espace réciproque, les détails d'émission de fluorescence $\mathcal{B}(G_{exc} \otimes I_{exc}) \times \rho_{fl}$ à une certaine précision d sont rejetés dans le vecteur d'onde $k_d = 2\pi/d$. Sous l'effet du filtrage G_{detect} possédant une fréquence de coupure $k_c = 4\pi/\lambda$, ces informations sont perdues si $d < \lambda/2$.

En faisant interférer l'émission de fluorescence avec une figure de vecteur d'onde k , il est cependant possible de ramener certains détails dans la zone observable $k_d - k \leq k_c$ par un effet de moiré.

Le moyen le plus direct pour y parvenir est de créer une excitation spatialement struc-

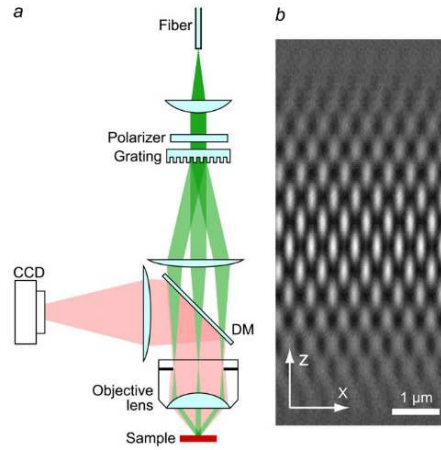


FIG. 2.25: [G] Schéma simplifié de l'optique produisant l'interférence entre trois ordres de diffraction. [D] Structure de l'illumination dans le plan de l'axe optique. Reproduit de (Gustafsson 2008).

turée par interférence du faisceau d'excitation, ce qui impose en fait $k = k_c$. Pour autant que $k_d < k + k_c$, c'est à dire que $d > \lambda/4$, ces détails seront observables. Cela conduit à une amélioration d'un facteur deux de la résolution dans chacune des dimensions spatiales (Gustafsson 1999; Gustafsson 2000; Gustafsson 2008)].

Cette technique en champ large impose néanmoins une reconstruction post-acquisition pour démêler les modes qui ont été ramenés dans la zone de détectabilité. Des développements sont encore actuellement effectués pour permettre une observation quasiment en temps réel (quelques Hz).

2.3.6 Microscopie 4π

Supposons qu'on éclaire l'arrière de l'objectif par le faisceau LASER d'excitation en lumière parallèle. L'onde plane est transformée en une onde sphérique convergeant au point focal d'excitation. Du fait de l'ouverture numérique finie de l'objectif ($N.A. = 1.45$ pour les plus grands), le front d'onde est limité à un angle solide $\Omega = 4 \arcsin(N.A./n) \leq 40\% \times 4\pi$.

Ce filtrage angulaire engendre une figure de diffraction et, particulièrement selon l'axe de propagation, un élargissement de la tache de focalisation. L'idée est la même pour la détection de fluorescence et le terme dû à l'objectif dans les fonctions de réponse impulsionnelle G_{exc} et G_{detect} possède une largeur axiale intrinsèquement élevée, de l'ordre de grandeur du double de la largeur latérale.

L'utilisation de deux objectifs de microscope placés tête-à-tête et confocaux permet de faire interférer deux fragments d'onde sphérique et de simuler une couverture importante de l'angle solide, faisant diminuer la taille du lobe axial des fonctions G . Cette technique de microscopie 4π permet alors d'augmenter la résolution axiale d'un facteur 5-7 jusqu'à environ 100 nm (Hell 1992).

En pratique, cette méthode d'imagerie par balayage est complétée par un dispositif de microscopie confocale, et éventuellement d'excitation structurée non-linéaire. Elle est bien adaptée à l'imagerie statique mais peu aux expériences de molécules uniques dynamiques, d'autant plus que la chambre est complètement prise entre les objectifs et ne permet pas d'insérer un dispositif de micromanipulation (sauf éventuellement une pince optique). Nous n'avons donc pas utilisé ce genre de technique dans notre montage.

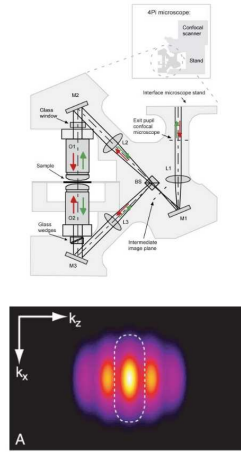


FIG. 2.26: [H] Construction schématique d'un microscope 4π . [B] Allure de la densité de champ électromagnétique dans l'espace réciproque dans le plan focal. En pointillés, la situation de microscopie confocale classique, montrant sa plus faible résolution axiale (en z). Reproduit de (Gugel 2004).

2.3.7 Excitation à deux photons

Dans le cas de l'excitation à deux photons, la brillance est une fonction non-linéaire de l'intensité d'excitation

$$\mathcal{B}(I) = \Phi_{fl,2h\nu} \sigma_{2h\nu}(\lambda) I^2 \quad (2.34)$$

où $\Phi_{fl,2h\nu}$ est le produit du rendement quantique de fluorescence à deux photons et de la section efficace d'absorption à deux photons. Du fait de cette non-linéarité en I , la brillance ne prend des valeurs appréciables que quand la densité de photons est très élevée (correspondant à des flux de l'ordre de $10^7 \text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$). Dans une configuration où le faisceau d'excitation est focalisé, seul l'environnement immédiat du point focal (largeur transverse de 500 nm) sera brillant et il n'y aura presque aucune contribution du cône de focalisation à la fluorescence.

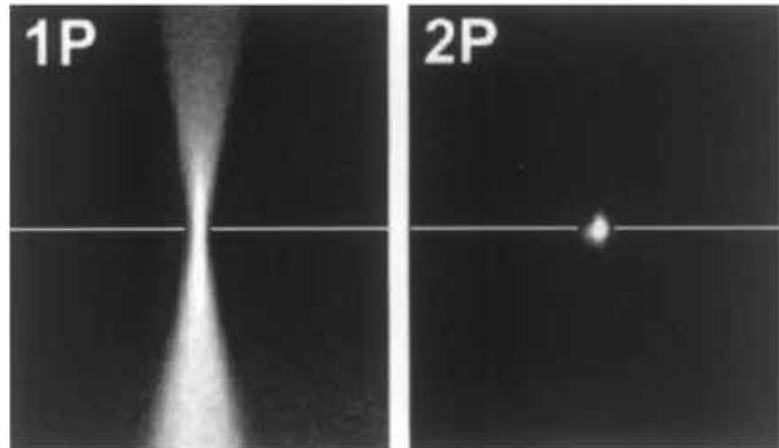


FIG. 2.27: Zones d'excitation à un et deux photon dans l'exemple de la fluorescéine. [G] Excitation à un photon pour $\lambda = 488 \text{ nm}$. [D] Excitation à deux photons pour $\lambda = 805 \text{ nm}$. Reproduit de (Soeller 1999).

Par ailleurs, la section efficace d'absorption à *un* photon à $\nu/2$ est en général beau-

coup plus faible qu'à ν ; par conséquent la longueur de pénétration Λ (p. 32) sera plus importante, ce qui permet des observations *in vivo* plus profondes (quelques millimètres, par exemple dans le cortex cérébral).

De plus, l'auto fluorescence (c'est à dire la fluorescence de molécules parasites) est plus faible en excitation à deux photons car leur section efficace d'absorption n'est (sauf accident) pas optimisée pour ce mode d'excitation. Cela diminue le bruit résiduel de fluorescence. Enfin, puisque les molécules situées en-dehors du point focal n'absorbent presque pas, le photoblanchiment est fortement diminué, ce qui permet de collecter plus de photons de l'échantillon.

L'excitation à deux photons contribue donc à limiter intrinsèquement le volume d'excitation à un espace d'environ 500 nm de côté. Elle est particulièrement adaptée aux techniques de détection ponctuelle telles que la microscopie confocale ou 4π . Nous avons donc jugé qu'elle n'était pas adaptée à nos exigences de localisation du fluorophore par imagerie.

2.4 Techniques de détection de signaux de fluorescence de fluorophores uniques

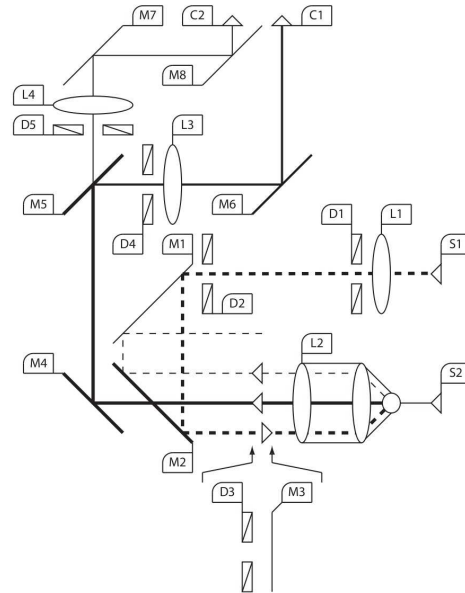


FIG. 2.28: Schémas du trajet optique de détection, tel que nous l'avons conçu et réalisé. La numérotation des éléments reprend celle utilisée dans les protocoles de réglage (p. 270)

2.4.1 Problématiques générales

Allure des signaux

Dans le cas idéal où l'intensité de fluorescence est un dirac pur, c'est à dire un fluorophore unique bien isolé, la convolution $G_{detect} \otimes \delta$ est généralement une gaussienne

$$\rho_{h\nu} = \rho_0 \exp \left[- \left| \vec{k}_\perp \wedge \vec{r} \right|^2 - \left(\vec{k}_\parallel \cdot \vec{r} \right)^2 \right] \quad (2.35)$$

2 Détection de molécules uniques par fluorescence

On oriente conventionnellement \vec{k}_\perp et \vec{k}_\parallel (tous les deux dans le sens de propagation de la lumière) selon l'axe \vec{z} . Leurs normes sont de l'ordre de $k_\perp \lesssim k_\parallel \sim 1/\lambda$.

Un capteur positionné dans le plan (x, y) transverse à la direction de propagation de la lumière, et conjugué à la source lumineuse, verra donc une intensité (avec $\xi \sim \lambda/2$)

$$I(x, y) = I_0 \exp\left[-\frac{x^2 + y^2}{2\xi^2}\right] \quad (2.36)$$

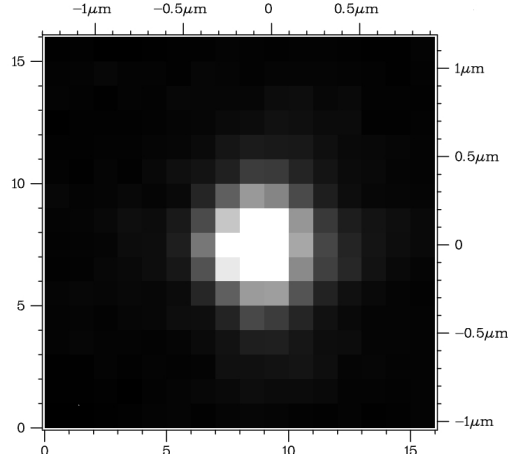


FIG. 2.29: Image d'un *Quantum Dot* isolé fixé à la surface de l'échantillon ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 655 \text{ nm}$) pour un temps d'intégration de 30 ms. Par ajustement paramétrique, nous mesurons $\xi = 420 \text{ nm}$.

Précision de pointé

Cette expression n'est qu'une densité de probabilité pour un photon émis par la source ; elle n'est réalisée effectivement que lorsqu'un grand nombre de photons ont pu être acquis par le détecteur, comme dans la figure 2.37 p. 53.

En notant a la taille d'un pixel et b la déviation standard du bruit de fond (*shot noise*), la précision sur la détermination du centre de $G_{detect} \otimes \delta$ par l'acquisition de N photons conduit à une incertitude σ sur la position du fluorophore (Thompson 2002)

$$\frac{\sigma}{\xi} = \frac{1}{\sqrt{N}} \sqrt{1 + \frac{1}{12} \left(\frac{a}{\xi}\right)^2 + \frac{8\pi b^2}{N} \left(\frac{\xi}{a}\right)^2} \quad (2.37)$$

Dans la majorité des cas, le rapport adimensionné ξ/a vaut environ 2 ou 3, c'est à dire que les photons d'une source unique sont répartis sur plusieurs pixels pour minimiser le bruit de pixelisation (second terme de σ) tout en conservant un signal N/b suffisant. Le terme dominant dans l'expression de σ est alors le bruit de photons (premier terme). Pour une acquisition de 0.5 s dans de bonnes conditions (Yildiz 2003), $N \approx 10000$ et $\sigma \approx 1 - 2 \text{ nm}$, ce qui est bien inférieur à la taille intrinsèque de la distribution de photons sur le détecteur.

Positionnement vs. séparation

La condition absolue de validité de la formule 2.37 est qu'un unique fluorophore contribue à l'observation de la distribution de photons. Dans ce cas, son positionnement peut être déterminé avec une précision nanométrique.

Dans le cas contraire, la résolution d'un système binaire de deux fluorophores proches peut être très difficile. Cette question est traitée dans la section 2.5.1 relative au critère de RAYLEIGH.

2.4.2 Introduction aux détecteurs de fluorescence

En imagerie de molécules uniques, le nombre de photons émis est très limité (10^4 - 10^5) et un soin particulier doit être apporté au choix du détecteur.

Détecteurs CCD

Les détecteurs CCD (*Charge-Coupled Devices*) consistent en une matrice de photosites constitués d'une tranche épitaxiale de silicium dopé p polarisée dans un micro-condensateur. La dimension latérale de ces *pixels* est de l'ordre de $10\ \mu\text{m}$. Un capteur haute performance est constitué d'entre 128×128 et 1024×1024 pixels selon la vitesse maximale d'acquisition souhaitée.

L'interaction avec un photon d'énergie supérieure au *gap* permet la création d'une paire électron-trou. La charge totale sur un pixel est ainsi, à longueur d'onde donnée, proportionnelle au nombre de photons reçus. Le facteur de proportionnalité est appelé *rendement quantique* et varie couramment entre 50% et 90% dans le visible.

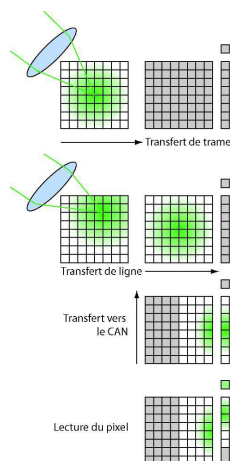


FIG. 2.30: Principe de fonctionnement d'un capteur CCD à transfert de trame. [HH] Acquisition d'une image par la matrice CCD. [H] Transfert de l'image sur la matrice non exposée, pendant que la matrice exposée acquiert l'image suivante. [B] Chaque ligne de la trame est transférée sur un registre horizontal. [BB] Chaque pixel est transféré sur le convertisseur analogique-numérique (CAN) et sa valeur est enregistrée.

A l'issue de l'acquisition, la matrice est décalée ligne par ligne par un champ électrique : la ligne k étant transférée à la place de la ligne $k - 1$, elle-même transférée à la ligne $k - 2$, etc. La ligne 1 est transférée dans un registre spécial. Ce registre est décalé pixel par pixel vers un amplificateur charge-tension, puis vers un convertisseur analogique-numérique (généralement sur 14 ou 16 bits) qui retranscrit une image de la charge, donc de l'intensité lumineuse, contenue dans chaque pixel. Le processus est répété autant de fois que de colonnes puis de lignes, et la matrice est ensuite nettoyée avant d'être utilisée pour l'étape suivante.

Dans les dispositifs à transfert de trame (*frame transfer*), la matrice de charge est totalement transférée dans une réplique (non exposée à la lumière) de même taille de la

matrice, avant d'être lue ligne par ligne. Cela évite que, pendant le temps de transfert ligne par ligne, des photons arrivant sur la ligne k à l'étape i arrivent également sur la ligne $k + 1$ à l'étape $i + 1$, etc. Ce phénomène crée des lignes verticales caractéristiques lorsque les sources de lumière sont intenses.

Le temps d'acquisition des CCD est intrinsèquement limité par le temps de transfert de charges d'abord en lignes puis en colonnes. Les détecteurs de bonne qualité pour les applications de fluorescence à faible signal arrivent à des fréquences de transfert de l'ordre de 10 MHz. Pour un capteur 512×512 pixels cela correspond à des temps d'acquisitions voisins de 30 ms.

En sélectionnant une sous-région (c'est à dire en évitant aux autres pixels de passer par l'amplificateur et le convertisseur) il est possible de diminuer le temps d'acquisition jusqu'à quelques millisecondes. Il est en revanche très difficile de sélectionner plusieurs sous-régions indépendantes.

Détecteurs CMOS

Conceptuellement, un capteur CMOS (*Complementary Metal-Oxide Semiconductor*) consiste également en une matrice de pixels accumulant chacun un signal proportionnel à l'intensité lumineuse reçue. En revanche, chaque photosite possède son propre circuit d'amplification (basé sur la technologie CMOS) intégré directement dans le détecteur. Chaque pixel peut alors être lu séparément et ne nécessite pas de transfert compliqué entre photosites.

L'avantage principal est l'intégration totale de l'électronique de détection dans le détecteur. Comme les technologies CMOS sont très utilisées dans la conception de circuits intégrés, la fabrication est plus avancée technologiquement et moins onéreuse. De plus, les temps d'acquisition sont indépendants de la taille du détecteur et permettent des fréquences d'acquisition plus élevées (facilement 500 Hz en champ megapixel).

En revanche, chaque pixel possédant un convertisseur analogique-numérique indépendant, l'homogénéité de la réponse à un éclairage constant est dégradée par rapport à un capteur CCD. De plus, le rendement quantique des détecteurs est plus faible pour une raison de section efficace d'absorption : une partie du pixel est occupée par l'électronique de traitement du signal et diminue l'espace alloué à la photodiode. Les détecteurs CMOS sont donc plus bruités pour des intensités faibles.

Bien que la technologie soit intéressante pour les applications rapides et en lumière élevée, elle n'est pas encore au niveau des capteurs CCD lorsqu'il s'agit de réaliser des observations en fluorescence de molécule unique.

Photodiodes à avalanche (APD)

Les photodiodes à avalanche (APD) sont des détecteurs ponctuels constitués d'un cœur en diode de semiconducteur (généralement du silicium pour la détection dans le visible) polarisé en inverse par une tension élevée (50-300 V correspondant à des champs de l'ordre de $10^5 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$). Une paire électron-trou créée par l'absorption d'un photon d'énergie supérieure au gap (1.12 eV dans le silicium, soit 1100 nm) est accélérée par le champ ; au-delà d'un champ critique, ils peuvent interagir avec le cristal et créer à leur tour des paires électron-trou. Par un processus d'avalanche, un courant est ainsi produit dans le détecteur.

Le grand avantage des APD est que, sous réserve que le bruit électronique soit faible, il est possible de détecter des intensités lumineuses très faibles (le bruit typique est de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de photons par seconde). Comme le gain de l'APD peut amplifier le bruit (termes de *shot noise*), il existe un gain optimal

qui maximise le rapport signal sur bruit ; il correspond sensiblement à l'égalité du bruit thermique et du *shot noise* et est de l'ordre de 100.

Par ailleurs, les APD sont des détecteurs à bande passante extrêmement large (plusieurs centaines de MHz) qui permettent des applications finement résolues en temps (comme la *Fluorescence Correlation Spectroscopy* FCS) et/ou nécessitant des mesures photon par photon. Le rendement quantique de détection est assez élevé (au moins 50% dans le visible).

En revanche, le phénomène d'avalanche est assez sensible à la température du cristal de silicium, à la tension de polarisation, aux intensités élevées, etc. Un système robuste de régulation électronique est donc nécessaire. Enfin, bien qu'il existe des éléments APD 1D, c'est un détecteur intrinsèquement ponctuel qui impose donc de scanner l'échantillon pour des applications d'imagerie.

Techniques de réduction du bruit

Dans les systèmes de détection, les sources de bruit sont nombreuses : courants de fuite dans les semi-conducteurs, *crosstalk* entre éléments voisins d'une matrice, bruit thermique, anti-corrélation du rendement quantique à temps court, etc.

Ces effets contribuent à diminuer l'efficacité globale de la détection, introduisent des corrélations entre événements indépendants, créent du bruit de détection (particulièrement sensible dans les systèmes amplifiés) ; ils dégradent donc le signal et augmentent le bruit, ce qui est particulièrement défavorable pour les applications à faible nombre de photons comme la détection de fluorophores uniques.

Un grand nombre de ces bruits d'origine matérielle sont optimisés par le constructeur (utilisation de drains, augmentation de la capacité, augmentation de la tension de polarisation ou de la vitesse de transfert de trame) qui doit les contrebalancer avec des effets indésirables sur le signal (diminution de la bande passante, du rendement quantique).

A partir d'une solution commerciale optimisée pour le type d'application souhaité, l'utilisateur dispose généralement de peu de degrés de liberté pour maximiser le rapport signal sur bruit : augmenter le temps d'acquisition, faire varier le gain et surtout refroidir le détecteur.

Conclusion

Comme nous souhaitons utiliser l'imagerie du fluorophore en champ relativement large pour effectuer sa localisation, nous n'avons pas souhaité utiliser de détecteur ponctuel. Les détecteurs CCD présentant un meilleur rapport signal-sur-bruit, essentiel à la qualité de la localisation, et ne nécessitant pas l'établissement de cartes de correction pixel par pixel, nous avons donc utilisé un capteur CCD refroidi.

2.4.3 Microscopie de fluorescence directe

La solution la plus simple consiste à utiliser le même objectif pour réaliser l'excitation et la détection de la fluorescence. L'avantage du montage d'épi-fluorescence est d'une part une plus grande compacité et d'autre part la possibilité de laisser libre le demi-espace au-dessus de la chambre d'observation, par exemple pour utiliser un dispositif de micro-manipulation. C'est la solution que nous avons retenue (*cf.* Fig 2.28 p. 43).

Dans ce cas, il est nécessaire d'installer un dichroïque réjecteur de fréquences M_2 , correspondant aux longueurs d'onde des sources d'excitation, immédiatement à l'arrière de l'objectif L_2 . Celui-ci collecte les photons de fluorescence, de longueur d'onde plus élevée que la longueur d'onde d'excitation, et qui sont donc transmis par le filtre M_2 .

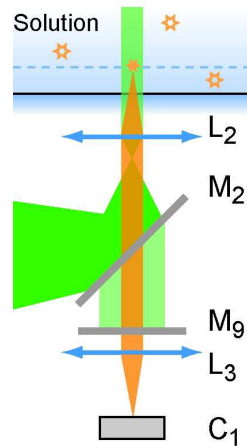


FIG. 2.31: Montage d'excitation/détection de fluorescence à objectif unique. Le LASER est focalisé sur le plan focal arrière de l'objectif L_2 et forme un volume d'excitation cylindrique dans la solution. La lumière émise par les fluorophores situés au voisinage du plan focal avant de L_2 (tireté) est collectée par L_2 et traverse le miroir dichroïque M_2 . Une proportion faible de photons d'excitation, ainsi que des photons parasites de diffusion peuvent également traverser M_2 . Tous les photons situés hors de la bande spectrale d'émission des fluorophores sont éliminés par M_9 . Les photons de fluorescence sont ensuite focalisés sur la surface active du détecteur C_1 . La numérotation des éléments optiques reprend celle des protocoles d'alignement.

Un second filtre dichroïque M_9 agit comme un passe-bande adapté à la bande d'émission du fluorophore pour éliminer les photons parasites (lumière ambiante, reste du faisceau d'excitation, etc.). L'image est ensuite projetée sur la surface sensible du détecteur C_1 par la lentille L_3 .

Ce montage permet une configuration assez flexible du matériel, notamment parce que la propagation se fait en lumière parallèle, ce qui permet d'insérer des éléments supplémentaires sur le trajet optique (miroirs, filtres). Par ailleurs, il n'introduit presque pas de filtrage puisque les éléments optiques sont diaphragmés à un diamètre généralement plus grand que celui de l'objectif L_2 .

Enfin, le système peut être très facilement isolé des sources de photons extérieures dans un boîtier adapté, puisqu'il n'est pas nécessaire d'intervenir régulièrement pour adapter le réglage. Puisqu'il comprend peu d'éléments optiques (deux filtres d'efficacité supérieure à 97% et les lentilles L_2 et L_3), il diminue peu le signal de fluorescence.

2.4.4 Imagerie multicouleurs et *Dual View*

Puisque le système d'excitation permet généralement d'exciter plusieurs fluorophores simultanément, la sélection par le dichroïque M_9 d'une unique bande spectrale, même s'il est possible d'acquérir une série d'images avec des filtres M_9 différents, constitue un gâchis d'information.

En effet, à l'aide d'une série de réjecteurs placés le long du trajet optique à 45° , il est possible d'extraire toute une série de bandes spectrales. Dans la mesure où il est coûteux de multiplier les détecteurs, on se contente généralement d'isoler deux bandes spectrales qui sont projetées par L_3 sur deux moitiés du détecteur C_1 .

Ce dispositif, appelé *Dual View*, permet d'enregistrer en temps réel le champ d'observation dans deux couleurs différentes. Il est particulièrement adapté aux études de

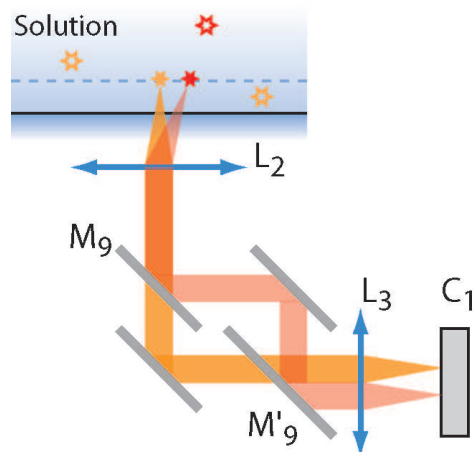


FIG. 2.32: Les photons de fluorescence émis par deux fluorophores de nature différente (orange et rouge) sont collectés par l'objectif L_2 . Un miroir dichroïque adapté M_9 sépare les deux composantes, qui sont recombinaées sur un miroir M'_9 identique, mais avec un léger décalage. Les photons sont ainsi projetés par la lentille L_3 à la surface du détecteur C_1 avec un léger décalage spatial. La numérotation des éléments optiques reprend celle des protocoles d'alignement.

colocalisation de deux objets (repérée par la colocalisation des fluorophores qui y sont fixés) ainsi qu'aux expériences soigneuses de FRET où il est nécessaire de vérifier simultanément (et rapidement) la qualité des deux fluorophores.

L'inconvénient de ce système est que la correspondance entre les positions sur les images de chacune des couleurs est difficile à réaliser à une précision qui soit vraiment significative du point de vue de la colocalisation ($\leq 5nm$). La colocalisation multicolore de manière générale est un problème expérimental très délicat, en raison des nombreuses sources de décalage (en particulier les aberrations optiques et chromatiques) entre les différentes couleurs. Cependant, une calibration soignée du montage permet d'obtenir une colocalisation nanométrique (Churchman 2005).

Nous avons construit un ensemble d'optiques de *Dual View* pour des expériences ultérieures de FRET ou d'illumination en deux couleurs, mais nous ne l'avons pas utilisé dans les expériences décrites dans ce travail.

2.4.5 Microscopie confocale

Raison d'être

Un système optique bien conçu conjugue généralement le plan du détecteur avec un plan d'intérêt dans la chambre d'observation. Sous réserve que l'optique soit la plus rigoureusement stigmatique possible, cela a pour conséquence que l'ensemble des photons émis par une source ponctuelle dans le plan d'observation, et passant par le système indépendamment du chemin suivi, atteignent le détecteur au même point.

Absolument rien ne garantit en revanche que tous les photons ayant atteint le détecteur en un point donné ont pour origine une source ponctuelle située dans le plan d'observation. En pratique, le signal sera donc pollué par un bruit issu de la fluorescence en-dehors du plan d'observation.

La technique d'excitation en ondes évanescentes permet certes de réduire l'excitation à une fine tranche (quelques 100 nm) ; pour peu que le plan d'observation soit confondu avec cette tranche, peu de bruit viendra dégrader le signal. Cependant, toutes les expériences

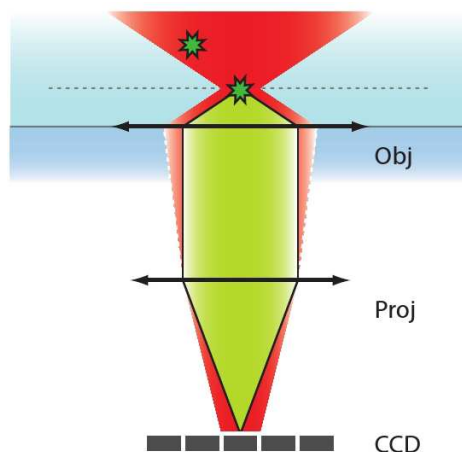


FIG. 2.33: Le système optique, constitué de l'objectif et d'une lentille de projection, conjugue un point du plan focal de la cellule d'observation (pointillé gris) à un point du détecteur, c'est à dire que tous les photons récupérables (vert) y aboutissent. Cependant, des rayons lumineux venant d'autres points (limités par la zone rouge) y aboutissent également, dégradant le rapport signal sur bruit. Note : les éléments optiques et la cellule d'observation ne sont pas à la même échelle et cet effet n'est pas uniquement dû à la taille non-nulle du pixel.

ne sont pas compatibles avec la proximité de la surface de la chambre d'observation, et d'autre part il peut être intéressant de reconstruire par des tranches bidimensionnelles un objet tridimensionnel comme une cellule, un embryon, *etc.* ce qui interdit de se placer au voisinage immédiat de la surface.

Effet de taille

L'angle solide sous lequel est vu le détecteur par un point situé dans la chambre d'observation diminue en s'éloignant du conjugué du détecteur par le système optique. Si on se fixe une borne supérieure d'angle solide, c'est à dire de probabilité qu'un photon d'un point non conjugué atteigne le détecteur, cela définit une région de l'espace qui peut être vue comme la généralisation de la profondeur de champ.

Les dimensions de cette région diminuent fortement lorsque la taille du détecteur diminue puisque tous les rayons du point conjugué au détecteur continuent à y arriver (aux diaphragmes près) alors que de moins en moins de rayons de points non-conjugués l'atteignent. Cela conserve raisonnablement le signal et diminue fortement le bruit.

Si le détecteur devient trop petit, les effets de diffraction prennent de l'importance et diminuent le signal. Le rapport signal sur bruit maximal est obtenu pour un détecteur ayant la taille de la tache d'AIRY du système : $0.61\lambda f'/N.A.a \approx \lambda f'/2a \approx 5 - 20\mu m$.

Utilisation d'un sténopé

La plupart des détecteurs ont une dimension de cet ordre. Les pixels de la caméra CCD que nous avons utilisée mesurent par exemple environ $15 \mu m$. Les images acquises par ce procédé sont néanmoins encore intrinsèquement bruitées par les photons émis hors-champ.

Il est cependant possible d'adapter un dispositif à l'observation par un détecteur de taille arbitraire : c'est la *microscopie confocale*. En lieu et place du détecteur est placé un sténopé (*pinhole*), c'est à dire un écran percé d'un trou, en l'occurrence de la taille

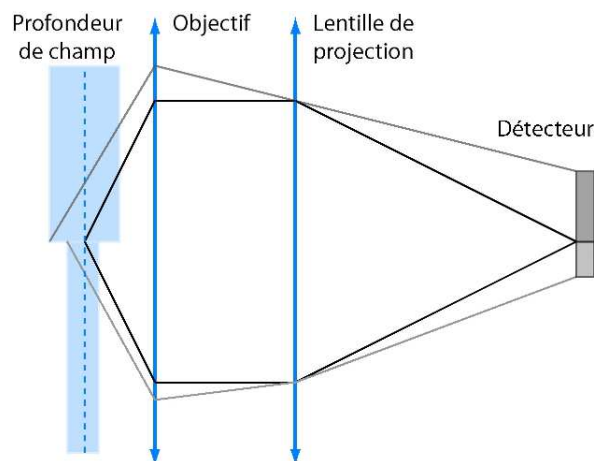


FIG. 2.34: Effet de taille du détecteur sur la profondeur de champ. [H] Pour un détecteur de taille finie (par exemple la taille d'un pixel CCD) diaphragmé par la lentille de projection L_3 , il existe une certaine profondeur de champ (large zone bleue) autour du plan conjugué du détecteur (trait tireté). [B] Plus la taille du détecteur diminue, plus la profondeur de champ diminue.

de la tache d'AIRY. L'immense majorité des photons émis hors du conjugué du sténopé est stoppée par l'écran. Ceux émis par la région confocale au sténopé le traversent et viennent frapper le détecteur placé légèrement derrière lui. La distance entre le sténopé et le détecteur ne dépend que de la taille du détecteur et de l'angle sous lequel le diaphragme (généralement la lentille L_3 de projection sur le détecteur) est vu par le sténopé.

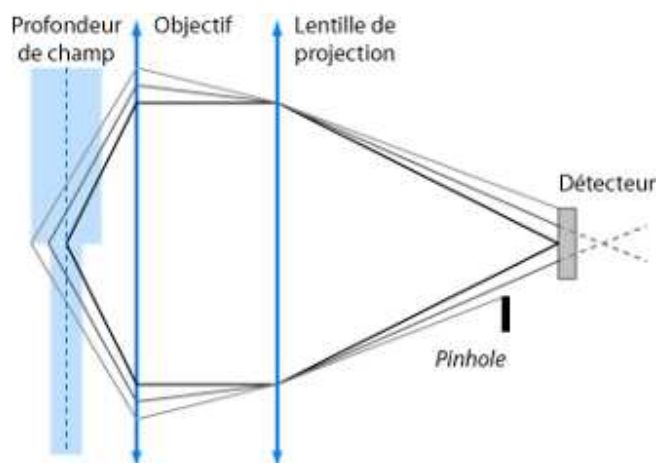


FIG. 2.35: [H] Profondeur de champ associée à la taille du détecteur. [B] En diaphragmant le détecteur par un sténopé (*pinhole*), l'angle solide vu par le détecteur diminue, et la profondeur de champ également.

Cette méthode permet également d'améliorer légèrement (de 10-20 %) les résolutions latérale et axiale du microscope.

Nécessité d'un balayage

Par construction, la microscopie confocale est une technique d'imagerie ponctuelle, c'est à dire qu'elle conjugue le détecteur avec un quasi-point de l'échantillon. Il est donc

nécessaire de balayer la surface de la tranche 2D de l'échantillon qu'on souhaite imager en la conjuguant point par point avec un détecteur quasi-ponctuel (généralement un photomultiplicateur). Cette opération est réalisée à l'aide de miroirs galvanométriques pilotés à une fréquence de quelques milliers de Hz. Le temps d'acquisition d'une image statique est très raisonnable (de l'ordre de grandeur de la seconde à grand champ).

Pour augmenter la cadence d'acquisition pour des applications dynamiques comme le suivi de molécules uniques, et tirer également partie du parallélisme des détecteurs matriciels (comme les CCD par opposition aux détecteurs quasi-ponctuels comme les APD ou le photomultiplicateurs), il est possible d'utiliser des réseaux de sténopés astucieusement déplacés, comme les disques de NIPKOW. Les applications de microscopie confocale rapide en imagerie naturellement grand champ restent cependant balbutiantes.

Comme nous l'avons indiqué précédemment, la nécessité d'effectuer une observation de fluorescence en imagerie grand champ et avec une bande passante élevée nous a conduit à ne pas utiliser une configuration confocale.

2.5 Techniques de localisation de fluorophores

Au-delà de la qualité de la détection des photons de fluorescence, diverses techniques permettent d'effectuer un traitement post-acquisition pour augmenter la résolution.

2.5.1 Le critère de Rayleigh dans le plan transverse

Résolution vs. précision

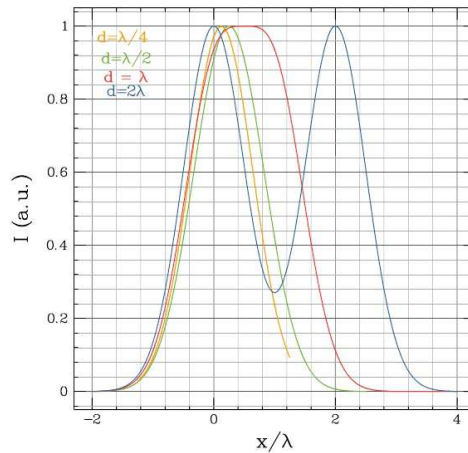


FIG. 2.36: Illustration du critère de RAYLEIGH sur la séparation de deux sources ponctuelles. En augmentant la séparation d/λ de $1/4$ (jaune) à $1/2$ (vert) puis 1 (rouge) et enfin 2 (bleu), l'image des sources par le système optique passe d'une tache unique à une tache large (dont on peut séparer les deux composantes par un ajustement non-linéaire) puis deux taches bien séparées.

Critère de séparation Considérons deux sources ponctuelles identiques $\rho_{fl}^1 = \delta(x)$ et $\rho_{fl}^2 = \delta(x-d)$. La convolution avec l'optique de détection engendre une densité de photons sur le détecteur (les coordonnées spatiales x sont ramenées à celles de l'échantillon)

$$\rho_{h\nu} = \rho_0 [\exp(-x^2/2\xi^2) + \exp(-(x-d)^2/2\xi^2)] \quad (2.38)$$

La forme de la fonction de réponse G_{detect} imposant $\xi \sim \lambda/2$, la question que pose le critère de RAYLEIGH est : dans quelle mesure peut-on discriminer $\rho_{h\nu}$ de l'image d'une source unique $\rho'_0 \exp(-(x - x'_0)^2/2\xi'^2)$?

Une réponse visuelle est donnée par la figure 2.36. Quelle que soit la forme précise de la fonction de réponse G_{detect} le critère de séparation de RAYLEIGH indique que la condition nécessaire est $d \gtrsim \lambda/2$.

Critère de précision En substance, ce critère ne concerne que la mesure d'une *distance* relative entre deux sources et ne dit rien de leur *position*. De plus, il suppose qu'il s'agit de discriminer deux situations où on ne connaît pas le nombre de sources ρ_{fl} à l'origine de l'observation $\rho_{h\nu}$.

Cependant, en se plaçant dans des conditions de molécules uniques, il est possible d'être certain qu'on n'observe qu'une seule source à la fois : *a priori* par des arguments de dilution ou en observant la statistique de *blinking* d'un *Quantum Dot* par exemple, ou *a posteriori* en vérifiant le photoblanchiment tout-ou-rien du fluorophore organique.

Dans ce cas, la densité de photons sur le détecteur se réduit toujours à $\rho_0 \exp(-(x - x_0)^2/2\xi^2)$; il est alors facile de déterminer la position spatiale x_0 du fluorophore avec une grande précision (de l'ordre du nanomètre, p. 53).

Localisation latérale nanométrique dynamique

FIONA Le principe de la technique FIONA (*Fluorescence Imaging with One-Nanometer Accuracy* (Yildiz 2005)) repose sur la capacité à déterminer la position d'un fluorophore *isolé* avec une précision très grande, alors même que l'optique de détection confère une largeur finie ξ à la distribution de position des photons de fluorescence sur le détecteur.

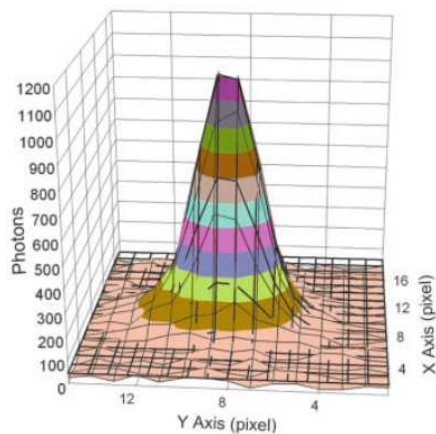


FIG. 2.37: Distribution des photons de fluorescence issus d'une unique molécule de Cy3, collectés sur un détecteur CCD. La largeur de la distribution est de l'ordre de 120 nm et correspond à environ 14000 photons collectés. Reproduit de (Yildiz 2003).

Pour un grand nombre de photons, la forme de la distribution est très bien définie et son centroïde peut être déterminée avec une excellente précision, de l'ordre de ξ/\sqrt{N} (cf. eq.2.37 p. 44). Lorsque le fluorophore est présent sur un moteur moléculaire, sa position lors des pas successifs peut ainsi être déterminée et conduire à des observations mécanistiques directes, comme dans le cas de la Myosine V (Yildiz 2003) ou de la kinésine (Yildiz 2004) .

Nous avons utilisé cette technique de localisation des fluorophores dans une expérience de principe. Nous en présentons les résultats p. 93.

SHRIMP La technique de SHRIMP (*Super High Resolution IMaging with Photobleaching*) (Gordon 2004) est un moyen détourné de circonvenir le critère de séparation : en observant le photoblanchiment de fluorophores uniques, on peut à partir du dernier fluorophore soustraire sa contribution $\rho_{hv}(n)$ à $\rho_{hv}(n) + \rho_{hv}(n-1)$ pour en déduire $\rho_{hv}(n-1)$, et ainsi de suite.

Cette technique est utilisable pour n pas trop grand (2-3) et uniquement en configuration statique (donc peu adaptée à nos expériences), mais c'est un exemple intéressant d'utilisation des propriétés réelles des fluorophores.

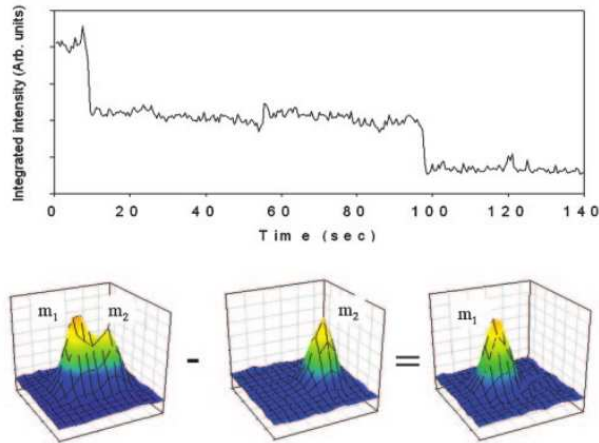


FIG. 2.38: [H] Variation temporelle du signal total observé, montrant le photoblanchiment successif de deux molécules. [B] Reconstruction de la distribution de photons de fluorescence issus des deux molécules de Cy3, collectés sur le détecteur CCD. Reproduit de (Gordon 2004).

SHREC La technique de SHREC (*Single molecule High REsolution Colocalization*) est en quelque sorte un extension dynamique du SHRIMP. Deux fluorophores de nature différente sont excités et émettent dans des bandes spectrales différentes.

En observant alternativement l'une et l'autre, il est possible de déterminer avec une précision nanométrique la position de chacun d'entre eux. La distance entre les deux, même si elle est inférieure à la limite de séparation du critère de RAYLEIGH, peut donc être déterminée (certes avec une erreur double de FIONA).

Tant que les fluorophores sont actifs et du moment que suffisamment de photons ont été collectés, cette opération peut être répétée plusieurs fois. Cette technique est très bien adaptée aux expériences en molécule unique ; elle a par exemple été utilisée dans la mesure du pas de la Myosine V avec une résolution spatiale de 8 nm et temporelle de 0.5 s (Churchman 2005). Les expériences que nous avons envisagées ne nécessitent pas l'utilisation de cette technique.

Imagerie à très haute résolution

PALM La PALM (*PhotoActivated Localization Microscopy*) est une technique d'imagerie statique grand champ à très haute résolution utilisant une méthode de reconstruction basée sur FIONA.

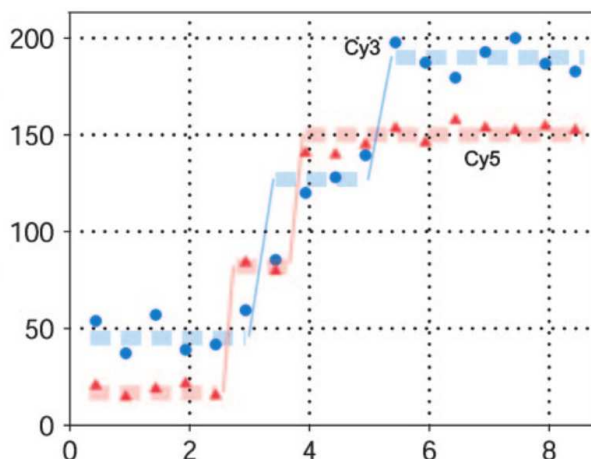


FIG. 2.39: Application de la technique de SHREC à un couple de fluorophores Cy3/Cy5 placés sur les deux bras d'une molécule de Myosine V. Les données représentent la position (en nm) des fluorophores le long du filament d'actine en fonction du temps (en s). Reproduit de (Churchman 2005).

Le principe consiste à effectuer des cycles d'acquisition à très faible densité de fluorophores afin de déterminer pour chacun des fluorophores leur position par FIONA. L'image finale est le résultat de l'accumulation de ces cycles (Betzig 2006).

Pour obtenir ces densités très faibles, des fluorophores photoactivables sont utilisés ; un flash peu intense de faisceau d'activation est émis, puis les rares fluorophores actifs sont observés jusqu'à leur photoblanchiment par le faisceau d'excitation, et ainsi de suite.

L'application concerne plutôt l'imagerie cellulaire et ce sont des protéines photoactivables de type XFP (Patterson 2002) ou mKikGr (Habuchi 2008), qui sont généralement utilisées comme protéines de fusion fluorescentes. La bande passante de cette technique n'est en revanche pas adaptée à l'activité biologique que nous souhaitons sonder dans ce travail.

STORM La STORM (*sub-diffraction-limit imaging by STOchastic Optical Reconstruction Microscopy*) est une variante de la PALM utilisant des fluorophores organiques photoactivables (Bates 2007; Vogelsang 2009).

Elle est plutôt pensée pour des expériences de molécules uniques statiques que pour l'imagerie. La résolution reportée dans l'article fondateur (Rust 2006; Huang 2008) est de 20 nm.

2.5.2 Localisation par calibration position-intensité

Dans la mesure où une intensité de fluorescence est mesurable avec une bande passante dynamique plus importante qu'une position, il est tentant d'utiliser un couplage position-intensité de fluorescence par illumination structurée en z pour réaliser des expériences en molécule unique.

Du fait de la réflexion totale à l'interface verre-eau, le profil d'intensité d'excitation en ondes évanescentes suit une loi

$$G_{exc} \otimes I_{exc} = I(x, y) \exp(-z/\Lambda) \quad (2.39)$$

La longueur de pénétration Λ ne dépend que du rapport des indices et de la longueur d'onde et est de l'ordre de 100-200 nm.

Par conséquent, sous réserve que $I(x, y)$ soit homogène, la mesure de l'intensité totale de fluorescence $\int \rho_{hv} dS$ captée par le détecteur pour un fluorophore unique est une mesure de sa position en z .

Le temps d'exposition nécessaire pour une précision de positionnement donnée varie comme

$$\Delta t = \frac{1}{v \left(\frac{\Delta z}{z}\right)^2} \quad (2.40)$$

avec v la fréquence efficace d'émission de photons de fluorescence. Pour une précision de 10% avec 10^3 photons par seconde, la bande passante est de l'ordre de 10 Hz. Nous montrons l'utilisation de cette technique dans une expérience de principe p. 90.

2.5.3 Colocalisation par FRET

Idée générale

La technique de SHREC permet de déterminer dynamiquement la distance entre deux fluorophores en champ large avec une résolution de l'ordre de 5-10 nm. Les mouvements moléculaires lors du cycle enzymatique sont en général légèrement plus restreints, de l'ordre de 0.5-5 nm. Le FRET (*Fluorescence Resonant Energy Transfer*) est une technique d'excitation non-linéaire (p. 25) permettant de sonder dans cette gamme la distance entre deux fluorophores bien choisis, avec une grande bande passante et en imagerie à champ large.

En principe, le système est excité à la longueur d'onde d'absorption maximale du donneur (D) et observé à la longueur d'onde d'émission maximale par fluorescence de l'accepteur (A). La mesure de l'intensité relative de fluorescence de A (par rapport à son maximum) donne accès à l'efficacité E du transfert non-radiatif et donc à la distance entre D et A par la formule 2.23.

Contrairement à la technique de SHREC, il est inutile de collecter suffisamment de photons pour déterminer la position de chacun de A et D puis d'en faire la soustraction pour trouver leur distance. Il suffit simplement de collecter suffisamment de photons pour estimer avec une précision suffisante $I_{fl}(A)/I_{fl,max}(A)$ (ce qui correspond à une bande passante de l'ordre du kHz)

Réalisation pratique

Ces avantages ont contribué à l'essor très important du FRET dans les techniques de fluorescence et également au raffinement constant des méthodes d'analyse des signaux. En pratique, $I_{fl}(A)/I_{fl,max}(A)$ est une donnée très difficilement mesurable, et ce pour beaucoup de raisons : nombre de fluorophores non constant dans le champ de vue, fluctuations des rendements quantiques des différents processus par rapport à leur valeur moyenne, effets de stoechiométrie entre D et A, etc.

Sans rentrer dans les détails des méthodes astucieuses qui ont été développées (Gell 2006), l'idée principale consiste à s'assurer à chaque instant de l'état de D et A en sondant alternativement (ALEX-FRET) leur contribution respective à l'intensité totale de fluorescence. L'efficacité est ensuite déterminée par une méthode ratiométrique entre les intensités de fluorescence de A et D.

Une méthode alternative utilise la diminution de la durée de vie de l'état excité lors du FRET et permet par des mesures résolues en temps (dans l'espace des temps ou des fréquences) de mesurer directement k_{FRET} et donc la distance R entre D et A. Des mesures en FCS permettent également de remonter à ce paramètre.

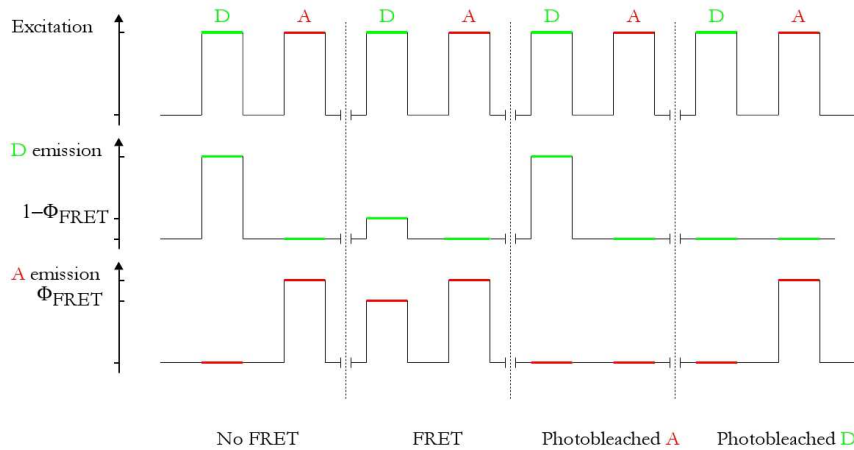


FIG. 2.40: Principe de l'excitation alternée pour vérifier l'état des deux partenaires de FRET.

Comme nous le signalons dans l'état de l'art des connaissances sur FtsK et l'ARN Polymérase de T7, des études de FRET sont susceptibles de fournir des informations intéressantes, notamment sur le couplage entre l'activité et des changements structuraux. Nous avons donc prévu dans notre montage les équipements nécessaires à l'utilisation du FRET.

En pratique, nous avons rencontré des difficultés dans l'intégration des pinces magnétiques et du microscope de fluorescence dans le même montage. Nous avons donc repoussé l'intégration de l'optique de FRET pour nous concentrer sur la résolution de ces problèmes.

Conclusion

La nécessité de faire une imagerie du fluorophore pour en mesurer précisément la position, avec une bande passante compatible avec les phénomènes biologiques, nous a conduit à faire le choix technologique de l'imagerie grand champ par un capteur CCD.

Nous avons utilisé une excitation en ondes évanescentes par le même objectif que celui d'observation de la fluorescence, pour libérer le demi-espace nécessaire à l'utilisation des pinces magnétiques.

Nous avons choisi d'utiliser une illumination la plus simple possible, sans autre forme de modulation qu'en z , en nous réservant toutefois la possibilité d'insérer une optique de FRET, que nous avons déjà conçue.

Enfin, nous avons utilisé une technique de type FIONA pour la reconstruction de la localisation du fluorophore.

Deuxième partie

Pinces magnétiques et
fluorescence en ondes
évanescentes

3 Micro-manipulation par pinces magnétiques

Et qu'on ne dise pas que nous réduisons ainsi les théories physiques au rôle de simples recettes pratiques ; ces équations expriment des rapports et, si les équations restent vraies, c'est que ces rapports conservent leur réalité.

(Poincaré, La Science et l'Hypothèse)

Introduction

Les premières expériences de micromanipulation de billes magnétiques ont été effectuées dans le groupe de Bustamante en 1992 (Smith 1992) avec la première mesure de l'élasticité d'une molécule unique d'ADN.

Depuis, des dispositifs bien adaptés à l'étude en traction et torsion de la molécule ont été développés, notamment dans notre laboratoire (Strick 1996; Strick 1998). D'autres variantes, utilisant généralement des électroaimants ont été également proposées (Amblard 1996; Sacconi 2001; Gosse 2002; Huang 2002; de Vries 2005).

Nous décrivons ici le type de configuration la plus courante, comparable à celle développée dans notre groupe et commercialisée par PICOTWIST.

3.1 Principe des expériences

Pour pouvoir micromanipuler une molécule unique d'ADN, il faut être capable de l'ancrer spécifiquement d'une part à une surface et d'autre part à une bille magnétique. Pour cela, nous disposons sur chacune des extrémités de la molécule d'ADN un groupement chimique qui forme une liaison stable avec un groupement complémentaire qui sera greffé sur les surfaces. La stabilité de la liaison doit être suffisante pour que l'on puisse observer et manipuler l'ensemble pendant une durée de l'ordre de quelques heures à quelques jours.

Les groupements utilisés sont d'une part le couple biotine/streptavidine, et d'autre part le couple digoxigénine/antidigoxigénine. Il est possible d'acheter des billes magnétiques recouvertes de streptavidine, et il est assez simple d'obtenir une surface de verre fonctionnalisée par de l'anti-digoxigénine (le détail des protocoles figure en annexe p.260). Diverses méthodes classiques de biologie moléculaire permettent de fonctionnaliser les extrémités de l'ADN d'une part avec de la biotine, d'autre part avec de la digoxigénine : incorporation de bases modifiées par PCR (Polymerase Chain Reaction), utilisation d'amorces de PCR fonctionnalisées, création d'extrémités protubérantes 3' fonctionnalisées à l'aide d'une terminal-transférase. Le détail des réactions utilisées pour synthétiser les substrats ADN figure également en annexe p.244.

L'ADN fonctionnalisé est mélangé dans un tube à essai à une solution de billes magnétiques (figure 3.1A) et incubé afin que l'extrémité biotine des molécules d'ADN se

fixe à la surface recouverte de streptavidine des billes (figure 3.1B). 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'antidigoxigénine (figure 3.1C). Un rinçage doux de la microchambre permet de s'assurer que les billes ne portant pas de molécule d'ADN sont évacuées (figure 3.1D).

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 constitue d'autant moins un problème que des tests simples d'élasticité permettent de s'assurer que la bille est ancrée par un lien unique à la surface.

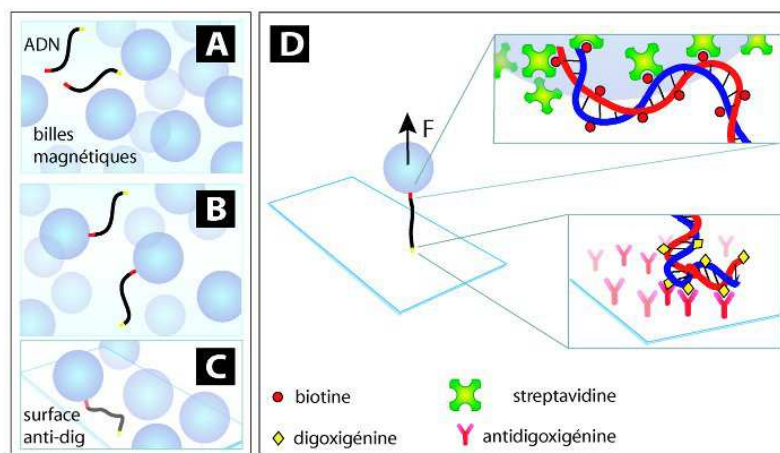


FIG. 3.1: **A** Dans un tube à essai, des molécules d'ADN modifiées à leurs extrémités (respectivement biotine et digoxigénine) sont mélangées à un large excès de billes magnétiques fonctionnalisées streptavidine (diamètre $1 \mu\text{m}$). **B** Après incubation, un petit nombre de billes porte une molécule d'ADN. **C** Le mélange billes-ADN est incubé (en l'absence de force magnétique) dans une microchambre dont la surface est recouverte de streptavidine. **D** Après quelques minutes de rinçage, seules les billes portant une molécule d'ADN restent piégées au voisinage de la surface. Il est possible de les étirer verticalement en approchant les aimants de l'échantillon. Les encadrés montrent le détail de l'ancrage de la molécule d'ADN sur la bille d'une part (haut), et sur la surface d'autre part (bas). De multiples points d'ancrages sur chacun des brins permettent de contraindre la molécule d'ADN à suivre la torsion imposée par la bille.

3.2 Le dispositif

3.2.1 Description globale

Le principe des pinces magnétiques a déjà été décrit dans (Strick 1999; Gosse 2002) et nous nous contenterons d'en rappeler les caractéristiques principales. Essentiellement, il s'agit d'un microscope inversé, dans lequel un couple d'aimants permet de micromanipuler une bille magnétique (*cf.* fig.3.2). Un éclairage peu focalisé permet d'imager les billes et de suivre la position 3D d'une ou plusieurs billes simultanément (p. 66).

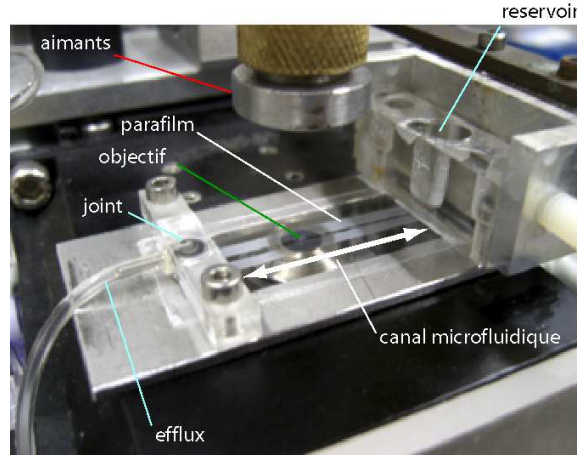


FIG. 3.2: Photo de l'ensemble du dispositif. Un réservoir ($\sim 1000 \mu\text{L}$) creusé dans un bloc de PMMA est plaqué contre la cellule microfluidique. Celle-ci est constituée de deux lamelles de verres superposées autour d'un rectangle de Parafilm fondu de $150 \mu\text{m}$ d'épaisseur. Un canal, qui constitue la chambre d'observation, d'environ 1 mm de large est creusé sur toute la longueur du film ; il est connecté au réservoir et à la sortie de la chambre. Cette sortie est reliée à une pompe aspirante à faible débit (de l'ordre de $10\text{-}50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$). La surface inférieure de la cellule est posée sur un objectif à immersion. Au-dessus de la surface supérieure, des aimants sont manipulés en translation (selon l'axe z) et en rotation (autour de cet axe). Ils peuvent être amenés aussi près qu'environ $200 \mu\text{m}$ de la surface inférieure. L'éclairage du dispositif est assuré par une diode (non figurée) dont la lumière passe à travers l'entrefer des aimants.

3.2.2 Microchambre

La surface inférieure de la chambre est constituée d'une lamelle de verre d'environ $145 \mu\text{m}$ d'épaisseur. Pour les applications de fluorescence, sa qualité optique et son indice de réfraction doivent être le plus élevés possibles.

La partie supérieure est également constituée d'une lamelle de verre identique, mais sa nature précise n'est par contre pas critique. En revanche, il est essentiel qu'elle soit la plus fine possible. En effet, pour assurer le meilleur couplage possible entre le champ magnétique et la bille magnétique, c'est à dire pour obtenir les plus grands forces, il faut maximiser le produit

$$F_{mag} \sim \mu R^3 \partial_{\parallel} B_{\perp} \quad (3.1)$$

Le moment magnétique volumique μ dépend du matériau de la bille et est déjà raisonnablement optimisé par le fabricant (*cf.* Fig 3.5 p. 67). Par contre, les billes magnétiques sont produites commercialement en différentes tailles. Comme les mesures avec la meilleure résolution sont effectuées avec des billes les plus petites possibles (p. 69), c'est $\partial_{\parallel} B_{\perp}$ qui contrôle vraiment la force maximale. Comme ce terme est très non-linéaire avec la distance entre les aimants et la bille (*cf.* Fig 3.7 p. 69) et croît fortement avec la proximité des aimants, ceux-ci doivent pouvoir se trouver les plus proches possibles de la bille magnétique, idéalement quelques centaines de microns.

Le canal microfluidique est réalisé en intercalant entre les deux lamelles un espaceur en polymère fondu (dans notre cas du Parafilm) d'environ $50 \mu\text{m}$ d'épaisseur comportant en son centre un canal évidé. Ce canal est connecté à l'extérieur de la chambre par deux petits trous d'un millimètre de diamètre percés dans la lamelle supérieure par une sableuse, projetant un jet très fin de particules de corindon. Avec la connectique fluide

appropriée, un flux peut ainsi être créé dans la chambre, avec un débit de l'ordre de quelques dizaine de microlitres par minute.

Pour assurer la stabilité mécanique de l'expérience, la chambre est solidement plaquée contre une pièce métallique par des joints en silicone. Cette pièce est elle-même positionnée sur la platine du microscope.

3.2.3 Optique

Le voisinage de la surface inférieure de la chambre est imagé par un objectif de microscope. Pour les besoins des applications de fluorescence, nous avons utilisé un objectif à grande ouverture numérique à immersion à huile ($100\times$, N.A. = 1.45, Olympus). Le plan d'observation est conjugué avec le détecteur d'une caméra CCD (JAI CV-M30, $f_v = 60$ Hz).

Par ailleurs, le plan d'observation est éclairé en lumière parallèle par une diode électroluminescente dans l'infrarouge proche (800 nm). Nous avons choisi la longueur d'onde pour être facilement séparée de l'émission de fluorescence à l'aide d'un miroir chaud (*cf.* Fig 2.28 p. 43). Les macromolécules biologiques (protéines, ADN) sont de dimension bien trop réduites pour être observables avec une telle longueur d'onde.

L'image recueillie consiste alors simplement en la superposition des figures de diffraction de la lumière par les billes magnétiques micrométriques. Nous utilisons ces figures de diffraction pour mesurer la position spatiale des billes (p. 66).

3.2.4 Bâti

Les techniques de micromanipulation de molécule unique nécessitent la mesure de déplacements relatifs de l'ordre du nanomètre. La plupart des microscopes classiques n'ont pas été conçus pour ce type d'utilisation, et sont très peu stables mécaniquement. Le manque de stabilité s'explique d'une part par le nombre important de dispositifs mécaniques permettant d'assurer une grande versatilité au microscope (inutile dans notre cas), et surtout par le fait que les problèmes de stabilité à cette échelle ont sans doute été ignorés lors de la conception.

Les montages de pinces magnétiques bâtis sur des microscopes commerciaux ont donc été progressivement remplacés dans l'équipe par des microscopes spécialement conçus. L'optique et la mécanique ont été simplifiées au maximum.

L'obstacle majeur à la stabilité du microscope est posé par les dérives thermiques : les fluctuations de température dilatent ou contractent les pièces mécaniques différemment selon leur nature, ce qui génère de grandes dérives dans les basses fréquences (≤ 1 Hz). Face à ce problème, l'approche en général utilisée est de réguler la température du dispositif ou de la pièce où se déroule l'expérience. Cela permet de limiter le problème, mais pas suffisamment (*cf.* Fig 3.4 p. 65) : par exemple, nous savons qu'un objectif se dilate de $1\ \mu\text{m}$ par K. Même ramenées à une variation de 0.01 K par une régulation efficace, les fluctuations restent de l'ordre de 10 nm.

Bien que nous ne l'ayons pas intégré au dispositif présenté ici en raison des composants supplémentaires liés à la fluorescence, notre équipe dispose de systèmes permettant de fortement réduire cet effet en maintenant l'objectif par une pièce mécanique, qui permet de compenser la dilatation de celui-ci (*cf.* Fig 3.3 p. 65). Pour assurer une précision raisonnable à mes mesures, nous nous sommes contentés de travailler en environnement thermo-régulé et de n'opérer que des mesures de longueur différentielles entre une bille de référence collée non-spécifiquement à la surface et la bille d'intérêt. Les dérives thermiques du bâti sont très raisonnablement annulées par ce type de mesure.

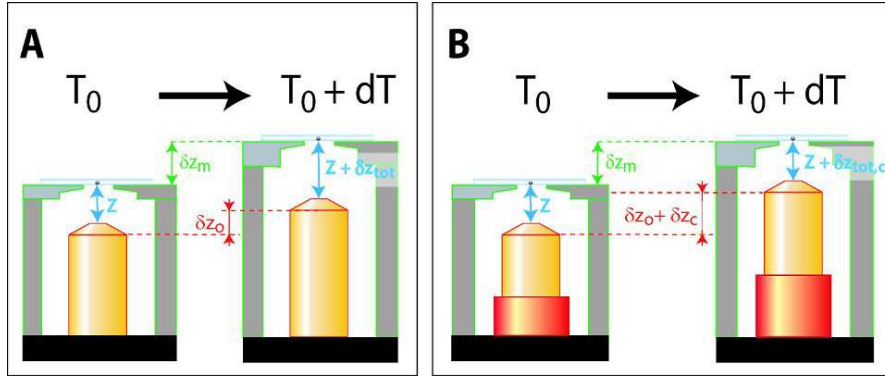


FIG. 3.3: **A** Suite à une fluctuation de température dT , le bloc contenant l'objectif (jaune) et les montants du bâti du microscope (gris) se dilatent respectivement de δz_o et δz_m . Comme les coefficients de dilatation sont différents, la distance entre l'objectif et la bille change d'une quantité $\delta z_{tot} = \delta z_m - \delta z_o$, typiquement $1 \mu\text{m}$ pour une dérive d'un K. **B** L'ajout d'une pièce mécanique (rouge) spécialement conçue de manière à compenser la différence de dilatation entre l'objectif et les montants permet de limiter les dérives dues aux fluctuations thermiques. Reproduit de (Lionnet 2006a).

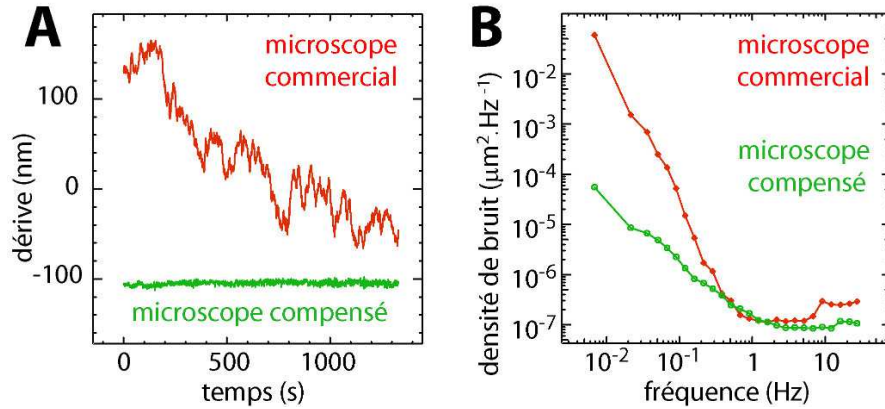


FIG. 3.4: **A** Mesure de la dérive d'une bille fixée sur la surface de la microchambre au cours du temps, sur un montage construit à partir d'un microscope commercial (rouge) et sur le montage avec compensation des dérives thermiques (vert). **B** Spectre de puissance des dérives de la figure **A**. La remontée des spectres dans le domaine des basses fréquences correspond aux dérives thermiques. Reproduit de (Lionnet 2006a).

3.2.5 Aimants

Pour créer une force magnétique la plus grande possible et également optimiser la résolution, il faut disposer de gradients $\partial_{\parallel} B_{\perp}$ importants. Ils sont réalisés par une paire d'aimants alignés parallèlement le long de leur axe magnétique (p. 12).

Le gradient $\partial_{\parallel} B_{\perp}$ augmente d'une part en rapprochant la source de champ des billes magnétiques le plus possible. D'autre part, à champ magnétique et distance à la bille constants, le gradient augmente en diminuant l'entrefer. Enfin, bien évidemment, le gradient augmente avec la valeur du champ rémanent des aimants. Les aimants que nous avons utilisés sont une paire de cubes de NeFeB d'environ 4 mm de côté, avec un entrefer d'environ $500 \mu\text{m}$ et positionnés entre $300 \mu\text{m}$ et 2 mm au-dessus des billes magnétiques. Le champ au centre de l'entrefer est de l'ordre de 1 Tesla et décroît sur l'axe z exponen-

tiellement avec une longueur caractéristique de l'ordre de celle de l'entrefer.

Par ailleurs, cette configuration des aimants impose naturellement un axe magnétique transverse \vec{B}_\perp confondu avec l'axe magnétique des aimants. Par conséquent, la rotation de celui-ci permet d'imposer une rotation de l'axe du champ et donc d'imposer un couple de torsion à la bille magnétique.

Pour toutes ces raisons, l'élément portant les aimants est motorisé à la fois en translation selon la direction z et en rotation autour de l'axe z pour contrôler la traction et la torsion appliquées à la bille magnétique.

3.3 Billes magnétiques

Les billes magnétiques utilisées sont constituées d'un matériau superparamagnétique, c'est-à-dire qui présente à la fois une forte susceptibilité et une aimantation rémanente nulle. En pratique, les billes sont constituées d'un ensemble de nanocristaux ferromagnétiques fixes, orientés dans une matrice non-magnétique (Pankhurst 2003). Ces nanodomains sont suffisamment petits pour perdre leur aimantation rémanente sous l'effet des fluctuations thermiques.

La courbe d'aimantation des billes utilisées (MyOne, Dynal) suit une loi de Langevin, classique pour un matériau paramagnétique (*cf.* Fig 3.5 p. 67). L'interaction entre le dipôle magnétique ainsi formé et le champ magnétique résulte en une force verticale, orientée vers les champs forts $\vec{F} = (\vec{M} \cdot \vec{\nabla}) \vec{B}$. On peut donc prédire simplement en fonction de la distance aimants-échantillon la force exercée sur une bille (en utilisant la courbe d'aimantation de la bille — fournie par le fabricant — et la mesure de la variation du champ magnétique avec la distance, *cf.* fig.3.5B).

On pourrait penser au vu de l'accord entre la prédiction de la force et sa mesure (*cf.* Fig 3.5 p. 67), qu'il suffit ensuite de connaître la distance entre les aimants et l'échantillon pour pouvoir en déduire la valeur de la force. Ce n'est pas possible expérimentalement du fait de la légère polydispersité des billes : à distance des aimants constante, on observe une distribution de force de largeur $\sim 15\%$. Nous devons donc pour chaque bille recalibrer la relation donnant la force en fonction de la distance aimants-échantillon.

3.4 Suivi vidéo et mesure de position

Le principe de la détection de la position de la bille repose sur la configuration particulière de l'éclairage : 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 (*cf.* fig. 3.6, (Ovryn 2000)). Un calcul simple 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 2 dimensions l'information sur la troisième dimension. En effet, la taille des 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 : nous exerçons une force élevée sur la bille, ce qui étire l'ADN et surtout réduit les fluctuations browniennes de la position de la bille, qui prend donc une position spatiale presque fixe. Nous déplaçons ensuite l'objectif sur une gamme de positions le long de l'axe optique. Pour chacune de ces positions, nous enregistrons quelques images de la bille afin d'obtenir

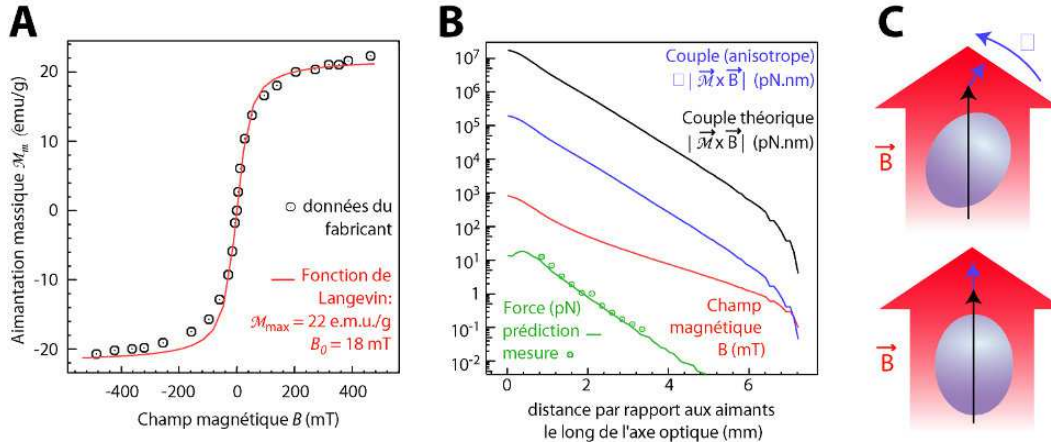


FIG. 3.5: **A** Le rayon et la masse d'une bille valent respectivement $1 \mu\text{m}$ et 10^{-12}g . Les données sont ajustées à une fonction de Langevin : $\mathcal{M} = \mathcal{M}_{max}(\coth(B/B_0) - B_0/B)$. **B** A partir de l'aimantation d'une bille et de la variation spatiale du champ magnétique créé par les aimants (courbe rouge), il est possible de prédire la valeur de la force en fonction de la distance aux aimants (courbe verte, en bon accord avec les points correspondant aux données expérimentales). La valeur théorique du couple (courbe noire $\Gamma_{th} = \vec{M} \times \vec{B}$) est deux ordres de grandeur au-dessus des valeurs typiques exercées sur les billes. La valeur réelle du couple est plus faible du fait de l'anisotropie de l'aimantation de la bille. Un ordre de grandeur du couple maximum réellement subi par la bille est donné ici par la courbe bleue où l'on a pris $\alpha = 0.01$. Les valeurs de ce couple restent quelques ordres de grandeur au-dessus des couples en jeu dans les molécules biologiques (quelques pN.nm). **C** La bille magnétique possède une légère anisotropie, ce qui lui confère en première approximation une direction privilégiée d'aimantation (indiquée par le grand axe de l'ellipse). Lorsque l'on applique un champ magnétique \vec{B} (haut), l'aimantation de la bille est orientée majoritairement le long de la direction du champ (noire), mais possède une petite composante (environ 100 fois plus faible) le long de la direction d'aimantation privilégiée (bleue). C'est cette seconde composante qui est à l'origine d'un couple Γ forçant la bille à s'orienter le long de l'axe du champ (bas). Reproduit de (Lionnet 2006a).

une image moyenne. On obtient donc un jeu d'images à partir duquel est extraite la relation entre le profil des anneaux et la position de l'objectif. C'est ce que nous appelons *l'image de calibration*.

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. Notons toutefois que le déplacement de l'objectif ne correspond pas à celui du point focal ; il existe une relation de proportionnalité simple entre les deux due à la réfraction lors du passage de l'interface verre-eau. Dans notre cas

$$\frac{\Delta z_{bille}}{\Delta z_{obj}} = \frac{n_{eau}}{n_{verre}} = 0.878 \quad (3.2)$$

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 nous exerçons une force verticale, une variation de l'extension de l'ADN produit un déplacement de la bille de la même quantité. Nous avons donc accès directement à une mesure de l'extension 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 cependant 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 100 nm sur l'extension absolue de la molécule. En général, la mesure de l'activité d'une protéine ne nécessite une grande précision que sur des variations relatives de la molécule d'ADN et cette limitation ne pose donc pas de problème majeur. Nous reviendrons ultérieurement sur les moyens d'obtenir un positionnement absolu.

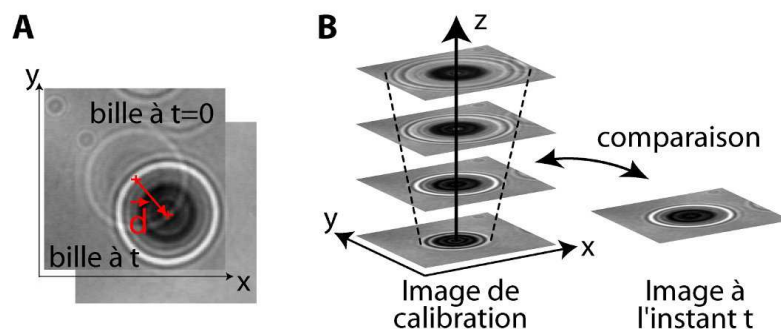


FIG. 3.6: **A** A un instant t donné, on enregistre la position du centroïde des anneaux de diffraction. En effectuant la corrélation du profil radial d'intensité à t avec celui à $t=0$, on obtient le déplacement de la bille dans le plan (x,y) . **B** Au début de l'expérience, on varie la distance relative bille-plan objet en maintenant 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 calibrations ce qui permet, connaissant la position de l'objectif, de remonter à la position de la bille.

Par ailleurs, la construction de l'image de calibration comme la mesure de z sont totalement parallélisables et notre groupe a fait la démonstration du suivi de la position en temps réel de plus de 60 billes en même temps.

3.5 Mesure de force

3.5.1 Introduction

L'idée la plus naturelle des actuateurs de micromanipulation est d'utiliser un actuateur élastique pour coupler force et déplacement ; cette relation linéaire correspond à un piègeage harmonique de raideur k dans la direction dans laquelle la force est exercée (perpendiculairement à la poutre pour les actuateurs mécaniques par exemple). Intrinsèquement, ces systèmes sont à position d'équilibre imposée et la force est introduite par la déviation par rapport à cette position d'équilibre.

Les pinces magnétiques sont un type de dispositif un peu particulier. En effet, le champ est couplé aux moments magnétiques des particules contenues dans la bille par un terme proportionnel au gradient longitudinal de la composante transverse du champ magnétique $\partial_{\parallel} B_{\perp}$. Ce gradient évolue sur des distances de l'ordre du millimètre. A l'échelle des déplacements moléculaires (1 nm- 1 μ m), la force exercée par la bille magnétique est donc *constante*. Le potentiel ressenti localement par la bille magnétique est donc *linéaire*.

3.5.2 Principe de la mesure de force

A proprement parler, ce dispositif n'est donc pas vraiment une pince, en tout cas pas dans la direction de la force. En effet, nous rappelons en annexe (p. 292) pourquoi la bille magnétique est bien piégée dans un potentiel harmonique effectif, mais dans le plan transverse. Nous rappelons également que ce potentiel effectif permet en fait de mesurer directement la force, sans avoir à calibrer des paramètres dépendant du matériel (taille et composition de la bille, champ magnétique, etc.).

Le résultat est que la force peut être exprimée comme

$$F = \frac{\langle z \rangle k_B T}{\langle \Delta r_{\perp}^2 \rangle} \quad (3.3)$$

Toutes ces quantités sont mesurables sans calibration et la force peut ainsi être déterminée sans hypothèse additionnelle.

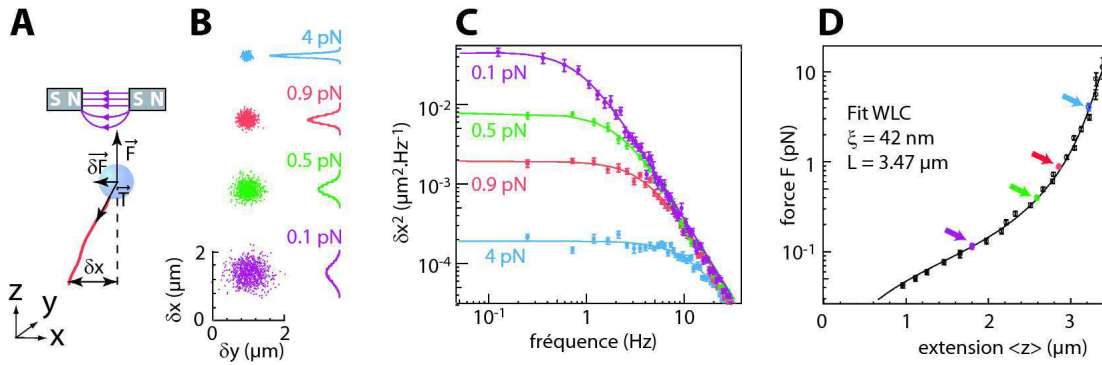


FIG. 3.7: **A** La résultante des forces exercées sur la bille par l'ADN et les aimants constitue une force de rappel F_{\perp} équivalente à un ressort de raideur $k = F/\langle z \rangle$. **B,C,D** Les données en B,C et D ont été obtenues sur une molécule d'ADN de 11 kbp ($L_0 = 3.5 \mu\text{m}$), dans 25 mM Tris-Ac pH 7.5, 150 mM KAc, 10 mM MgAc, $T = 25^{\circ}\text{C}$. Le diamètre de la bille vaut $1 \mu\text{m}$. **B** Les fluctuations transversees ($\delta x, \delta y$) suivent une loi gaussienne. Les fluctuations suivant x (direction du champ magnétique) ont une distribution plus fines que celles suivant y (direction orthogonale au champ). La largeur de la distribution décroît avec la force (voir texte). Le centre des fluctuations a été déplacé pour plus de clarté. **C** Spectre des fluctuations de position transversees de la bille. L'ajustement des données à une lorentzienne permet d'extraire la valeur de la force. **D** Courbe force-extension d'une molécule d'ADN double brin. La valeur de la longueur de persistance $\xi = 42 \text{ nm}$, plus faible que la valeur généralement citée ($\sim 50 \text{ nm}$), correspond aux conditions de forte salinité utilisées ici (Wang 1997). Les fluctuations transversees et spectres donnés en **B** et **C** correspondent aux points de couleur indiqués par les flèches. Reproduit de (Lionnet 2006a).

3.5.3 Comment est *vraiment* mesurée la force

En réalité, la mesure de la force n'est pas exactement effectuée comme décrit au paragraphe précédent. Pour des raisons liées à la nature stochastique du mouvement brownien, la mesure est effectuée dans l'espace réciproque. Le détail du calcul est rappelé en annexe (p. 293).

L'idée directrice est que le système agit pour les fluctuations dans le plan (x, y) comme

un filtre passe-bas de fréquence de coupure

$$\omega_c = \frac{k_{\perp}}{6\pi\eta R} \quad (3.4)$$

Pour une bille micrométrique attachée à un ADN micrométrique et soumise à une force de l'ordre du piconewton, la fréquence de coupure est de l'ordre de 10 Hz (*cf.* Fig 3.8 p. 70).

Le spectre de puissance des fluctuations latérales s'écrit alors

$$|\bar{r}|^2(\omega) = \frac{|\overline{FL}|^2(\omega)}{k_{\perp}^2} \cdot \frac{1}{1 + \frac{\omega^2}{\omega_c^2}} \quad (3.5)$$

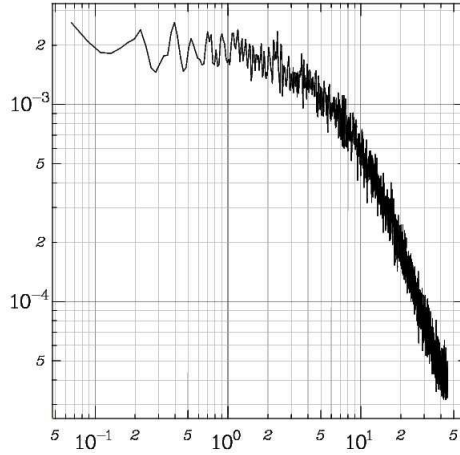


FIG. 3.8: Graphe du spectre de puissance (en $\mu m^2/Hz$) des fluctuations δy (perpendiculaires au plan des lignes de champ) en fonction de la fréquence (en Hz). Le spectre a été nettoyé des dérives à basse fréquence par coupure pure et simple. L'analyse donne $k_{\perp} = 0.197 \text{ pN}/\mu m$ et $f_c = 7.53 \text{ Hz}$. Par ailleurs, $\langle z \rangle + R = 4.37 \mu m$ donc $F = 0.86 \text{ pN}$.

En pratique, comme représenté dans la figure 3.8, le spectre expérimental de puissance des fluctuations transverses est nettoyé des plus basses fréquences (dérives mécaniques par exemple) puis ajusté à une lorentzienne, conduisant aux valeurs expérimentales de ω_c et $|\bar{r}|^2(0)$, ou bien intégré numériquement.

Cette analyse a déjà été très bien décrite dans des travaux précédents et appliquée avec succès à la détermination de la force magnétique. Nous mettons dans ce cas à profit l'expérience du laboratoire dans la conception du matériel et des logiciels de contrôle des pinces magnétiques.

3.5.4 Comment est vraiment vraiment mesurée la force

Mesures à haute force

La donnée du spectre de fréquence de coupure ω_c est critique pour la détermination de la force. Or, le mouvement de la bille est enregistré par une caméra vidéo avec une fréquence d'acquisition f_v . D'après le critère de NYQUIST, il faut suréchantillonner à au moins le double de la fréquence de coupure pour pouvoir la mesurer. Cela impose une contrainte sur les forces mesurables à bille et ADN donnés

$$\frac{F}{R\langle z \rangle} < \frac{2\eta f_v}{3} \sim 4 \cdot 10^{-2} \text{ pN} \cdot \mu m^{-2} \quad (3.6)$$

Correction de l'acquisition vidéo

Par ailleurs, l'échantillonnage vidéo agit comme un filtre moyennant sur le spectre de fluctuations de r ; la convolution des fonctions de transfert entraîne un repliement des spectres (*aliasing*) et fausse la mesure (*cf.* Fig 3.9 p. 71). Il est donc nécessaire de déconvoluer préalablement le spectre de puissance des fluctuations en effectuant une division dans l'espace réciproque par le spectre d'acquisition de la caméra, de fréquence caractéristique $2\pi f_v$, afin de reconstruire le spectre de fluctuations vu par la caméra avant échantillonnage (Berg-Sørensen 2004)..

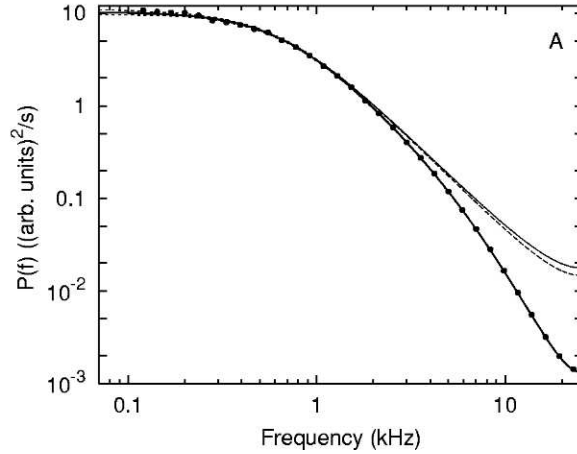


FIG. 3.9: Spectre de puissance des fluctuations latérales de position (dans le cas d'un dispositif de pinces optiques). La comparaison entre les spectres avec *aliasing* (trait plein fin) et déconvolué (trait plein épais) montre l'effet important du repliement dans les hautes fréquences, qui contiennent beaucoup d'informations. Reproduit de (Berg-Sørensen 2004) Fig. 5A(a).

Ce traitement est réalisé automatiquement lors de la mesure de force, la fréquence d'acquisition de la caméra étant connue (30-90 Hz selon les cas).

Mesures à basse force

Indépendamment des limitations à hautes forces dues à l'échantillonnage, les mesures à basse force peuvent également s'avérer problématiques. La fréquence de coupure devient si faible qu'il faut un grand nombre de mesures pour la déterminer avec précision. Cela peut être compris par une analogie avec ce qu'il se passerait si nous effectuions la mesure dans l'espace direct.

Le temps de corrélation des fluctuations τ_c est de l'ordre de grandeur de l'inverse de la fréquence de coupure. Pour effectuer proprement le calcul de la moyenne de r^2 , il faut moyenner le signal $r^2(t)$ sur des fenêtres de largeur τ_c pour s'assurer que chacune des fenêtres est indépendante.

Par conséquent, la précision relative de la mesure de $\langle r^2 \rangle$ varie comme $\sqrt{\tau_c/t}$ et pas $\sqrt{\tau_v/t}$ où τ_v est le temps d'échantillonnage de la vidéo. Cela peut conduire à des temps d'acquisitions déraisonnables compte tenu des inévitables dérives à temps long du système de mesure.

Anisotropie des fluctuations transverses

L'analyse détaillée ci-dessus ne tient pas compte de l'anisotropie des fluctuations : en effet, comme la bille est constamment orientée dans la direction du champ magnétique, ses fluctuations transverses sont anisotropes. Dans la direction orthogonale au champ, la bille peut tourner autour de l'axe de son moment magnétique.

Par conséquent, la longueur de la molécule (z) intervenant dans l'expression de la force doit être remplacée par une longueur effective correspondant à la somme de la longueur de la molécule et du rayon de la bille. En revanche, dans la direction du champ, la bille ne peut que se translater et la longueur du lien correspond bien à celle de la molécule (cf. Fig 3.10 p. 72). Il importe donc de mesurer les fluctuations de la bille le long de l'axe du champ magnétique.

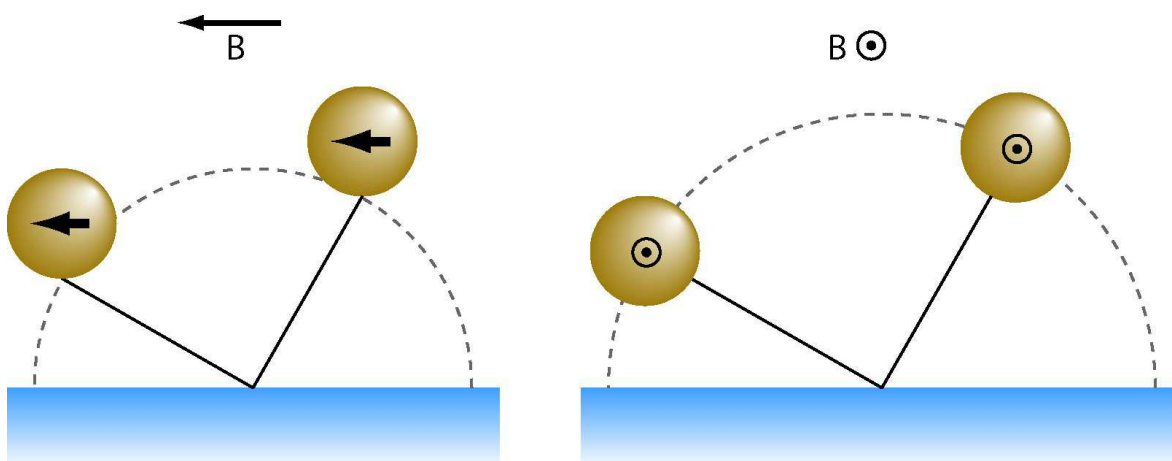


FIG. 3.10: En raison du couple de rappel magnétique $-M \times B$, le moment magnétique de la bille s'oriente parallèlement aux lignes de champ. [G] Dans le plan des lignes de champ, le couple magnétique de rappel impose un pivotement à la base de bille. La longueur effective à prendre en compte est celle de l'ADN seule. [D] Dans le plan perpendiculaire aux lignes de champ, le couple de rappel magnétique n'a pas d'influence et la longueur à considérer est celle de l'ADN augmentée du rayon de la bille.

Mesure différentielle

On a vu que les dérives thermiques, même dans le montage compensé, induisent des fluctuations de position dans le domaine des basses fréquences. Cet effet peut être largement corrigé par le suivi simultané de deux billes, la première étant la bille d'intérêt, la seconde une bille non magnétique fixée sur la surface de verre. En soustrayant à la position de la bille mesurée celle de la bille fixe, la contribution de la dérive de la distance objectif-échantillon est presque totalement éliminée.

Cependant, le bruit sur la mesure de position dans le domaine des hautes fréquences est dû d'une part à l'erreur du suivi de la position (pour la bille fixe), d'autre part aux fluctuations browniennes (pour la bille d'intérêt). Ces deux bruits ne sont pas corrélés, donc s'additionnent lors de la mesure différentielle. Pour remédier à ce problème, nous opérons un filtrage passe-bas des fluctuations de la bille fixe et soustrayons la mesure filtrée à la position de la bille mobile.

3.5.5 Effet des paramètres expérimentaux sur la bande passante

Taille de la bille

D'après l'équation 3.4, la fréquence de coupure du système est donnée par

$$\omega_c = \frac{F}{6\pi\eta R\langle z \rangle} \quad (3.7)$$

Au vu des caractéristiques magnétiques de la bille, elle se comporte essentiellement comme

$$\omega_c = \frac{\mu R^2 \partial_{\parallel} B_{\perp}}{\eta \langle z \rangle} \quad (3.8)$$

A hautes forces, pour ne pas se trouver limité trop vite par la fréquence d'acquisition vidéo, il existe une borne supérieure à la taille optimale de la bille

$$R < \frac{f_v \eta \langle z \rangle}{\mu \partial_{\parallel} B_{\perp}} \quad (3.9)$$

La prédiction de R par cette équation est délicate car $\mu \partial_{\parallel} B_{\perp}$ est difficile à estimer ; il n'en reste pas moins que plus la bille est petite, meilleure est la résolution. Nous avons donc travaillé le plus souvent possible sur des billes de 1 μm de diamètre.

Longueur de la molécule

Pour obtenir une résolution élevée dans le cas de petits changements de longueur, l'amplitude totale du bruit en z doit être la plus faible possible. Comme c'est une fonction croissante de la taille de la molécule, la meilleure résolution est obtenue pour les molécules d'ADN les plus courtes possible.

Cependant, la fréquence de coupure augmente lorsque la taille de la molécule diminue, ce qui est éventuellement défavorable au travail à haute force. Dans certains cas, un compromis doit donc être trouvé entre ces deux effets.

Conclusion

Du point de vue matériel comme logiciel, l'appareil de pinces magnétiques était déjà bien maîtrisé et fonctionnel au commencement de nos travaux. Bien que nous ayons bénéficié des améliorations au cours de notre étude, notre effort de conception s'est plutôt porté sur le microscope de fluorescence.

La réalisation d'un montage conjoint a imposé de construire un appareil légèrement différent de ceux utilisés au laboratoire, et nous présenterons p. 85 une analyse comparative de notre montage avec l'état de l'art.

4 Physique statistique de l'ADN

Mon verre est plein d'un vin
trembleur comme une flamme
Ecoutez la chanson lente d'un
batelier
Qui raconte avoir vu sous la lune
sept femmes
Tordre leurs cheveux verts et
longs jusqu'à leurs pieds

(Apollinaire, Nuits Rhénanes)

L'ADN est un polymère, c'est à dire qu'il est structurellement constitué de l'enchaînement d'unités répétitives — appelées «les bases». Une modélisation raisonnable consiste donc à le représenter comme une cordelette unidimensionnelle possédant une longueur de KUHN a .

Dans une approximation simpliste, la corrélation est une fonction $G(\Delta s) = G_0 \cdot \delta(s \leq \xi)$, l'ADN est constitué d'une chaîne de maillons indépendants et est donc décrit par une statistique gaussienne. Cette contribution purement entropique à l'élasticité s'accorde mal aux données expérimentales (Lionnet 2006a) mais donne un ordre de grandeur de $\xi = a/2 \approx 50nm$. Cette longueur est considérablement supérieure à la taille d'un monomère ($0.34nm$), ce qui indique qu'une approche continue du comportement de l'ADN est plus adaptée.

On remarque également que cela signifie d'une part que la molécule d'ADN est localement très rigide, puisque corrélée en orientation à grande distance. D'autre part, à l'échelle de forces et de déformations biologiques (pN·nm), l'élasticité entropique est sondée bien avant les termes enthalpiques (comme la déformation des liaisons chimiques dans la molécule); cela conduit à un effet de gommage de la séquence, qui est absorbée dans les corrélations à grande distance.

Nous rappelons ici les principaux développements théoriques réalisés sur la physique de l'ADN; nous mettons à cette occasion en valeur les comportements singuliers prédits et observés, et comment nous les avons utilisés dans nos expériences.

4.1 Comportement en traction

Sous force, la contribution de la rigidité de courbure à l'énergie totale s'appelle le *modèle du ver* (Kratky 1949) et s'écrit

$$E = \frac{1}{2} \xi k_B T L_0 \cdot \frac{1}{L_0} \int_0^{L_0} \left\| \frac{\partial \vec{t}}{\partial s} \right\|^2 ds - F L_0 \cdot \frac{1}{L_0} \int_0^{L_0} \cos \theta ds \quad (4.1)$$

Le premier terme représente l'intégrale curviligne de l'énergie de courbure locale, dimensionnée par le module de courbure ξ . Le second est le travail de la force de traction le long de la molécule (de longueur de contour L_0).

Le premier résultat (non trivial) est que la fonction de corrélation d'orientation s'écrit

$$G_{\vec{t}}(\Delta s) \equiv \langle \vec{t}(0) \cdot \vec{t}(\Delta s) \rangle = G_0 \exp\left(-\frac{|\Delta s|}{\xi}\right) \quad (4.2)$$

Le module de courbure joue donc finalement le rôle de longueur de corrélation en orientation qu'avait la longueur a dans le modèle gaussien. La manière la plus facile de l'estimer reste en utilisant la relation force-extension de la molécule. Ce problème peut être résolu exactement (Marko 1995), même s'il n'existe pas de relation analytique entre force F et extension ϵ . Une approximation (Bouchiat 1999) permet d'approcher les résultats du modèle avec une précision de 0.1 % :

$$F = \frac{k_B T}{\xi} \left[\frac{1}{4(1 - \langle \epsilon \rangle)^2} + \sum_{k=0}^7 a_k \langle \epsilon \rangle^k \right] \quad (4.3)$$

<i>Coefficient</i>	<i>valeur</i>
a_0	$-1/4$
a_1	1
a_2	-0.5164228
a_3	-2.737418
a_4	-16.07497
a_5	-38.87607
a_6	-38.49944
a_7	-14.17718

TAB. 4.1: Coefficients de l'approximation polynômiale du modèle du ver

L'extension relative locale moyenne $\langle \epsilon \rangle$ étant l'intégrale de la projection de l'abscisse curviligne sur l'axe de la force

$$\langle \epsilon \rangle = \frac{1}{L_0} \int_0^{L_0} \cos \theta ds \quad (4.4)$$

Au-delà du terme logique $a_0 = -1/4$ et $a_1 = 1$, cette approximation analytique n'exhibe pas un sens physique évident ; elle est cependant en excellent accord avec les données expérimentales. Ce modèle permet d'obtenir la valeur de la longueur de persistance de l'ADN dans les conditions physiologiques : $\xi \approx 50$ nm, soit 150 paires de bases (*cf.* fig. 4.1).

Comme signalé précédemment, le modèle du ver néglige l'existence d'une courbure induite par la séquence locale de l'ADN (Crothers 1990; Marko 1995; Nelson 1998; Bensimon 1998). Le module de courbure doit être renormalisé par une longueur de corrélation structurelle

$$\xi_{eff}^{-1} = \xi^{-1} + \xi_{struct}^{-1} \quad (4.5)$$

La longueur $\xi_{struct} \sim 400$ nm est la longueur de persistance qui correspond aux fluctuations de courbure structurelle (aléatoires à des échelles supérieures à 1000 paires de bases). Cet effet n'entraîne toutefois que de faibles corrections au modèle (Marko 1995).

4.1.1 Corrections à haute force

Le modèle du ver décrit bien le domaine de l'élasticité entropique et la saturation de l'extension de la molécule dans le régime des forces modérées (inférieures à 10 pN). Toutefois, au contraire d'un ressort idéal, le ressort entropique devient inextensible lorsque la molécule atteint sa longueur de contour.

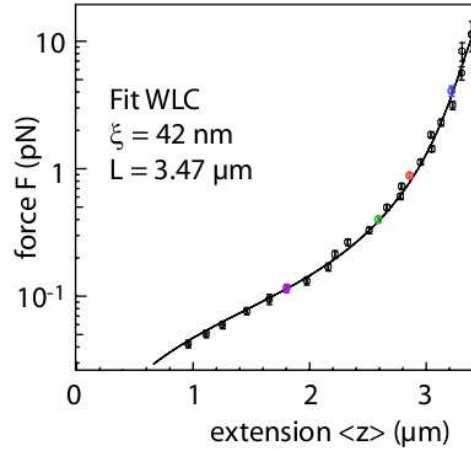


FIG. 4.1: Courbe Force-Extension expérimentale de l'ADN double brin. L'ajustement paramétrique au modèle du ver donne $\xi = 42$ nm et $L = 3.47$ μm . Reproduit de (Lionnet 2006a).

La force exercée est alors suffisante pour introduire des réarrangements conformationnels mineurs qui allongent légèrement la molécule. Cet effet enthalpique est introduit de manière phénoménologique sous la forme d'une contribution élastique (Smith 1996)

$$\Delta E = \frac{4\pi^2 k_B T B L_0}{p^2} \cdot \frac{1}{L_0} \int_0^{L_0} \epsilon^2 ds \quad (4.6)$$

Ici, $p = 3.6$ nm représente le pas de l'hélice, $B \approx 78$ nm le module d'extension de l'ADN, et ϵ représente l'extension relative locale. La valeur de B implique qu'étirer une paire de bases de 10% de plus que son extension d'équilibre coûte environ $4 k_B T$. Les élongations à l'échelle des molécules typiquement observées (quelques milliers de paires de bases) sont donc très faibles.

4.2 Comportement en torsion

Pour simplifier le traitement du problème, on ne conserve que le premier terme du développement en traction de l'énergie locale

$$E = \frac{4\pi^2 k_B T L_0}{p^2} \cdot B \epsilon^2 - F L_0 \epsilon \quad (4.7)$$

On note que la minimisation d'une énergie de cette forme par rapport à la traction ϵ conduit à la traction d'équilibre

$$\epsilon_0 = \frac{F p^2}{8\pi^2 k_B T B} \quad (4.8)$$

Un certain nombre de quantités seront introduits dans la suite, elles sont rassemblées dans le tableau 4.2.

4.2.1 Etude des phases de l'ADN

La physique détaillée des phases de l'ADN est rappelée en annexe (p. 285). Nous en présentons ici les principales caractéristiques. Dans la suite du manuscrit, la phase stable

Symbole	Signification	Valeur
B	module de traction	~ 100 nm
C	module de torsion	~ 78 nm
D	module de <i>twist-stretch</i>	~ -9 nm
G	module de flexion	~ 25 nm
p	pas hélical	3.6 nm
η_D	énergie de dénaturation	~ 25 $k_B T$ /tour

TAB. 4.2: Quantités utiles dans le traitement du comportement de l'ADN en torsion. Ces constantes sont données pour la phase **B** de l'ADN.

de l'ADN est nommée phase **B**, conformément à la notation habituelle. Nous introduisons ici les notations spécifiques phase **T** pour désigner les tresses de plectonèmes (*cf.* Fig 4.2 p. 78) et phase **D** pour désigner la dénaturation de la double hélice.

Effet général de la torsion

Sous l'effet d'une contrainte de torsion $\sigma = \frac{p}{2\pi} \frac{\theta}{L_0}$, l'ADN assimilé un tube rigide de longueur de contour L_0 accumule de la torsion. Il se déforme d'abord élastiquement, puis flambe au-delà d'une contrainte critique (*cf.* Fig 4.2 p. 78).

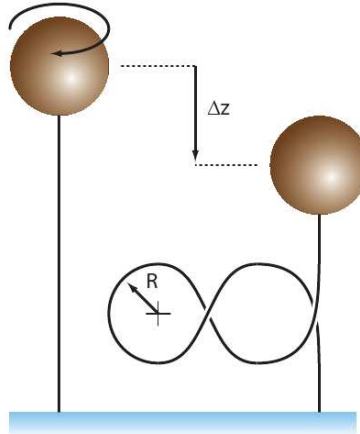


FIG. 4.2: La contrainte de torsion peut engendrer des boucles de plectonèmes qui emmagasinent de l'énergie sous forme de contrainte de flexion et engendrent également un raccourcissement apparent de la molécule.

Pour des forces de l'ordre de 0.1 pN, la contrainte critique $|\sigma_T^*|$ est de l'ordre de 10^{-2} , ce qui est relativement petit. Pour une molécule d'un micron de longueur de contour, cela correspond à imposer environ 3 tours pour obtenir la première boucle de plectonème.

$$|\sigma_T^*| = \frac{p}{2\pi} \sqrt{\frac{GF}{k_B T C_B^2}} \quad (4.9)$$

L'extension de l'ADN en fonction de la torsion peut être calculée dans ce modèle et on obtient

$$\begin{cases} |\sigma| < |\sigma_T^*| & : \quad \frac{z}{L_0} = \frac{Fp^2}{8\pi^2 k_B T B_B} - \frac{D_B}{B_B} \sigma \\ |\sigma| > |\sigma_T^*| & : \quad \frac{z}{L_0} = \frac{Fp^2}{8\pi^2 k_B T B_T} - \frac{2\pi}{p} \sqrt{\frac{k_B T G}{F}} (\sigma - \sigma_T^*) \end{cases} \quad (4.10)$$

La transition $B \rightarrow T$ se manifeste simplement par un décrochement de pente à $\sigma = \sigma_T^*$ passant d'une extension constante à une extension décroissant linéairement avec σ de pente de l'ordre de 40-60 nm/tour. Cette pente décroît avec la force. C'est ce que nous appelons une «courbe en chapeau».

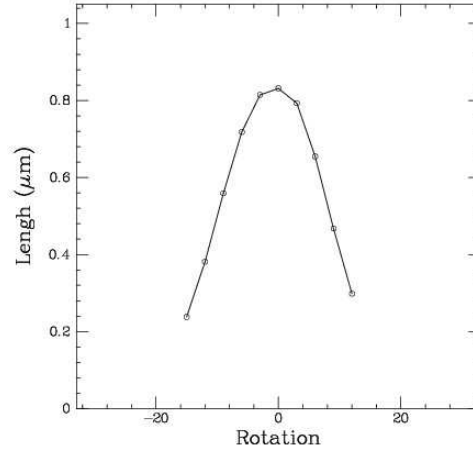


FIG. 4.3: Courbe extension-torsion expérimentale, correspondant à la formation de plectonèmes dans un ADN de longueur de contour $L = 1.2 \mu\text{m}$.

Caractère particulier de l'ADN

Il n'a jusqu'à présent pas été tenu compte du caractère chiral de l'ADN. L'hélicité naturelle *droite* de la molécule impose que le comportement sous contrainte de torsion $\sigma < 0$ (c'est à dire contre l'hélicité) n'est pas simplement symétrique au comportement sous torsion $\sigma > 0$ (c'est à dire dans le même sens que l'hélicité).

Sous contrainte de torsion $\sigma < 0$, le déroulement de l'hélice déstabilise l'appariement des bases, ce qui peut produire localement une *bulle de dénaturation*. Cette opération a un coût énergétique correspondant à la rupture des liaisons faibles entre les bases.

Une transition de phase a ainsi lieu pour

$$\sigma_D^* = -\frac{\eta D p}{8\pi^2 k_B T C_B} \quad (4.11)$$

Expérimentalement, σ_D^* est de l'ordre de -3%. Pour une molécule d'un micron de longueur de contour, cela correspond à imposer environ -9 tours pour ouvrir une boucle de dénaturation. Pour $\sigma > 0$, la dénaturation n'est jamais possible et on observe donc toujours la formation de plectonèmes.

L'extension de l'ADN en fonction de la torsion dans la phase dénaturée s'exprime pour $\sigma < \sigma_D^*$ comme

$$\frac{z}{L_0} = \frac{F p^2}{8\pi^2 k_B T} \left[\left(\frac{1}{B_D} - \frac{1}{B_B} \right) (\sigma - \sigma_D^*) + \frac{1}{B_B} \right] \quad (4.12)$$

En pratique, la variation est très faible et l'extension de la phase dénaturée est pratiquement constante.

Dénaturation ou plectonèmes ?

A torsion négative, deux transitions possibles existent. Le calcul détaillé montre que les phases dénaturée et plectonémique ne coexistent jamais. Il existe une force critique

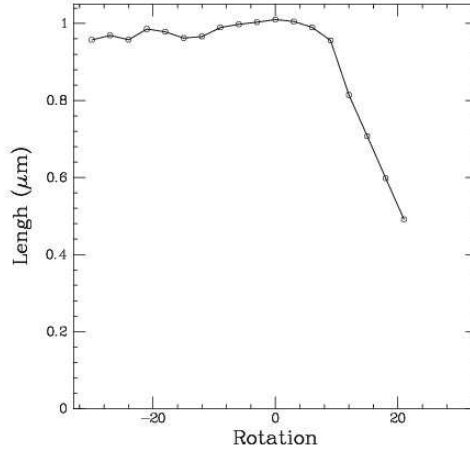


FIG. 4.4: Courbe extension-torsion expérimentale, correspondant à la formation de bulles de dénaturation dans un ADN de longueur de contour $L = 1.2 \mu\text{m}$.

au-dessus de laquelle les plectonèmes sont convertis en bulles de dénaturation

$$F_D^* = \frac{\eta_D^2}{16\pi^2 k_B T G} \quad (4.13)$$

La force critique de dénaturation est de l'ordre de 0.4 pN. On peut ainsi construire un diagramme de phases de l'ADN dans la limite des conditions dans lesquelles nous travaillons (*cf.* Fig 4.5 p. 80).

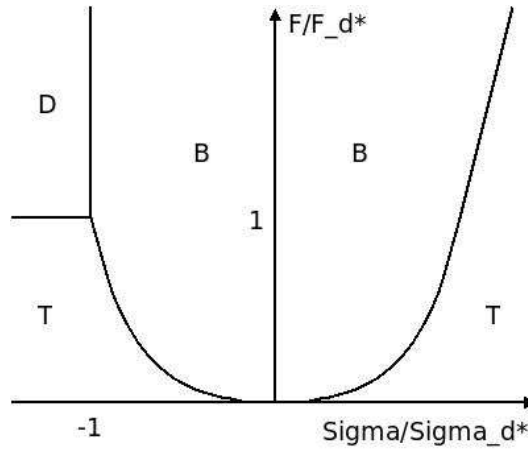


FIG. 4.5: Diagramme de phase de l'ADN au voisinage de la transition de dénaturation. En coordonnées réduites, l'équation de la transition de flambage est simplement $\sigma_T^*/\sigma_D^* = \sqrt{F/F_D^*}$. La phase **B** désigne l'ADN linéaire sous sa forme la plus stable à force nulle, la phase **T** les tresses de plectonèmes et la phase **D** les bulles de dénaturation.

4.3 Application aux expériences en molécule unique

La connaissance des propriétés physique de l'ADN est fondamentale pour les expériences en molécule unique. Les nombreuses protéines interagissant avec l'ADN modifient localement ses propriétés en introduisant de la flexion (Dong 2007) de la torsion

(Koster 2005), de la dénaturation (Revyakin 2004) ou de la traction (Luger 1997). Grâce aux équations dérivées plus haut, la mesure de l'extension *globale* de l'ADN sous ces différentes contraintes nous permet de remonter aux modifications *locales* et donc indirectement d'éclairer le mécanisme d'action de ces protéines.

Le détail de la mesure de l'extension de l'ADN a été traité p.66. Nous allons simplement traiter l'effet de la torsion sur l'extension.

Dans des conditions telles que l'ADN se trouve dans la phase **T** (*cf.* Fig 4.5 p. 80), l'imposition par une protéine d'un tour de rotation a pour effet une variation d'extension de l'ADN (avec les notations de la table 4.2)

$$\frac{\partial z}{\partial n_{rot}} = \frac{Fp^3}{8\pi^2 k_B T} \left(\frac{1}{B_D} - \frac{1}{B_B} \right) \sim 60 \text{ nm/tour} \quad (4.14)$$

En revanche, dans des conditions telles que l'ADN se trouve dans la phase **B**, on a

$$\frac{\partial z}{\partial n_{rot}} = -\frac{D_B p}{B_B} \sim 0.4 \text{ nm/tour} \quad (4.15)$$

Par ailleurs, le déplacement simple d'une protéine le long du sillon de l'ADN, correspond à un déplacement de la valeur du pas hélical, soit

$$\frac{\partial z}{\partial n_{rot}} = p = 3.6 \text{ nm/tour} \quad (4.16)$$

Par conséquent, la phase **T** permet, lorsqu'un couplage entre la translation et la rotation de la protéine est possible, d'obtenir un *coefficient démultiplieur* de l'ordre de $60/3.6 \approx 17$ entre le déplacement de la protéine et le changement d'extension de l'ADN. De plus, c'est un très bon outil de mesure de la torsion (positive ou négative) introduite par la protéine lors de son action. Nous avons utilisé cet effet autant qu'il était possible, en particulier dans l'étude de l'ARN polymérase.

Troisième partie

Expériences

5 Caractéristiques expérimentales du montage

Introduction

Ce chapitre présente les principales expériences que nous avons réalisées pour mesurer les caractéristiques du montage. Nous montrons au fur et à mesure de la présentation de ces résultats, qu'ils font apparaître des contraintes sur la manière dont les expériences de molécule unique peuvent et doivent être envisagées.

Nous évaluons également le montage combiné pinces magnétiques / microscope de fluorescence, en comparaison avec les montages «seuls» qui sont décrits actuellement dans la littérature.

Nous présentons enfin des applications directes du montage, dans la perspective de les appliquer ultérieurement à des expériences de molécule unique.

5.1 Calibrations et mesures

5.1.1 Rendement de transmission des optiques

A titre indicatif, le rendement maximal mesuré de transmission des optiques est consigné dans le tableau 5.1 (p. 85). Le rendement théorique de transmission (à partir des spectres des filtres) est indiqué dans le tableau 5.2 (p.85).

LASER λ (nm)	Ar+	Diode	He-Ne
Sortie LASER (mW)	14.5	48	17.1
LASER \rightarrow acousto (%)	43	67	80
Acousto (%)	85	75	85
Acousto \rightarrow fibre (%)	91	83	94
Fibre (%)	17	9.5	13
Fibre \rightarrow objectif ¹ (%)	88	88	86
Objectif (transmission) ² (%)	71	73	79
Global (entrée objectif) (%)	4.8	2.7	5.6

TAB. 5.1: Rendement maximal mesuré de transmission des optiques.

Source λ_{em} (nm)	Fluoresceine 515	Cy3 566	Cy5 667	QD 655	Diode 850
Coupe-bande (488, 633 nm) (%)	78%	92%	74%	77%	96%
Passe-haut (750 nm) (%)	<1%	<1%	<1%	<1%	>98%
Emission (510/20 nm) (%)	>98%	<1%	<1%	<1%	<1%
Emission (685/70 nm) (%)	<1%	<1%	>98%	>98%	<1%

TAB. 5.2: Rendement théorique de transmission des optiques pour quelques sources.

Une caractéristique générale des expériences de fluorescence, particulièrement en molécules uniques, est que nous devons collecter un grand nombre de photons à chaque pas de temps, et avec une bande passante la plus élevée possible (idéalement plusieurs dizaines de Hz). Nous avons fait le choix d'utiliser une fibre optique pour obtenir un faisceau d'excitation le plus propre possible, et également pour pouvoir découpler mécaniquement les LASER de la table d'observation. Le faible rendement de transmission du faisceau d'excitation depuis les LASER jusqu'à l'échantillon qui en découle montre qu'il est nécessaire d'avoir des sources relativement puissantes et une conception rigoureuse du système optique, chaque élément additionnel diminuant d'environ 10-15% la quantité de photons.

5.1.2 Excitation TIRF

Au fur et à mesure que le faisceau d'excitation est décalé parallèlement à l'axe optique de l'objectif de microscope, l'angle de sortie dans l'échantillon augmente jusqu'à atteindre $\pi/2$. La profondeur de solution excitée par le faisceau varie de $+\infty$ (à décalage nul en excitation à directe) à environ $\lambda/5$ en TIRF.

A grand angle d'incidence, bien que l'onde soit transmise et non réfléchi, la profondeur de solution excitée est toutefois relativement faible. Nous avons exploité cette propriété dans des conditions similaires à celles de la technique HILO (Tokunaga 2008) (données non présentées).

La figure 5.1 p.87 présente deux d'images enregistrées par le détecteur de fluorescence d'un échantillon contenant des *Quantum Dots* (émettant à 655 nm, à une concentration de ca. $1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Très peu se sont immobilisés à la surface par interaction non spécifique et la majorité est restée libre dans la solution. Par ailleurs, des billes magnétiques légèrement autofluorescentes sont également présentes, certaines attachées à la surface par un ADN d'environ $2 \mu\text{m}$ et d'autres immobilisées à la surface par interaction non spécifique.

Dans ces images, un certain nombre de composants apparaissent : *Quantum Dots* immobilisés ou s'approchant transitoirement de la surface, billes immobilisées, et enfin billes attachées par l'intermédiaire d'un ADN. Cette série montre qu'en configuration TIRF (ou HILO), nous pouvons sélectivement observer les fluorophores présents au voisinage de la surface. Des fluorophores situés plus loin sur un ADN ou sur une bille magnétique ne sont visible que lorsqu'ils se sont suffisamment approchés de la surface par une excursion transitoire : diffusion et interaction non-spécifique mais surtout formation d'une boucle dans l'ADN, déplacement d'une protéine marquée, *etc.*

La contrepartie à ce rapport signal-sur-bruit élevé est donc la nécessité, dans les expériences en molécule unique, de pouvoir localiser la protéine d'intérêt sur un site bien précis, à proximité de la surface de l'échantillon.

5.1.3 Calibration du grandissement du montage

Pour la mesure de la force subie par les billes magnétiques, nous avons rappelé que la connaissance du spectre des fluctuations transverses des billes est nécessaire, et par conséquent la connaissance du grandissement exact (sur le détecteur des pinces magnétiques) est importante.

Pour cela, une grille de calibration constituée d'un réseau de lignes gravées dans une lame de microscope (ici de période $10 \mu\text{m}$) est déposée à la place d'un échantillon (*cf.* Fig.5.2 p.87). L'image obtenue est analysée pour en déterminer la périodicité en unités de caméra. Sur l'exemple donné, la périodicité est de $0,074 \mu\text{m}/\text{pix}$. La taille d'un pixel étant dans ce cas de $7,40 \mu\text{m}$, cela correspond à un facteur de grandissement exactement de $100\times$.

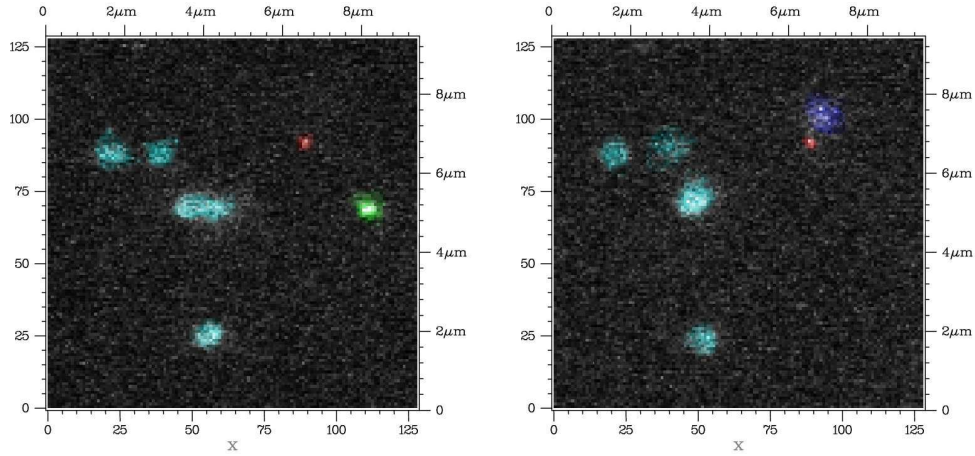


FIG. 5.1: Deux champs de vue d'une même région de la surface. Dans les deux cas, l'éclairage est en ondes évanescentes ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{obs} \in [650; 720] \text{ nm}$, $T=30 \text{ ms}$) ; les couleurs sont artificielles. Les billes magnétiques fixes sont figurées en bleu pâle. Celles attachées à un ADN en bleu foncé. Les *Quantum Dots* fixes sont en rouge et ceux mobiles sont en vert. [G] Image enregistrée en présence d'une force magnétique : en plus des billes magnétiques et du *Quantum Dot* collés non-spécifiquement à la surface, un *Quantum Dot* vient transitoirement s'approcher suffisamment dans l'onde évanescente pour être fluorescent. [D] Image enregistrée à très faible force magnétique environ 2 s plus tard : le *Quantum Dot* transitoirement fluorescent a diffusé hors de l'onde évanescente. La bille attaché à l'ADN, non visible précédemment, est tombée par gravité sur la surface et peut être observée. Contrairement aux billes accrochées non-spécifiquement, elle présente un mouvement brownien important.

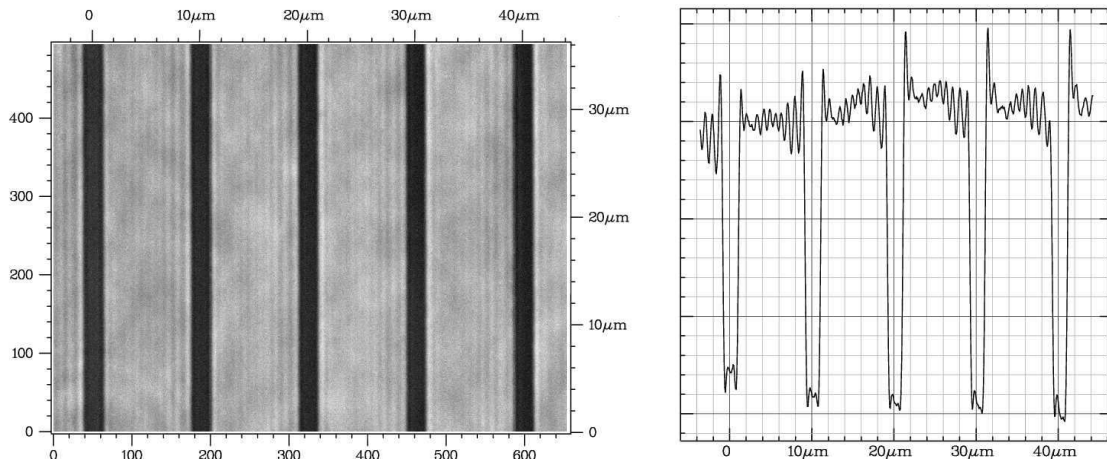


FIG. 5.2: Calibration du grandissement en utilisant une grille de pas connu ($10 \mu\text{m}$). [G] Image de la grille de calibration. [D] Graphe de l'intensité lumineuse moyennée sur l'ensemble des lignes. La périodicité mesurée ici est de $0,074 \mu\text{m}/\text{pix}$.

Nous avons répété à intervalles réguliers cette calibration pour vérifier qu'elle était la plus précise possible. Nous l'avons également effectuée sur la caméra de fluorescence (données non présentées) en utilisant le fait que quelques photons issus de la source du montage de pinces magnétiques pouvaient fuir dans le circuit optique de détection de la fluorescence. Dans ce cas, la calibration nous a permis de convertir en unités physiques

la position des fluorophores exprimée en pixels.

5.1.4 Stabilité mécanique (pincés magnétiques)

La position relative de l'échantillon et du plan focal de l'objectif fluctuent constamment, en raison de dérives thermiques différentielles dans la mécanique du montage, de contraintes de pression exercées par le fluide sur la lamelle en verre légèrement flexible, de vibrations du bâti, *etc.* Pour pouvoir mesurer les faibles déplacements liés à une activité biologique, nous devons pouvoir évaluer et éventuellement supprimer ces fluctuations.

La stabilité mécanique du montage est évaluée par le suivi en z de la position d'une bille magnétique attachée non spécifiquement à la surface de l'échantillon. De cette façon, les fluctuations de sa position seront uniquement liées au montage. La position z est mesurée par les méthodes précédemment décrites.

Un exemple de ces dérives est donné dans le graphe de la figure 5.3 p.88. La vitesse instantanée à temps court (quelques minutes) de ces excursions est de l'ordre de $0.3nm \cdot s^{-1}$.

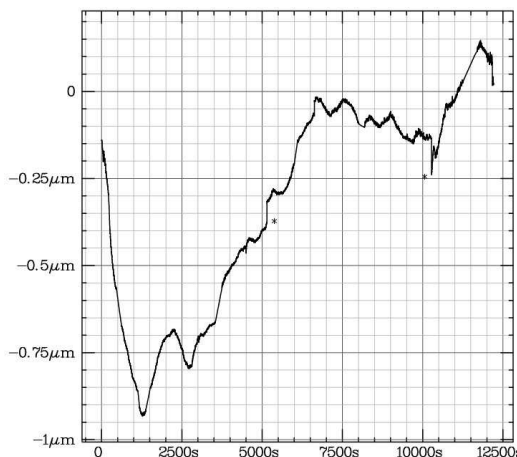


FIG. 5.3: Evolution de la position mesurée d'une bille magnétique fixe dans le référentiel de l'échantillon, par rapport à la position du plan focal de l'objectif. Les deux astérisques (*) signalent des décrochements sans rapport avec les fluctuations naturelles du montage.

La stabilité est étudiée plus quantitativement dans l'espace réciproque, en traçant le spectre de puissance des fluctuations de position (*cf.* Fig 5.4 p. 89). A basse fréquence, la densité de bruit suit une loi en $1/f$ avant de saturer à sa valeur minimale au-delà d'une certaine fréquence de coupure. La comparaison des spectres avec un microscope à compensation de température montre que, dans les conditions où nous avons réalisé les expériences de molécule unique, les performances du microscope sont presque optimales.

Du point de vue de la précision de mesure en z , nous disposons donc d'un montage compatible avec les expériences en molécule unique que nous voulons réaliser. De plus, il se compare favorablement à l'état de l'art actuel sur les appareils de pincés magnétiques seules.

5.1.5 Stabilité mécanique (fluorescence)

Les écarts de position entre le plan focal de l'objectif et la position du fluorophore se traduisent par un étalement de l'image du fluorophore sur le détecteur et une diminution de l'intensité du signal de fluorescence collecté par l'objectif de microscope. Ces effets

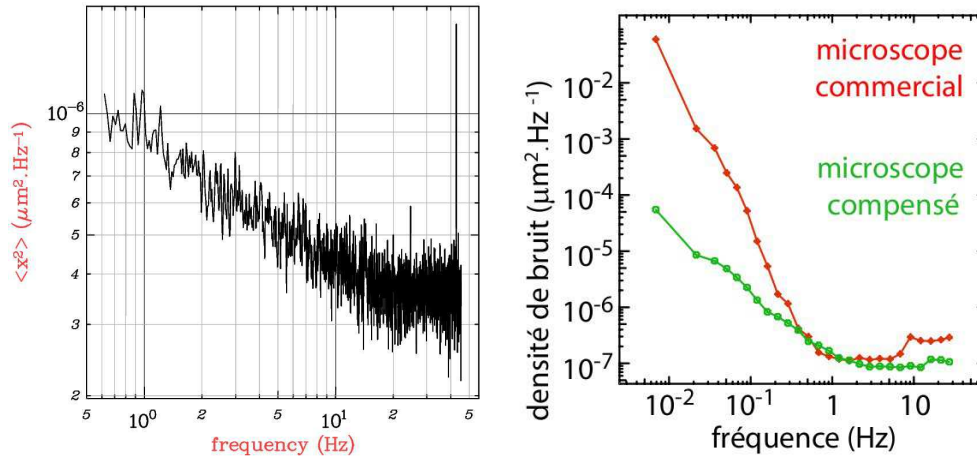


FIG. 5.4: Spectre de puissance des fluctuations de la position mesurée d'une bille magnétique fixe dans le référentiel de l'échantillon, par rapport à la position du plan focal de l'objectif. [G] Les données utilisées sont celles représentées dans la Fig.5.3. La densité de bruit limite est de $3 \cdot 10^{-7} \mu\text{m}^2/\text{Hz}$ et la fréquence de coupure 12Hz . La fréquence d'acquisition est de 90Hz . [D] Les données utilisées ont été mesurées sur un microscope à compensation de température. La densité de bruit limite est de l'ordre de $10^{-7} \mu\text{m}^2/\text{Hz}$ et la fréquence de coupure de 1Hz . Cette dernière donnée est reproduite de (Lionnet 2006a).

doivent être maîtrisés et au moins quantifiés. Le premier, en étalant exagérément la tache de diffraction, diminue le rapport signal-sur-bruit du suivi donc la précision de pointé du fluorophore. La contribution du second à la variation de la fluorescence totale observée lors du déplacement en z d'un fluorophore (aux temps courts) s'ajoute à la variation «naturelle» de l'intensité d'excitation dans l'onde évanescente (aux temps longs) et doit donc être prise en compte.

Nous évaluons l'effet de ces fluctuations mécaniques en observant la fluorescence d'un *Quantum Dot* fixé à la surface de l'échantillon, en fonction de la position du plan focal de l'objectif de microscope. Cette dernière est modulée périodiquement et le signal de fluorescence obtenu en fonction de la position du plan focal est ainsi superposé période après période. Le graphe position-fluorescence obtenu est représenté Fig.5.5 p.90.

L'intensité de fluorescence est maximale à la coïncidence $\delta = 0$ du fluorophore et du plan focal de l'objectif. L'intensité (pour $z > 0$) décroît ensuite sensiblement linéairement ; la distance $\delta_{1/2}$ où la fluorescence totale est divisée par deux par rapport à son maximum est de l'ordre de 500 nm . Pour $\delta < 0$, le phénomène est différent puisque le plan focal de l'objectif est dans un milieu d'indice différent de celui du fluorophore. Comme le plan focal sera toujours placé au niveau de la surface de l'échantillon et les fluorophores seront présents sur celle-ci ou dans la solution, le cas $\delta < 0$ ne se présente jamais dans les expériences décrites dans ce manuscrit, hors cas de dérives à long terme. Dans ce dernier cas, le suivi de position en pinces magnétiques sera également défaillant et les données ne seront pas utilisées.

5.1.6 Correction des dérives (fluorescence)

L'intensité de fluorescence est donc potentiellement couplée à des dérives mécaniques ; dans le temps de l'acquisition de données, il est souhaitable que la distance entre le fluorophore observé et le plan focal ne dérive pas plus de $\delta_{1/2}/4 \equiv 125 \text{ nm}$. D'une part cela n'est pas toujours le cas sur des acquisitions longues, et d'autre part même une

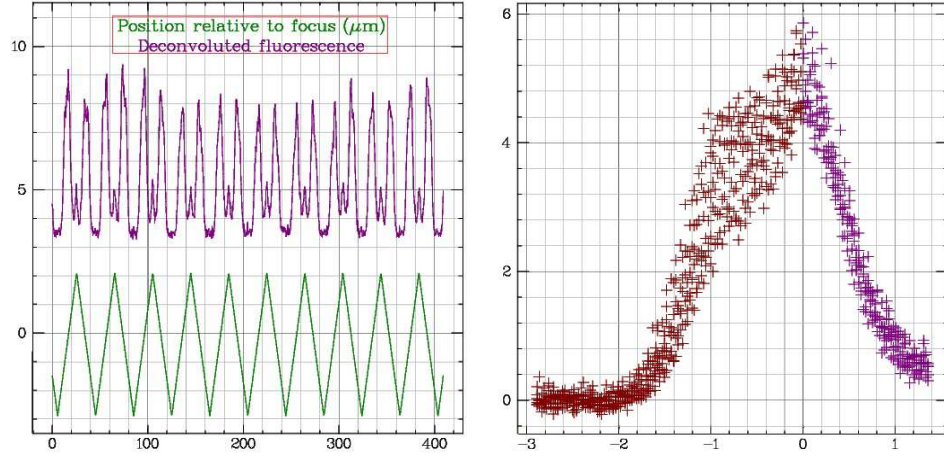


FIG. 5.5: [G] Variations comparées de la modulation de position du plan focal (μm) et de l'intensité de fluorescence (unités arbitraires) à 655 nm d'un *Quantum Dot* excité en ondes évanescentes à 488 nm au cours du temps (fréquence de modulation 2 Hz). [D] Graphe de la fluorescence moyenne (unités arbitraires) en fonction de la distance (μm) du *Quantum Dot* au plan focal de l'objectif de microscope. Nous mesurons $\delta_{1/2} \approx 500 \text{ nm}$.

dérive de l'ordre de $\delta_{1/2}/4$ entraîne une variation de l'intensité de fluorescence de l'ordre de 10% (cf. Fig.5.5 p.90).

Dans certaines expériences, cette variation de fluorescence $f(\delta)$ pourrait être interprétée comme une variation de position verticale du fluorophore dans l'onde évanescente (sous l'effet par exemple de la translocation d'une protéine). Il est donc important de pouvoir corriger cet effet, en disposant d'une «chandelle» de référence dont l'intensité moyenne ne dépend pas du temps mais uniquement de sa distance par rapport au plan focal. Un *Quantum Dot* fixé à la surface de l'échantillon est une telle chandelle, ce qui explique l'utilité du graphe établi à la figure 5.5.

En effet, en notant $z = 0$ la position de la surface, z la distance du fluorophore à la surface et δ la distance du plan focal à la surface, on a les intensités I_c et I respectives de fluorescence de la chandelle et du fluorophore (Λ est la longueur de pénétration de l'onde évanescente)

$$I_c(t) = I_0 \cdot f\left(\frac{\delta(t)}{\delta_{1/2}}\right) \quad (5.1)$$

$$I(t) = I_0 \cdot f\left(\frac{\delta(t) - z(t)}{\delta_{1/2}}\right) \cdot e^{-z(t)/\Lambda} \quad (5.2)$$

Dans la limite $z \ll \delta$, par exemple lorsque les fluorophores observés sont peu mobiles, il suffit de renormaliser $I(t)$ en le divisant par $I_c(t)$ (cf. Fig 5.6 p. 91).

Même dans le cas de variations importantes de l'intensité d'excitation, nous pouvons efficacement les corriger en utilisant un fluorophore de référence. Cette situation est facile à réaliser expérimentalement ; nous pouvons continuer dans ce cas à observer des événements de fluorescence avec une bande passante raisonnable (le clignotement d'un *Quantum Dot* dans l'exemple présenté).

5.1.7 Mesure de z (fluorescence)

Une fois ces dérives corrigées, l'intérêt principal de ce microscope de fluorescence est de pouvoir mesurer la position z du fluorophore, qui représente celle de la protéine étudiée.

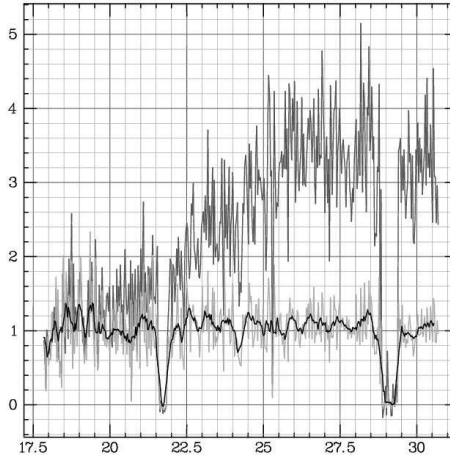


FIG. 5.6: Déconvolution de l'intensité de fluorescence au cours du temps (en s) d'un *Quantum Dot* au voisinage $z = 0$ de la surface par l'intensité de fluorescence d'une chandelle fixe (un *Quantum Dot* identique). Une variation de l'intensité du LASER a été imposée artificiellement. Données non corrigées en gris foncé, corrigées en gris clair et filtrées à 100 ms en noir. $T = 5$ ms, $\lambda_{exc} = 488$ nm, $\lambda_{em} = 655$ nm.

En utilisant les calibrations que nous avons effectuées précédemment, nous montrons que nous pouvons déduire cette position de l'intensité I de fluorescence.

Dans le cas de variations de z de l'ordre de fractions de $\delta_{1/2} = 500$ nm, puisque l'intensité de fluorescence décroît de manière linéaire avec la distance δ du fluorophore au plan focal, on a la forme

$$f\left(\frac{\delta}{\delta_{1/2}}\right) = 1 - \frac{\delta}{2\delta_{1/2}} \quad (5.3)$$

Les quantités I_0 et $\delta_{1/2}$ peuvent être calibrées sur la chandelle de référence juste avant l'expérience et on vérifie donc

$$I(t) = \left(I_c(t) + \frac{I_0\Lambda}{2\delta_{1/2}} \cdot \frac{z}{\Lambda} \right) e^{-z(t)/\Lambda} \quad (5.4)$$

Au premier ordre en z/Λ , on note $I_c^o = I_c(2\delta_{1/2} - \Lambda) = \frac{I_0\Lambda}{2\delta_{1/2}}$ et nous mesurons alors z en calculant la quantité

$$z = \Lambda \frac{I_c(t) - I(t)}{I_c(t) - I_c^o} \quad (5.5)$$

La figure 5.7 p.92 présente la position d'un objet fluorescent (une bille magnétique) à proximité de la surface, déduite de la variation d'intensité de fluorescence en utilisant l'équation 5.5. Une solution numérique pour $z/\Lambda \ll 1$ peut être calculée très facilement à partir de la formule exacte 5.4.

Notre montage permet donc de mesurer la position d'un objet fluorescent par rapport à la surface, et ce même en présence de dérives éventuelles de puissance du faisceau d'excitation. En revanche, dans la configuration actuelle, la dynamique utile est réduite par rapport aux possibilités de l'appareil (200 - 300 Hz) à une bande passante d'environ 40 Hz. Par ailleurs, pour pouvoir mesurer une position absolue (et pas seulement des déplacements relatifs), il est nécessaire de mesurer l'intensité relative du fluorophore d'intérêt et de la chandelle. Cela ne pose pas de problème tant que le fluorophore réside suffisamment longtemps (environ 50 - 100 ms) au voisinage immédiat de la surface, ou

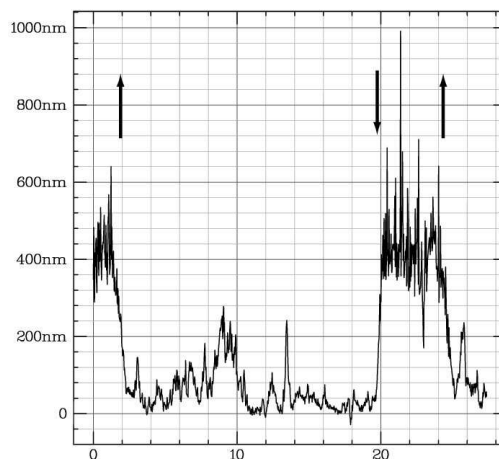


FIG. 5.7: Déconvolution de l'intensité de fluorescence au cours du temps d'une bille magnétique attachée à un ADN long ($\gg \Lambda$) au voisinage $z = 0$ de la surface par l'intensité de fluorescence d'une chandelle fixe (une bille identique). Les flèches indiquent le mouvement des aimants au-dessus de l'échantillon. Le graphe présente la distance de la bille mobile à la surface (en nm) en fonction du temps (en s). En présence d'une force magnétique (aimants abaissés), la bille est éloignée de la surface. En l'absence de force magnétique (aimants relevés), la bille tombe par gravité et fluctue près de la surface. $T = 26,7$ ms, $\lambda_{exc} = 488$ nm, observation dans la fenêtre 685 ± 35 nm. La déconvolution est opérée en utilisant la formule 5.4 dans les conditions $\delta \ll z$.

que nous pouvons faire une hypothèse (par exemple qu'il est identique à la chandelle), mais pourrait être délicat dans le cas de comportements rapides, comme ceux associés à une activité biologique.

5.1.8 Bruit de mesure de z (pinces magnétiques)

Après avoir montré que les dérives mécaniques du montage sont faibles en regard des expériences que nous avons menées, nous devons estimer la précision avec laquelle nous mesurons la position de la bille magnétique, donc indirectement de la protéine d'intérêt.

La mesure de position $z(t) - \delta(t)$ pour les billes magnétiques est assurée par la technique standard de déconvolution de l'image des anneaux de diffraction (Strick 1999; Gosse 2002; Lionnet 2006a) présentée très rapidement Fig.5.8 p.93.

Indépendamment des dérives $\delta(t)$ déterminées précédemment, la granularité de l'image de calibration, des imperfections optiques, du bruit à haute fréquence, *etc.* contribuent à donner une largeur finie à la distribution des $z(t)$ d'une bille fixe. En mesurant la position de deux billes fixées à la surface de l'échantillon, nous pouvons soustraire les dérives mécaniques du montage.

Puisque par construction ces deux billes sont situées exactement à la même valeur de z , le suivi différentiel de leur position nous permet de mesurer le bruit sur la mesure de z (*cf.* Fig 5.9 p. 93).

L'ajustement paramétrique des valeurs conduit à un écart-type en mesure différentielle de l'ordre de 6 nm. Dans les systèmes de pinces magnétiques pures les plus récemment développés au laboratoire, cet écart-type peut atteindre une valeur aussi faible que 1-2 nm. Ce bruit, bien que s'approchant de l'état de l'art actuel, reste relativement élevé pour certaines applications, en particulier l'étude des polymérases où ces 6 nm correspondent à environ 20bp, ou bien une rotation d'environ 40° pour former des plectonèmes dans

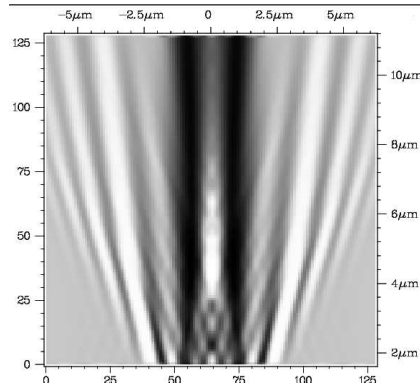


FIG. 5.8: Coupe radiale des anneaux de diffraction d'une bille magnétique *MyOne* (abscisse) présentée en fonction de la distance entre le centre de la bille et le plan focal de l'objectif de microscope (ordonnée).

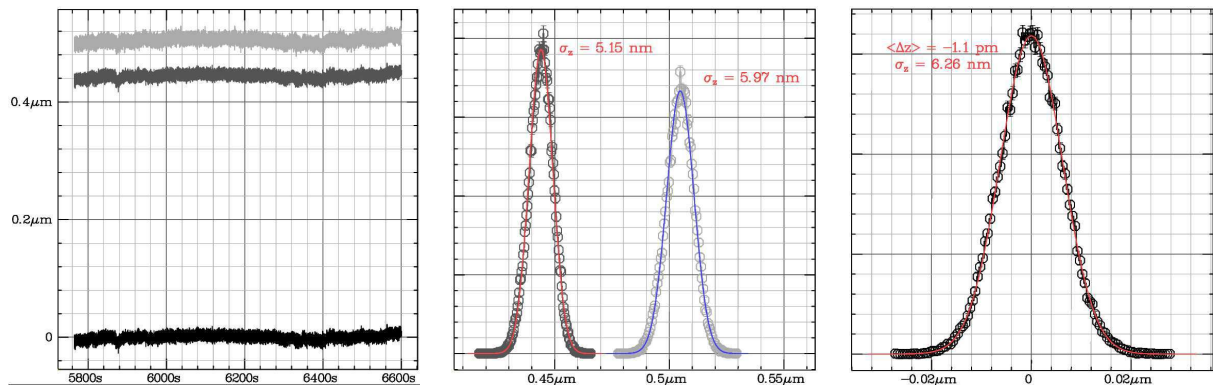


FIG. 5.9: [G] Suivi différentiel de position de deux billes fixées à la surface de l'échantillon au cours du temps, fréquence d'acquisition : 90 Hz. [C] Histogramme des valeurs brutes relevées et ajustement paramétrique. [D] Histogramme des valeurs différentielles relevées et ajustement paramétrique.

une molécule d'ADN surenroulable.

5.1.9 Bruit de mesure en (x, y) (pincés magnétiques)

Bien qu'il ne représente pas une donnée importante pour nos expériences, nous avons également évalué le bruit de mesure en (x, y) de la position de la bille magnétique. Cette position est mesurée en maximisant la fonction de corrélation croisée des profils de diffraction des billes. Pour les mêmes types de raisons que précédemment, cette mesure est entachée d'un bruit. Celui-ci est déterminé en étudiant la distribution de position d'une bille fixée à la surface de l'échantillon (*cf.* Fig.5.10 p.94).

L'ajustement paramétrique des valeurs conduit à un écart-type de l'ordre de 15-25 nm. Dans les systèmes de pincés magnétiques purs les plus récemment développés au laboratoire, cet écart-type peut atteindre une valeur aussi faible que 2-5 nm.

5.1.10 Précision de pointé en (x, y) (fluorescence)

Contrairement à celle de la bille magnétique, la mesure de la position (x, y) du fluorophore est très importante pour les expériences en molécule unique. L'activité de la

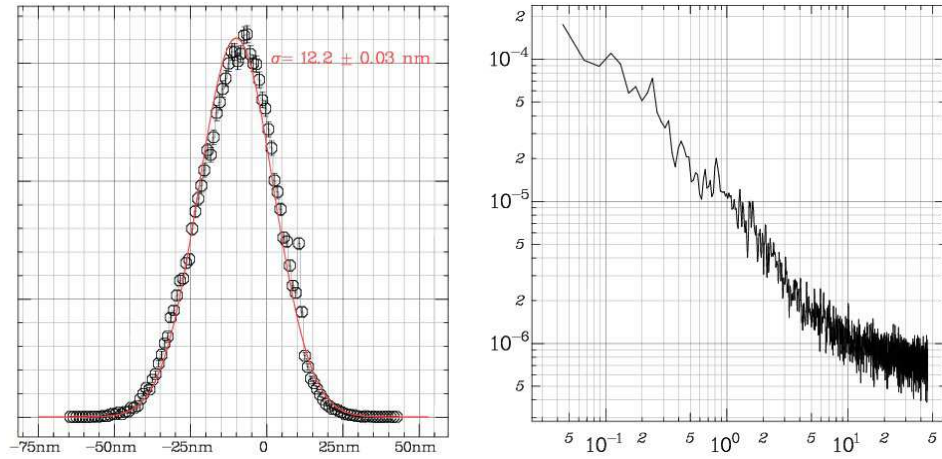


FIG. 5.10: [G] Histogramme des valeurs x (en nm) relevées au cours du temps et ajustement paramétrique. Nous mesurons $\sigma = 12 \text{ nm}$. [D] Spectre de densité d'énergie du bruit (en $\mu\text{m}^2/\text{Hz}$) en fonction de la fréquence (en Hz). Nous mesurons une densité de bruit limite de $0.7 \text{ nm}^2/\text{Hz}$ et une fréquence de coupure de 20 Hz .

protéine à laquelle il est fixé peut en effet entraîner un mouvement dans ces directions, par exemple si la protéine tourne autour de l'ADN. La mesure de position est également importante dans les expériences de localisation de l'activité ATPase dans FtsK. Nous évaluons ici la précision avec laquelle nous mesurons la position d'un fluorophore.

Détermination de la précision

La position instantanée d'un fluorophore dans le plan (x, y) est déterminée par celle du centroïde de son image sur le détecteur de fluorescence. Cette image résulte de la diffraction de la source ponctuelle par de multiples optiques de symétrie cylindrique, ce qui résulte en une convolution de multiples fonctions d'Airy. En première approximation, elle est bien approchée dans ce système par une fonction gaussienne de largeur de l'ordre de $\lambda \cdot f/a \approx 15 \mu\text{m}$. Les pixels de la matrice CCD du détecteur de fluorescence mesurant $16 \mu\text{m}$ de côté, l'image du fluorophore s'étale donc sur une zone d'environ 4-5 pixels de côté seulement, ce qui entraîne une forte granularité.

Par ailleurs, le nombre maximal de photons détectable pour un fluorophore unique (type Alexa) jusqu'à son photoblanchiment est de l'ordre de quelques milliers à dizaine de milliers (Yildiz 2005). Réparti sur des trames acquises à une fréquence relativement élevée (jusqu'à plus de 100 Hz), ce faible nombre de photons engendre un bruit relatif intrinsèque en $1/\sqrt{N}$ sur l'intensité mesurée en chaque point de l'image du fluorophore.

La combinaison de ces deux facteurs fait que l'image du fluorophore est bruitée et que la détermination de la position du centroïde est relativement difficile. Les résultats pour différents nombre de photons collectés sont indiqués Fig.5.11 p.95.

Nous estimons le bruit de cette détermination en mesurant les positions (x, y) d'un fluorophore fixe pendant un certain nombre de trames. Sur un *Quantum Dot* fixé à la surface, dont la brillance est de plus assez élevée, le bruit de mesure de pointé est ainsi obtenu à partir des données de la Fig.5.12 p.96 et est de l'ordre de 6 nm pour un temps d'acquisition de 30 ms .

Nous montrons ainsi que nous pouvons mesurer la position (x, y) d'un fluorophore brillant avec une précision très raisonnable à l'échelle moléculaire.

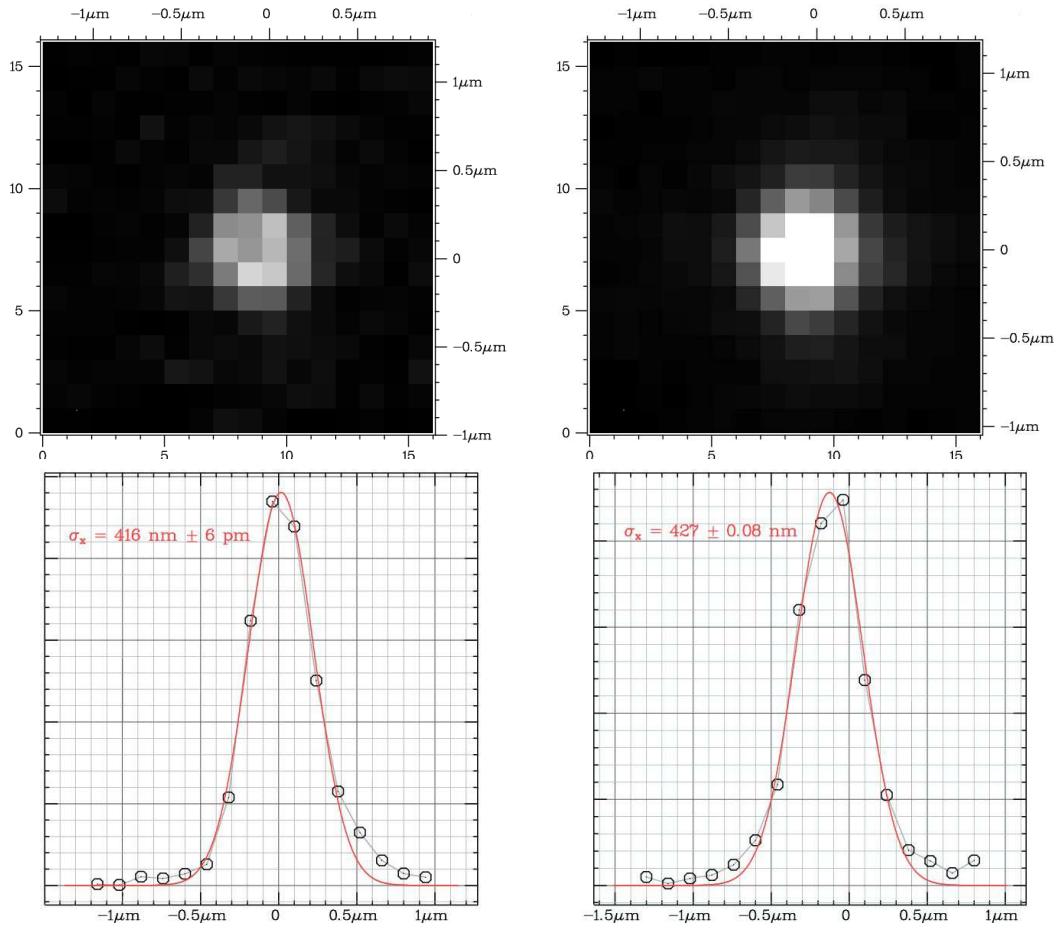


FIG. 5.11: [H] Image d'un *Quantum Dot* isolé fixé à la surface de l'échantillon ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 655 \text{ nm}$) pour des temps d'intégration de 2.5 ms (gauche) et 30 ms (droite). [B] Ajustement à une fonction gaussienne de $\sum_y S(x, y)$ pour des temps d'intégration de 2.5 ms (gauche) et 30 ms (droite). Nous mesurons une largeur de diffraction de l'ordre de 420 nm dans les deux cas.

Dépendance temporelle

D'après l'équation 2.37 p. 44, la précision de pointé dépend du nombre de photons collectés. Nous avons donc mesuré la dépendance de cette précision en fonction du temps d'intégration de la caméra, pour déterminer si les conditions dans lesquelles nous souhaitons nous placer (grande résolution temporelle, donc temps d'intégration faibles) sont compatibles avec un *tracking* correct.

Les données indiquent que la précision de pointé est presque constante et maximale (c'est à dire qu'elle est la moins précise) pour des temps d'intégration de 2,5 - 30 ms (*cf.* Fig 5.13 p. 96). Dans cette expérience, elle vaut environ 5.5 nm, légèrement meilleure que celle présentée au paragraphe précédent. Pour des temps d'intégration plus importants (400 ms), elle peut prendre des valeurs aussi faibles que 3 nm. En raison de la dépendance lente avec le nombre de photons, ce gain d'un facteur deux nécessite des temps d'intégration très grands, peu compatibles avec les expériences de suivi de molécules uniques que nous envisageons. Nous estimons donc que les temps d'intégration que nous utilisons, bien que non optimaux, possèdent un rapport précision/bande passante très bon.

5 Caractéristiques expérimentales du montage

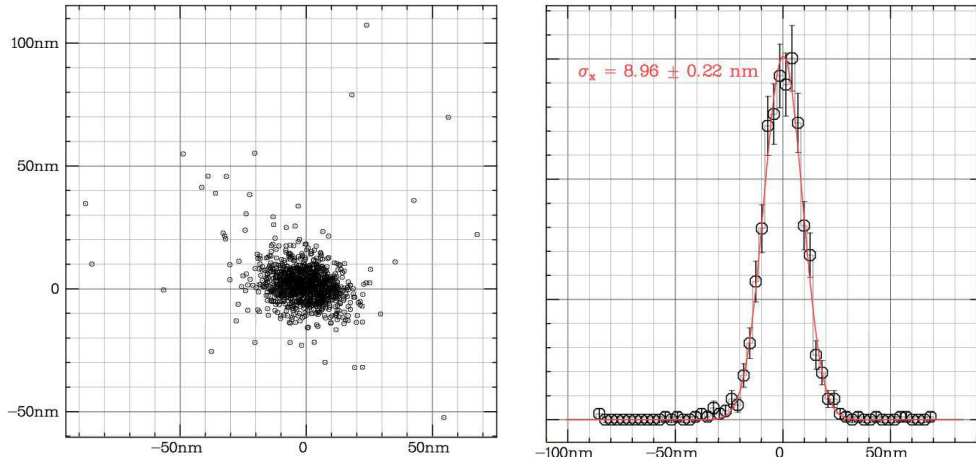


FIG. 5.12: [G] Position x et y au cours du temps du centre de masse des photons collectés pour un *Quantum Dot* isolé fixé à la surface de l'échantillon ($\lambda_{exc} = 488$ nm, $\lambda_{em} = 655$ nm) pour un temps d'intégration de 30 ms. $N = 1024$ images (30,8 s). [D] Histogramme des valeurs obtenues (position selon l'axe x) et ajustement paramétrique. Nous mesurons la position du *Quantum Dot* fixe avec un bruit de pointé de 9 nm.

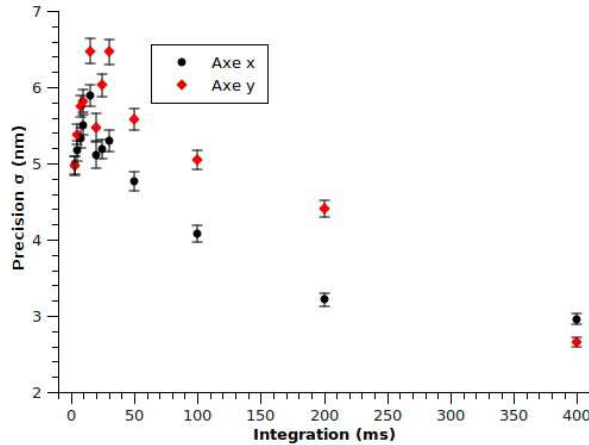


FIG. 5.13: Dépendance de la précision de pointé σ (en nm) en fonction du temps d'intégration (en ms). Les barres d'erreur indiquent la précision de l'ajustement paramétrique à l'histogramme de $\langle x \rangle$ et $\langle y \rangle$ respectivement. Les conditions sont identiques à celles du paragraphe précédent : *Quantum Dot*, $\lambda_{exc} = 488$ nm, $\lambda_{fl} = 655$ nm, $N = 1024$ images.

Mesure du flux de photons

Toujours d'après l'équation 2.37 p. 44, la quantité $(\xi/\sigma)^2$ est directement liée au nombre de photons collectés. Dans cette expérience, le rapport ξ/a vaut environ 7 (données non présentées) et les corrections non linéaires sont donc négligeables sauf à très bas nombre de photons.

Puisque nous pouvons mesurer simultanément σ et ξ pour chaque temps d'intégration, nous en déduisons le nombre apparent de photons collectés en fonction de ce temps (*cf.* Fig 5.14 p. 97).

Bien que les données diffèrent légèrement selon la direction considérée (sans doute en raison d'un défaut lors du réglage de la mise au point sur le fluorophore), nous montrons que le flux reçu est constant (dans la gamme 15 - 200 ms) et vaut $40 - 100$ kHz dans les

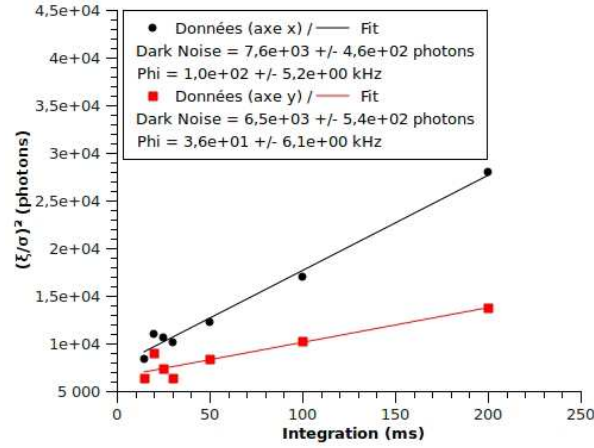


FIG. 5.14: Vérification de l'équation 2.37 p. 44 : le rapport $(\xi/\sigma)^2$ doit être égal au nombre de photons collectés, donc proportionnel au temps d'intégration. La quantité ξ est mesurée par analyse de l'image de fluorescence du fluorophore (*Quantum Dot*, $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{fl} = 655 \text{ nm}$, $N = 1024$ images). Pour des temps d'intégration compris entre 15 et 200 ms, la relation est bien linéaire et nous mesurons pour ce fluorophore un flux de photons $\Phi = 40 - 100 \text{ kHz}$.

conditions de l'expérience. Nous mesurons également un équivalent de *dark noise*, assez important puisque nous nous sommes placés ici avec une amplification importante.

Le système de détection nous permet donc finalement non seulement de déterminer la position (x, y, z) du fluorophore avec une bonne précision, mais également de déterminer le flux de photons de fluorescence émis ; cette capacité sera très utile en expériences de molécules uniques pour vérifier que le fluorophore observé (et donc la protéine à laquelle il est attaché) est bien unique.

5.1.11 Contrôle indépendant de la mesure de z (pincés magnétiques)

Pour une série de raisons (mauvaise configuration du cristal piézoélectrique qui déplace l'objectif de microscope, mauvais traitement de l'image de calibration des anneaux de diffraction, *etc.*), la mesure de z peut être faussée par un facteur proportionnel constant : $z \rightarrow \beta_1 \cdot z$. On note qu'un terme additif constant $z \rightarrow z + \beta_0$ n'a d'incidence sur aucune des mesures que nous effectuons, qui sont essentiellement des mesures de distance (différentielles) et non de position.

Un bruit de mesure anormal ou une longueur apparente suspecte pour des molécules d'ADN de taille connue peuvent laisser penser que $\beta_1 \neq 1$. Ces indices dépendent toutefois pour le premier de la mécanique entière de l'appareil et pour le second de la variabilité possible des réactions de biologie moléculaire lors de la préparation des ADN, ainsi que des interactions avec la surface. Ils ne permettent donc pas d'attribuer avec certitude le problème à la mesure de z . Nous avons été confrontés à ce problème au cours de ces travaux (données non présentées) et nous proposons une solution simple pour mesurer la valeur de β_1 .

Il existe théoriquement deux paramètres intrinsèques de l'ADN qui peuvent être mesurés par un ajustement : la longueur de persistance d'orientation ξ et le module élastique de courbure en flexion G . En suivant les résultats donnés en 4.1 p.75, la fonction $F(z/L_0)$ est universelle au facteur ξ près et par conséquent les erreurs proportionnelles sur la mesure de z et L_0 se compensent exactement.

En revanche comme décrit dans l'équation (16.20) p.289, la courbe extension-torsion à basse force de la phase plectonémique de l'ADN est une droite de pente $\partial z/\partial n_{rot} = 2\pi\sqrt{k_B T G/F}$. La valeur de G étant connue (de l'ordre de 25 nm) et la force facile à mesurer, la quantité $\sqrt{F/4\pi^2 k_B T G} \cdot \partial z/\partial n_{rot}$ est une mesure de β_1 .

Cette méthode nous a permis en l'occurrence de corriger une erreur logicielle de contrôle du déplacement du cristal piezoélectrique.

5.1.12 Propriétés du détecteur CCD

En analysant la statistique du signal d'une source monochromatique de luminosité constante, il est possible de mesurer certains paramètres du détecteur, en particulier le rendement ρ en photo-électrons. Cette donnée est très importante pour les mesures en molécules uniques, puisqu'elle permet de mesurer directement le nombre de photons reçus sur le détecteur pour chaque fluorophore. Cette donnée permet alors par exemple de discriminer un fluorophore unique d'un petit agrégat, ou de calculer la précision de pointé (x, y) .

Statistique de photons

Les détails du calcul classique sont rappelés en annexe p. 294. Le résultat principal est que, pour chaque pixel du détecteur éclairé par une source monochromatique non cohérente, la distribution du nombre S de photo-électrons au cours du temps vérifie

$$\frac{\sigma_S^2}{\langle S \rangle} = \frac{\rho}{2} \quad (5.6)$$

Par conséquent, il est très facile de mesurer le rendement en photo-électrons ρ du détecteur par cette méthode. Une fois cette calibration effectuée, le nombre de photons mesurés par chaque pixel pourra donc être directement mesuré. Nous avons effectué la mesure de σ_S en fonction de $\langle S \rangle$ pour la caméra de fluorescence (*cf.* Fig 5.15 p. 98).

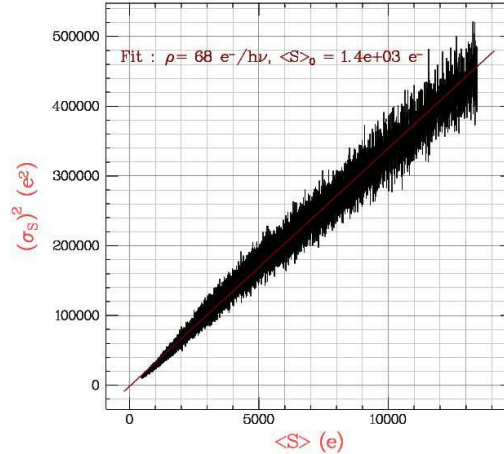


FIG. 5.15: Calibration directe du rendement de photo-électrons de la camera. La variance σ_S^2 du nombre de photo-électrons est proportionnelle à la valeur moyenne $\langle S \rangle$ du signal. Nous mesurons un rendement $\rho = 68 \pm 21$ et un bruit de fond d'environ 20 photons par pixel. $N = 512$ images, $T = 4.45$ ms, gain = 1000 sur une EM-CCD iXon (Andor, Ireland).

Méthode alternative

Nous avons montré dans le paragraphe 5.1.10 p. 96 que nous pouvons mesurer le nombre de photons reçus à partir de l'observation de la précision de pointé d'un fluorophore. Puisque nous pouvons par ailleurs directement mesurer l'intensité de fluorescence exprimée en photo-électrons, nous pouvons mesurer indirectement le rendement en photo-électrons de la caméra (cf. Fig 5.16 p. 99).

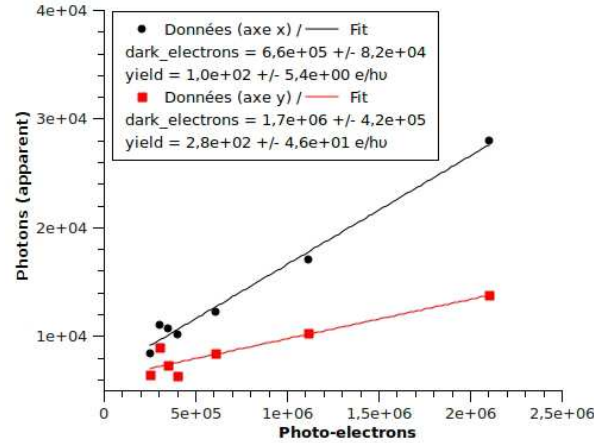


FIG. 5.16: Calibration indirecte du rendement de photo-électrons de la camera. Le nombre apparent de photons est calculé à partir de la précision de pointé d'un fluorophore (*Quantum Dot*, $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{fl} = 655 \text{ nm}$, $N = 1024$ images, gain = 1000 sur une EM-CCD iXon, Andor) pour différents temps d'intégration (15 - 200 ms, correspondant aux points expérimentaux de gauche à droite). Ces deux quantités sont proportionnelles et nous mesurons un rendement $\rho = 100 - 300 \text{ e}/h\nu$.

Dans les mêmes gammes de temps d'intégration (15 - 200 ms), ces deux quantités sont proportionnelles. Pour un gain maximal ($G = 1000$ en unités du constructeur), le rendement de photo-électrons mesuré vaut $\rho = 100 - 300 \text{ e}/h\nu$.

Nous avons donc montré que par un autre raisonnement sur la statistique des photons, nous pouvons mesurer le rendement de la caméra. Nous pouvons, en utilisant cette quantité, directement convertir le nombre de photo-électrons mesurés en nombre de photons reçus. Nous devons encore effectuer cette opération en faisant varier le gain de la camera pour mesurer la valeur de ρ dans toutes les conditions dans lesquelles nous sommes susceptibles de travailler.

5.1.13 Conclusion sur les expériences de calibration

Nous avons donc caractérisé le plus finement possible le système expérimental, à la fois du point de vue des pinces magnétiques et de la microscopie de fluorescence. Nous avons montré que dans chaque cas, ces caractéristiques sont du même ordre que celles de systèmes isolés (pinces magnétiques seules ou microscope seul) relativement performants.

Par ailleurs, ces caractéristiques semblent nous permettre effectivement d'observer des comportements de fluorophores uniques dans des conditions d'activité biologique, avec une bande passante raisonnable. Ces observations montrent cependant qu'il existe probablement des limitations importantes liées au nombre de photons qui pourra être collecté par unité de temps. Cela pourrait impliquer d'utiliser des fluorophores très brillants (*Quantum Dots*) ou de diminuer la bande passante pour augmenter le temps d'intégration.

Enfin, des améliorations expérimentales pourraient toujours être apportées pour rapprocher ces caractéristiques de celles des appareils les plus performants (par exemple avec une précision de localisation au moins nanométrique); cependant, l'amélioration de la précision est une fonction lentement variable de la qualité de la mesure, et une réorganisation complète du montage pourrait être nécessaire pour atteindre cet objectif.

Quantité	Valeur mesurée	Décrit p.
Rendement du montage d'excitation	$\rho \sim 5\%$	85
Grandissement	$100\times$	86
Densité de bruit des fluctuations du montage	$3 \cdot 10^{-7} \mu\text{m}^2/\text{Hz}$	88
Fréquence de coupure des fluctuations du montage	12 Hz	88
Effet de la défocalisation sur la fluorescence	$\delta_{1/2} \sim 500 \text{ nm}$	88
Bande passante de mesure en z (fluorescence)	$\sim 40 \text{ Hz}$	90
Bande passante de mesure en z (pinces magnétiques)	$30 - 90 \text{ Hz}$	
Précision sur z (pinces magnétiques)	6 nm	92
Précision sur (x, y) (pinces magnétiques)	$15 - 25 \text{ nm}$	93
Précision sur (x, y) (fluorescence)	$5 - 10 \text{ nm}$	93
Sensibilité de la caméra (méthode statistique)	68 ± 21 à $G = 1000$	98
Sensibilité de la caméra (méthode indirecte)	$100 - 300$ à $G = 1000$	99

TAB. 5.3: Résumé des différents paramètres du montage mesurés au cours de ces travaux.

5.2 Expériences de principe

5.2.1 Détection transitoire d'un fluorophore unique

Nous évaluons la capacité de détection de la matrice CCD du détecteur de fluorescence en observant la diffusion puis l'adsorption transitoire de fluorophores uniques à la surface de l'échantillon. En mode TIRF, les fluorophores présents dans la solution ne sont visibles qu'au voisinage immédiat de la surface.

Leur coefficient de diffusion étant assez élevé (de l'ordre de $100 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour un fluorophore organique), le temps caractéristique d'exploration d'un pixel (c'est à dire une zone de 160 nm de côté sur l'échantillon) est de l'ordre de 0.3 ms. Pendant le temps d'exposition (au moins 2 ms), le fluorophore répartit donc quelques photons à chaque fois sur plusieurs pixels, conduisant à un bruit relativement homogène.

Ne sont donc visibles que les fluorophores contraints transitoirement dans leur déplacement spatial. Dans les expériences que nous avons réalisées, cette contrainte provient de l'interaction spécifique avec une protéine. Nous utilisons ici l'adsorption non spécifique sur la surface pour évaluer les capacités du détecteur de fluorescence. La figure 5.17 p.101 présente une des images d'une série enregistrée avec une période d'acquisition de 8.4 ms. Quelques fluorophores transitoirement adsorbés sont visibles. La fluorescence correspondant à deux d'entre eux au cours du temps est représentée sur la même figure.

Le basculement tout-ou-rien d'un état brillant à un état sombre du second fluorophore montre bien qu'il s'agit d'une molécule unique. Nous disposons donc d'une seconde méthode, en complément de la mesure du flux de photons, pour vérifier l'unicité d'un fluorophore. Cette méthode est facilement applicable aux *Quantum Dots* puisque leur basculement entre états sombre et brillant est précis et réversible. Dans le cas de fluorophores organiques, le blanchiment est irréversible mais nous permettra de confirmer *a posteriori* qu'il s'agissait bien d'une molécule unique.

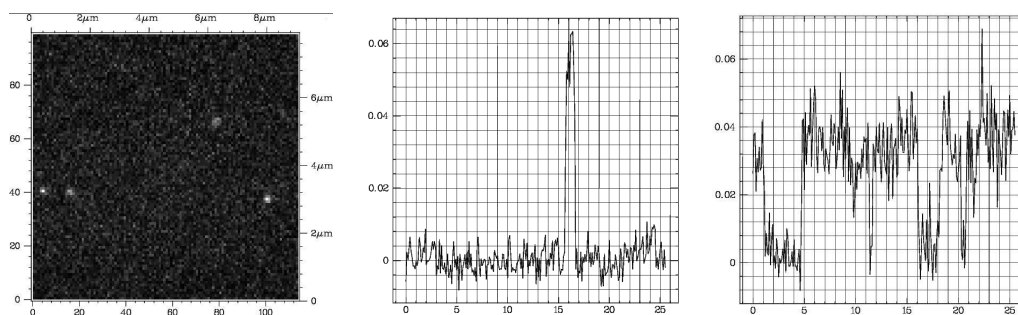


FIG. 5.17: [G] Image de la fluorescence à 665 nm de molécules uniques d'Alexa647 excitées à 633 nm. Temps d'intégration : 8.4 ms. [C] Evènement de fluorescence d'un fluorophore unique libre. Temps de résidence au voisinage de la surface : environ 500 ms. [D] Evènement de fluorescence d'un fluorophore unique fixé non-spécifiquement à la surface : basculement réversible dans un état sombre.

Ces données montrent également que nous pouvons réaliser un suivi temporel relativement rapide (> 100 Hz) de variations d'intensité de fluorescence. Nous souhaitons exploiter cette possibilité pour le suivi 3D du fluorophore, et éventuellement dans des expériences de FRET.

5.2.2 Excitation multicolore alternée

En utilisant le modulateur acousto-optique, l'intensité des LASER d'excitation est modulée à volonté. Cela inclut les modulations rapides entre excitation du donneur et de l'accepteur dans des expériences de FRET. Nous montrons les capacités du montage en utilisant un *Quantum Dot* qui présente l'avantage de présenter une bande spectrale d'excitation très large et une bande d'émission indépendante de la longueur d'onde d'excitation.

L'intensité des LASER à 488 nm et 633 nm est ainsi modulée en tout-ou-rien en opposition de phase. La section efficace d'absorption du *Quantum Dot* étant plus faible à 633 nm qu'à 488 nm, la fluorescence détectée prend la forme d'un créneau (bruité) modulé à la même fréquence (*cf.* Fig.5.18 p.101).

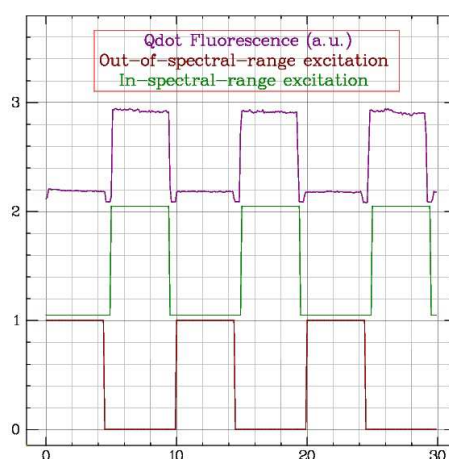


FIG. 5.18: Modulation à 5 Hz de l'excitation d'un *Quantum Dot* émettant à 655 nm par deux LASER à 488 nm (trait vert) et 633 nm (trait rouge). Le signal de fluorescence (trait pourpre, unités arbitraires) est observé dans la gamme 650-720 nm.

Nous pouvons donc sans difficulté moduler rapidement l'intensité d'excitation du fluorophore, en particulier en vue d'intégrer un dispositif de détection à deux couleurs au microscope.

5.2.3 Suivi d'un Quantum Dot unique

Les *Quantum Dots* sont des fluorophores très utilisés en microscopie de fluorescence en molécule unique : leur brillance est élevée, ils émettent des photons de fluorescence avec un *Stokes shift* considérable, ils ne sont pas notablement photodétruits et ils sont relativement facilement fonctionnalisables de manière à être couplés à des protéines d'intérêt.

Pour l'étude de FtsK et l'ARN Polymérase de T7, une partie des expériences conçues nécessite un marquage spécifique des protéines par un *Quantum Dot*. D'autres les utilisent comme chandelle standard de position. Dans tous les cas, la fluorescence observée doit pouvoir être attribuée avec certitude à un *Quantum Dot* unique.

Nous avons évoqué précédemment la capacité de notre montage à vérifier cela. En particulier, une propriété photophysique particulière des *Quantum Dots* permet de s'en assurer : leur émission de fluorescence s'accompagne du basculement transitoire dans un état sombre, conduisant à un apparent clignotement (*blinking*) du *Quantum Dot* (Nirmal 1996; Kuno 2001; Lippitz 2005) (*cf.* Fig 5.19 p. 102).

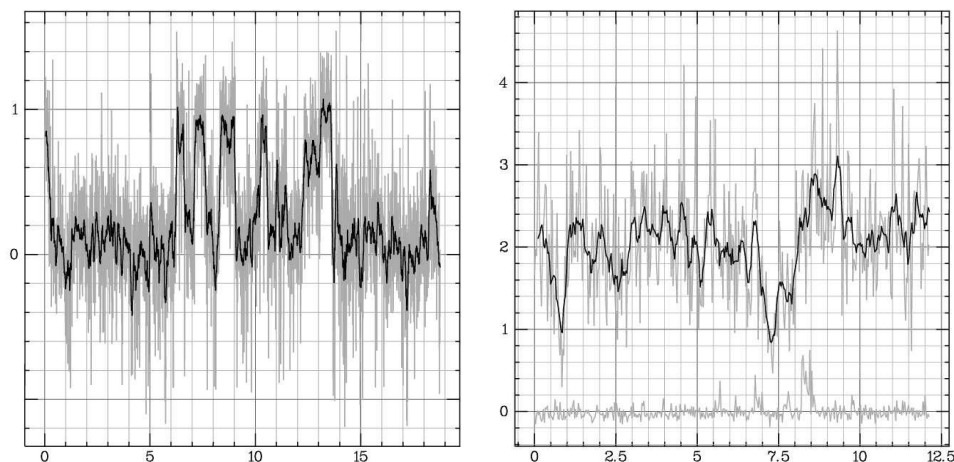


FIG. 5.19: Observation de la fluorescence (u.a.) au cours du temps (en s) [G] d'un *Quantum Dot* unique [D] d'un petit agrégat de *Quantum Dots*. Dans le premier cas, on observe un système à deux états : l'un brillant et l'autre sombre (non distinct du bruit de fond) ; dans l'autre cas, on n'observe jamais d'état totalement sombre. $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{fl} = 655 \text{ nm}$, $T = 30 \text{ ms}$. En noir, signal filtré à 250 ms.

Ce clignotement peut être gênant, par exemple pour le suivi de la position (x, y) au cours du temps du *Quantum Dot*, et il existe des solutions expérimentales pour y remédier : β -mercapto-ethanol (Hohng 2004), β -mercapto-ethanol et glutathione (Li-Shishido 2006), ou gallate de propyle (3,4,5-trihydroxybenzoic acid propyl ester) (Fomenko 2008). Cependant, à la manière du blanchiment (*bleaching*) d'un fluorophore organique unique, il permet de montrer que le fluorophore observé est unique.

5.2.4 Combinaison pinces magnétiques - fluorescence en ondes évanescentes

Dans une configuration simplifiée, nous avons réalisé le couplage de l'observation de l'activité en pinces magnétiques et celui en microscopie de fluorescence en ondes évanescentes.

Nous avons tiré parti de la très grande processivité de FtsK, en conditions appropriées : $[FtsK] = 2 \text{ nM}$ par monomère et $[ATP] = 2 \text{ mM}$. Nous avons utilisé un trimère biotinylé *biot - wt - wt - wt* qui peut se fixer à la surface de la bille magnétique par interaction biotine-streptavidine. Par ailleurs, des *Quantum Dots* interagissent de manière non-spécifique avec la surface de la bille magnétique et y adhèrent également.

En présence d'ATP, le complexe de FtsK diminue la distance bout-à-bout de l'ADN et amène la bille, et donc le *Quantum Dot* fixé dessus, à proximité de la surface de verre. A cette occasion, le *Quantum Dot* peut faire une excursion dans la profondeur de pénétration de l'onde évanescente. Les événements mécaniques de raccourcissement presque total de l'ADN coïncident donc avec une augmentation brutale de l'intensité de fluorescence (*cf.* Fig 5.20 p. 103).

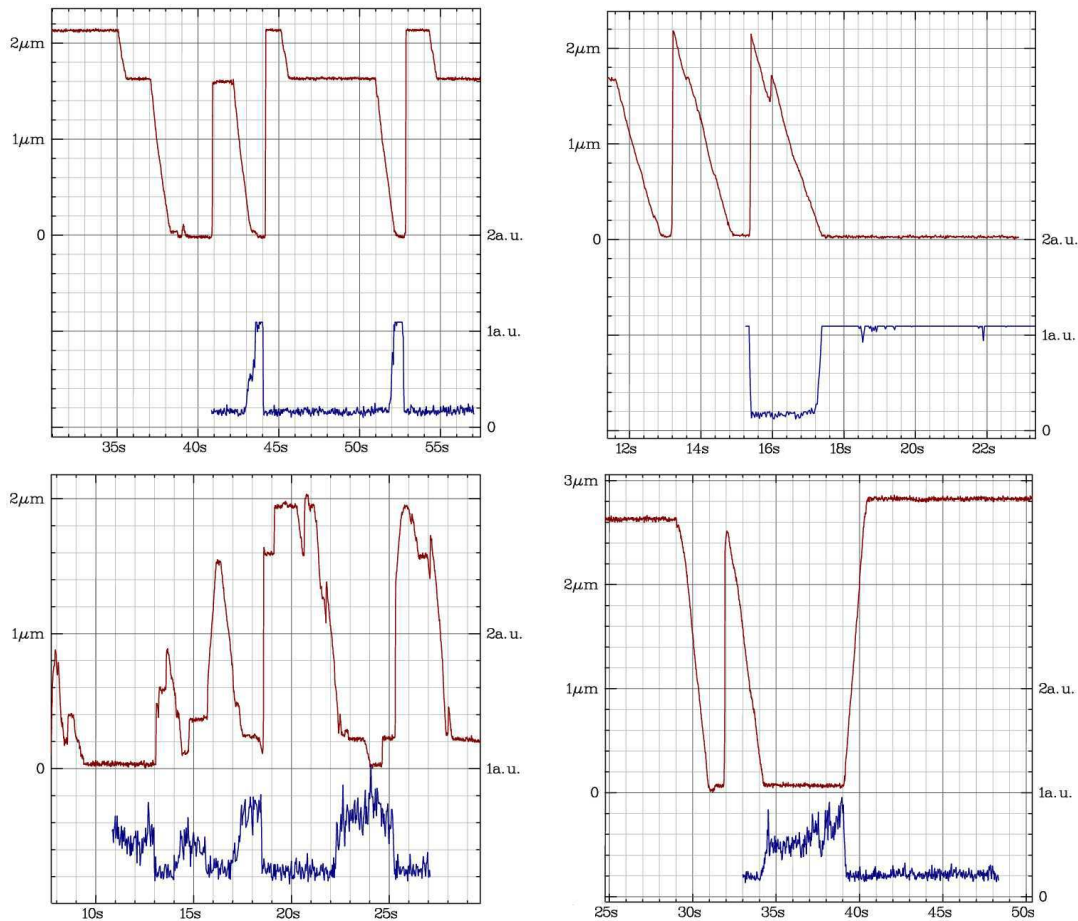


FIG. 5.20: Combinaison de l'observation mécanique en pinces magnétiques et de microscopie de fluorescence en ondes évanescentes. Les graphes représentent la trace de l'extension bout-à-bout de l'ADN (rouge) et de l'intensité de fluorescence (bleu) pour différents événements. $[FtsK] = 2 \text{ nM}$ par monomère, $[ATP] = 2 \text{ mM}$, $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 655 \text{ nm}$.

Nous montrons ainsi que nous pouvons obtenir une observation combinée de l'action mécanique d'une protéine (par l'appareil de pinces magnétiques) et de la position d'un marqueur fluorescent (par microscopie de fluorescence en ondes évanescentes). Dans la configuration présentée, nous n'avons pas retranscrit l'intensité apparente de fluorescence en distance du fluorophore à la surface, alors que la comparaison des vitesses déterminées par suivi de la bille magnétique et pas suivi du fluorophore aurait pu être intéressante.

En effet, le *Quantum Dot* est placé de manière non spécifique sur la bille magnétique, qui subit non seulement un couplage translocation-rotation dû au mouvement de FtsK, mais aussi une diffusion rotationnelle due au mouvement brownien. En fait, la position du fluorophore, bien que suivant globalement celle de la bille magnétique, varie assez notablement ; l'intensité de fluorescence mesurée à position de la bille fixée varie ainsi d'un facteur pouvant aller jusqu'à deux à quelques secondes d'intervalle dans les données présentées.

Nous envisageons par conséquent de réaliser une configuration plus simple en saturant de *Quantum Dots* la bille magnétique. Cette configuration nous permettrait d'une part de comparer le *tracking* en pinces magnétiques et en fluorescence, mais surtout de réaliser un positionnement sur des molécules d'ADN courtes (quelques Λ) en tirant parti de l'onde évanescente. Elle présente en effet l'avantage de permettre une mesure de *position absolue*, contrairement au suivi de billes magnétiques, bien qu'avec une précision plus faible.

5.2.5 Conclusion sur les expériences de principe

En complément des mesures de calibration effectuées précédemment, nous estimons par ces expériences que notre montage possède les caractéristiques de stabilité, de précision et de bande passante nécessaires à des observations d'activité en molécule unique.

Ces observations montrent cependant que des compromis, en particulier entre la bande passante et la précision, devront être trouvés au cas par cas des expériences envisagées. Elles suggèrent également de nouvelles configurations expérimentales, spécifiques à la combinaison d'un appareil de pinces magnétiques avec un microscope de fluorescence.

6 Stratégies de marquage fluorescent

Dale limosna mujer
que no hay en la vida nada
como la pena de ser
ciego en Granada

(Francisco Alarcón de Icaza)

Introduction

Comme nous l'avons évoqué dans les chapitres précédents, rien n'est plus frustrant dans les techniques de micromanipulation que de ne disposer que du sens du toucher. Toutes ces manipulations mécaniques, aussi sensibles soyons-nous à leurs détails, ne nous permettent pas de voir l'action se dérouler.

Nous avons d'abord exposé comment la possibilité de voir nous permettrait de mieux comprendre certains mécanismes moléculaires. Nous venons de montrer que nous disposons d'un appareil performant, permettant de coupler observations (et action) mécaniques et optiques. Nous montrons dans ce chapitre que nous sommes capables d'obtenir les substrats biologiques bruts nécessaires à ces observations (ADN, protéines, nucléotides, etc.).

L'objet principal de ce chapitre est toutefois d'exposer les méthodes que nous avons employées pour transformer ces substrats bruts en objets fluorescents clairement définis. Malheureusement, la conclusion générale est que nous n'avons presque jamais réussi à obtenir des protéines fluorescentes pour lesquelles nous puissions observer une activité simultanée en pinces magnétiques et en microscopie de fluorescence.

Comme nous le verrons, la difficulté principale a été de s'assurer de la nature des objets marqués obtenus, caractérisation qui a été très difficile et pour laquelle nous n'avons pas encore de réponse complète.

Les protocoles des expériences décrites ci-dessous sont détaillés en annexe p.225 et dans (Manosas 2010).

6.1 Préparation des ADN

6.1.1 Principe général

L'exigence principale des expériences en molécule unique est de pouvoir localiser spécifiquement la protéine d'intérêt, en l'occurrence sur une molécule d'ADN. Nous devons donc introduire un site de reconnaissance à une position bien précise. De plus, l'utilisation des ondes évanescentes impose que le phénomène se déroule près de la surface ; selon que nous voulons observer l'activité à son démarrage ou en son cours, nous devons donc positionner le site de reconnaissance à une distance précise de la surface.

Selon les protéines que nous souhaitons étudier, nous avons obtenu par des collaborations des plasmides contenant les séquences spécifiques nécessaires à nos expériences. Elles seront décrites dans les sections consacrées à ces protéines. A partir de ces plasmides, nous avons préparé des molécules d'ADN possédant exactement les caractéristiques permettant de les utiliser dans les expériences de micromanipulation par pinces magnétiques, couplées avec une détection de fluorescence en ondes évanescentes.

Préalablement à toute manipulation, nous transformons d'abord une bactérie compétente avec l'échantillon de plasmide et nous cultivons cette bactérie pour en produire une grande quantité (quelques milligrammes de plasmide total). Nous extrayons ensuite l'ADN de la culture bactérienne.

En fonction de la distance de la séquence d'intérêt à la surface (de la lamelle de verre ou de la bille magnétique) et de la longueur totale de l'ADN que nous souhaitons imposer, nous préparons à partir du plasmide un fragment d'ADN double brin linéaire. Ce fragment, appelé «fragment central», porte à ses deux extrémités une structure particulière, où un des deux brins de la double hélice est légèrement plus long que son complémentaire, généralement de 4 à 6 bases (*cf.* Fig 6.1 p. 106). La séquence des bases flottantes est différente pour les deux extrémités, ce qui nous permettra au final de l'associer à des surfaces différentes : l'une près de la lamelle, l'autre près de la bille.

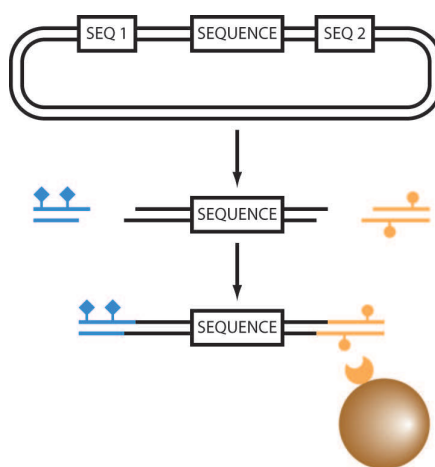


FIG. 6.1: Principe de la préparation des ADN utilisés dans les expériences. A partir d'un plasmide contenant la séquence d'intérêt, un fragment est sélectivement extrait, portant à ses extrémités des bases flottantes. Ce fragment est mis en présence des fragments extérieurs (en couleurs) qui portent des bases modifiées. La ligation de ces trois fragments conduit à un ADN unique, qui peut être ultérieurement mis en présence des billes magnétiques.

Par ailleurs, nous préparons deux courts fragments d'ADN double brin (50-500 bp), généralement à partir du plasmide. L'un d'entre eux possède également des bases flottantes, complémentaires de celle d'une des extrémités du fragment central. Par ailleurs, il contient aussi une ou plusieurs bases modifiées qui portent une digoxigénine. L'extrémité du fragment central dont l'extrémité lui est complémentaire va donc être attachée à la surface de verre. Réciproquement, l'autre fragment comporte des bases modifiées avec de la biotine et orientera l'autre extrémité du fragment central vers la bille.

Les deux fragments extérieurs modifiés, ainsi que le fragment central, sont incubés ensemble pour que leurs extrémités complémentaires s'associent. En présence d'une *ligase*, les squelettes phospho-glucidiques des différents fragments deviennent reliés par une liaison covalente. La construction d'ADN ainsi obtenue est incubée en présence de billes magnétiques et utilisée comme décrit précédemment.

6.1.2 Préparation du fragment central

Enzymes de restriction

A partir des positions idéales que nous avons déterminées pour extraire le fragment central du plasmide, nous sélectionnons dans la séquence du plasmide les sites de reconnaissance par une enzyme de restriction les plus proches. En incubant le plasmide avec le couple d'enzymes de restriction choisi, nous obtenons plusieurs fragments, dont le fragment central (*cf.* Fig 6.2 p. 107). Selon les besoins, celui-ci peut être purifié, mais ce n'est généralement pas le cas.

Les enzymes de restriction, quand elles sont bien choisies, engendrent précisément ces motifs de coupure où l'un des brins à l'extrémité est plus long que l'autre de quelques bases. Le nombre de ces enzymes est relativement restreint (quelques dizaines). Comme leur site de reconnaissance est en général une structure de 6 bp, ils ne sont pas très nombreux (tous les $4^6 = 4$ kbp en moyenne sur un génome aléatoire). Il n'y a donc pas *a priori* de raison qu'un site de restriction se trouve au voisinage de la position idéale où nous souhaitons couper le plasmide.

Dans la plupart des cas, nous pouvons construire un plasmide intermédiaire, dans lequel nous aurons inséré la séquence intéressante pour nos expériences à l'intérieur d'un plasmide commercial contenant un grand nombre de sites de restriction. C'est à partir de ce plasmide intermédiaire que nous préparerons le fragment central. Dans les expériences présentées dans ce document, nous n'avons pas eu à réaliser ce clonage intermédiaire, puisque les plasmides que nous avons obtenus possédaient déjà les bons sites de restriction.

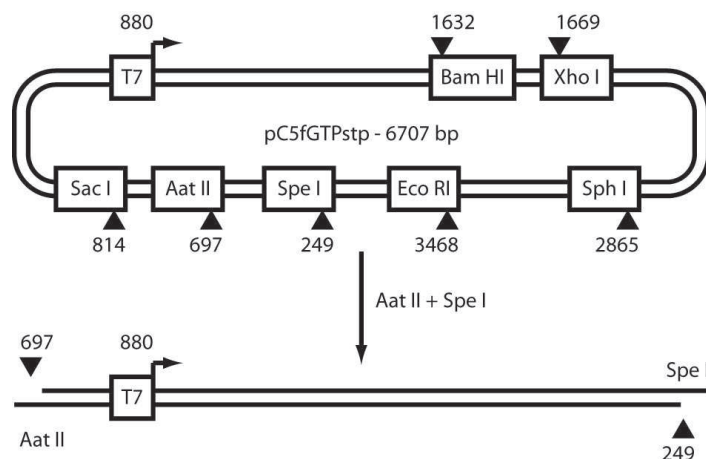


FIG. 6.2: Exemple de préparation d'un fragment central par digestion. Le plasmide utilisé est pC5fGFPstp contenant le promoteur de l'ARN Polymérase de T7. En présence des enzymes de restriction *Aat II* et *Spe I*, la réaction conduit au fragment central de 6259 bp bordé par des bases flottantes.

PCR

Dans le cas d'expériences où l'activité de la protéine est particulièrement sensible à la qualité de l'ADN (T. STRICK, communication personnelle), nous avons utilisé une méthode alternative. Elle présente de plus l'avantage de conduire à un positionnement plus précis de notre séquence d'intérêt par rapport à la surface. Elle est également plus générale et peut s'appliquer dans toutes les situations.

Une fois les deux positions auxquelles nous voulons extraire la séquence d'intérêt déterminées, nous commandons des oligonucléotides complémentaires à la séquence du plasmide qui se trouve à ces positions (sur environ 20 bp). A l'extrémité 5' de ces oligonucléotides, nous avons fait ajouter la séquence d'un site de restriction de notre choix (*cf.* Fig 6.3 p. 108).

En effectuant une PCR sur le plasmide, en présence de ces deux oligonucléotides, nous amplifions le fragment central, bordé par les sites de restriction choisis. Nous effectuons ensuite une simple restriction pour obtenir le fragment central avec les extrémités flottantes. Nous avons utilisé cette méthode pour obtenir des substrats pour l'ARN Polymérase de T7 pour lesquels le promoteur se trouvait à une distance donnée de la surface.

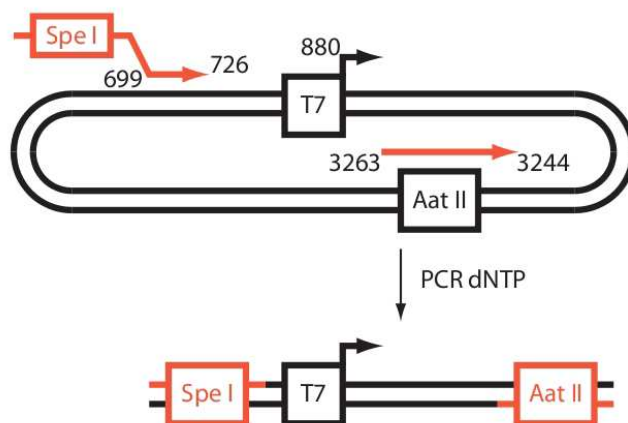


FIG. 6.3: Exemple de préparation d'un fragment central par PCR. Le plasmide utilisé est p24MS2 contenant le promoteur de l'ARN Polymérase de T7. En présence des oligonucléotides adaptés, la réaction de PCR produit un amplifiat contenant les sites *Aat II* et *Spe I*; la digestion par les enzymes de restriction correspondantes conduit au fragment central bordé par des bases flottantes.

L'avantage par rapport à la méthode précédente est l'absence d'étape d'extraction de l'ADN, ainsi qu'une production totalement artificielle. A titre d'exemple, nous avons été confrontés à un problème de synthèse sur un substrat dans lequel un court *hairpin* accidentel contenant en partie le site de reconnaissance était éliminé *in vivo*. Après plusieurs mois de tentatives infructueuses, c'est un séquençage de l'ADN synthétisé qui nous a permis de comprendre le problème et de le corriger.

6.1.3 Préparation des fragments extérieurs

PCR

Comme fragments extérieurs, nous avons besoin de courts oligonucléotides (50-200 bp) portant un ou plusieurs nucléotides modifiés et ayant à une extrémité des bases flottantes complémentaires de celles du brin central.

La solution la plus simple pour les réaliser consiste à amplifier par PCR une région d'environ 400 bp de part et d'autre du site de restriction en question. Nous introduisons en plus des dNTP normaux une fraction de dUTP:biot ou dUTP:dig qui vont statistiquement s'insérer à la place de certains dTTP. Le fragment amplifié (comportant quelques U-biot ou U-dig) est incubé en présence de l'enzyme de restriction. Nous obtenons ainsi les fragments extérieurs.

En théorie, le fragment peut être amplifié à partir du plasmide lui-même, puisqu'il contient le site de restriction. En réalité, le nombre d'enzymes de restriction étant restreint, et les fragments obtenus par PCR étant tellement concentrés par rapport au fragment central, nous avons constitué une bibliothèque de fragments pour un certain nombre de sites de restriction, dans laquelle nous prélevons quelques microlitres de fragments extérieurs à chaque fois.

L'inconvénient de cette technique est que, d'une part, le nombre et la position de digoxigenine et biotine dans chaque fragment (indispensables pour les expériences sous contrainte de torsion, *cf.* p. 110) est totalement aléatoire, et d'autre part que pour chaque couple d'amorces de PCR nous produisons deux types de fragments extérieurs (de part et d'autre du site de restriction). Les ADN produits sont donc intrinsèquement polydisperses, ce qui n'est pas forcément gênant si l'ADN synthétisé est long devant la taille des fragments extérieurs.

Oligonucléotides commerciaux

Nous pouvons également directement commander un oligonucléotide de séquence arbitraire comportant à son extrémité les bases flottantes voulues et une base modifiée portant digoxigenine ou biotine.

Cette solution est plus onéreuse (environ 100€ contre 10€) que de commander des amorces de PCR, et est généralement limitée à une unique modification par oligonucléotide. Par conséquent, il est impossible d'imposer des contraintes de torsion et le lien avec la surface est également un peu plus fragile.

En revanche, ces fragments présentent l'avantage d'être mieux caractérisés que les fragments obtenus par PCR (incorporation statistique des dUTP modifiés, généralement deux fragments extérieurs possible à partir de la séquence amplifiée à cause de la restriction, etc.). Nous les avons utilisés ponctuellement dans le cas de constructions difficiles à mettre en oeuvre, en particulier pour celles destinées à observer l'interaction d'une protéine avec son site de reconnaissance (ARN polymérase ou FtsK) puisque nous pouvons ainsi positionner exactement ce site par rapport à la surface.

Extrémité en épingle à cheveux

A l'échelle des ondes évanescentes (quelques centaines de nanomètres), la longueur de persistance de l'ADN double brin (50 nm) commence à ne pas être négligeable. Or, le fragment extérieur est attaché à la surface de verre latéralement (*cf.* Fig 6.4 p. 110). Par conséquent, il doit se courber sur une distance importante avant de devenir vertical.

Par ailleurs, nous nous efforçons de placer la séquence d'intérêt au plus près possible de la surface de verre. Par conséquent, il y a un risque que la séquence se trouve presque plaquée par la rigidité de l'ADN contre la surface, et la rende ainsi difficilement accessible. Dans la mesure où nous n'avons pas réussi à observer l'interaction de l'ARN Polymérase de T7 avec son promoteur, nous avons souhaité savoir si cette faible accessibilité pouvait expliquer ce résultat.

Pour remédier à cela, tout en conservant une distance minimale entre la surface de verre et la séquence, nous avons conçu une nouvelle méthode d'accrochage utilisant un fragment extérieur en forme d'épingle à cheveux. Les deux extrémités de l'épingle sont complémentaires entre elles et aux bases flottantes du fragment central. La boucle de l'épingle porte une base modifiée digoxigenine. L'attachement à la surface se fait donc non plus latéralement, mais axialement : l'ADN est donc accroché quasi-verticalement à la surface (*cf.* Fig 6.4 p. 110).

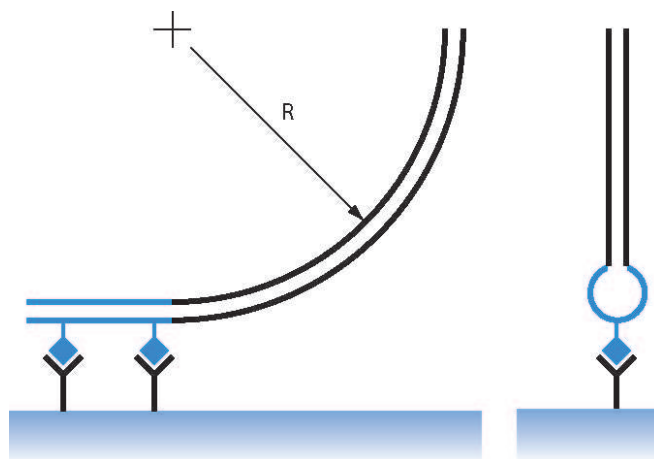


FIG. 6.4: Stratégies d'attachement de l'ADN à la surface de verre. [G] L'attachement latéral des molécules de digoxigénine (en bleu) à l'anticorps correspondant ("Y" noir) engendre une courbure importante de l'ADN ($R \sim 150$ bp) au voisinage de la surface. [D] En utilisant un attachement axial, la courbure imposée est faible, voire inexistante.

L'utilisation de cette configuration n'a pas permis non plus d'observer l'interaction de l'ARN Polymérase de T7 avec son promoteur. Comme nous le verrons plus loin, nous avons attribué ce résultat négatif à la qualité du marquage fluorescent. Néanmoins, les techniques de production d'ADN que nous avons mises en oeuvre nous permettront de disposer de molécules d'ADN bien définies pour les expériences de molécule unique en microscopie de fluorescence.

6.1.4 Cas particulier de la torsion

Le sensibilité des molécules d'ADN aux contraintes de torsion est un enjeu important dans les expériences de pinces magnétiques, particulièrement dans le cas de l'ARN polymérase. Du moment que l'accroche de l'ADN aux surfaces se fait par plusieurs points d'ancrage, la sensibilité de l'ADN à la torsion ne dépend que de l'absence de cassures simple brin (*nicks*) sur le squelette de la double hélice.

Lorsque sur le même substrat d'ADN nous souhaitons pouvoir étudier le comportement d'une protéine en présence ou en l'absence de torsion selon les cas (c'est particulièrement vrai pour FtsK), il est toujours possible de dégrader légèrement l'ADN par des forces de cisaillement pour lui faire perdre sa sensibilité à la torsion. C'est une méthode que nous employons à l'occasion, mais qui n'est de manière générale pas contrôlée.

Dans certains substrats (non présentés dans ce travail), nous avons introduit un site de restriction reconnu par l'enzyme *BbvCI*. Il existe deux variants de cet enzyme qui sont capable de n'accomplir la restriction de l'ADN que sur un seul brin. Nous avons dans ce cas créé un *nick* à une position spécifique et de manière contrôlée.

En général, ce site est introduit en même temps qu'un nucléotide modifié qui permettra de fixer une petite bille pour une expérience de type *rotor bead assay* (Gore 2006) (non présenté ici).

6.1.5 Conclusion

La table 6.1 résume les principales techniques de réparation des fragments d'ADN, ainsi que leurs avantages et inconvénients.

Fragment	Technique	Avantages	Inconvénients
Central	Restriction	Rapide, simple	Élimination des fragments indésirables, nombre fini de sites de restriction
Central	PCR	Fidélité, incorporation d'extrémités arbitraires, quantité de plasmide nécessaire très faible	Amorces spécifiques à chaque plasmide
Extrémités	PCR	Incorporation de plusieurs nucléotides modifiés, économique	Incorporation aléatoire, nombre fini de sites de restriction
Extrémités	Oligos marqués	Extrémités arbitraires, marquage bien caractérisé	Un seul nucléotide modifié à prix raisonnable (pas de torsion)
Extrémités	<i>Hairpin</i>	Extrémités arbitraires, pas de proximité de l'ADN avec la surface	Un seul nucléotide modifié à prix raisonnable (pas de torsion)

TAB. 6.1: Récapitulatif des stratégies de préparation des fragments d'ADN et leurs avantages et inconvénients principaux.

6.2 Préparation des protéines

Nous présentons ici comment nous avons obtenu les protéines décrites dans ce manuscrit. L'essentiel des détails est présenté dans les protocoles en annexe.

6.2.1 FtsK

Au cours de ce travail, nous avons effectué des expériences sur un grand nombre de variants de la protéine. Nous avons directement obtenu les monomères sauvages de FtsK_C de *Escherichia coli* et *Vibrio Cholerae* par une collaboration avec F.-X. BARRE (CNRS Gif-sur-Yvette) et préparés par Laetitia BONNÉ.

L'ensemble des mutants WA, WB et RF de FtsK, ainsi que les formes multimériques covalentes (dimères, trimères) ont été obtenus par une collaboration avec D. SHERRATT (Oxford, UK) et préparés par Estelle CROZAT. Les grandes lignes de leur préparation ont été précédemment décrites dans (Martin 2005; Chen 2008) et le détail dans l'article que nous avons rédigé ensemble à l'issue des expériences (Crozat 2010) (chapitre 11 p. 183).

Pour certains mutants (Estelle CROZAT), nous avons également obtenu par cette collaboration directement des trimères covalents portant une biotine à leur extrémité N-terminale, immédiatement à côté de la protéine.

6.2.2 ARN Polymérase de *Escherichia coli*

A la fin de ce travail, nous avons engagé une collaboration avec S. WEISS (UCLA, USA) sur l'ARN Polymérase de *Escherichia coli*. Nous avons obtenu de ce groupe l'holoenzyme portant une biotine sur les sous-unités α (N-terminal) ou β' (C-terminal), préparées par Youngyu KIM et Yuval EBENSTEIN.

Nous avons testé leur activité en collaboration avec T. STRICK (Paris VII), puis répété ces tests sur notre appareil avec succès.

6.2.3 ARN Polymérase de T7

Par une collaboration avec P. LOPEZ (ENS Paris), nous avons obtenu le plasmide contenant le gène codant pour l'ARN Polymérase de T7 fusionné à son extrémité N-terminale avec une séquence codant pour le polypeptide MAGGLNDIFEAQKMEWRLE. Cette protéine a précédemment été utilisée avec succès dans un travail en molécules uniques (Thomen 2008).

Nous avons transformé ce plasmide dans une souche de *Escherichia coli* («AVB 101», Avidity, USA) contenant un second plasmide codant pour la protéine *birA*. En présence d'IPTG et de biotine libre, nous avons induit la production de la protéine chimérique et la biotinylation de la lysine (K) du polypeptide N-terminal.

Nous avons ensuite extrait la fraction protéique, puis purifié l'ARN Polymérase de T7 sur une colonne de neutravidine. Après rinçage, les ARN Polymérase de T7 fixées ont été relarguées par élution en présence de biotine libre.

La biotine libre présente dans les fractions les plus concentrées en ARN Polymérase de T7 a été éliminée par dialyse contre un tampon neutre. Nous avons effectué les tests d'activité en volume selon les protocoles décrits dans le chapitre 8 p.133.

6.3 Marquage des protéines

6.3.1 Introduction

Bien que d'autres méthodes proches soient possibles sur certaines des protéines que nous avons utilisées (anticorps anti-*His tag* et anti-*GST tag*), nous n'explicitons que les méthodes de marquage utilisant l'interaction streptavidine-biotine.

La constante d'association biotine-streptavidine est extrêmement grande : $K_d = 40$ fM (Laitinen 2006). Bien que la solidité de cette liaison dépende du temps laissé aux deux partenaires pour interagir (Pincet 2005), une mise en contact de quelques minutes devrait suffire à produire une liaison solide (Crut 2005). Notre propre expérience de formation des complexes ADN-bille magnétique par une liaison streptavidine-biotine confirme cet ordre de grandeur.

6.3.2 Marquage direct

La première stratégie que nous avons utilisée est d'incuber directement la protéine biotinylée et les *Quantum Dots* recouverts de streptavidine, dans un rapport équimolaire (environ $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (Biebricher 2009). La réaction est réalisée sur glace en tube Eppendorf pendant 5 à 10 minutes. La solution obtenue est ensuite diluée à la concentration souhaitée et additionnée au tampon de réaction avec tous les cofacteurs nécessaires. De cette manière, la protéine est toujours gardée à basse température jusqu'au moment de l'injection.

Dans ces conditions, nous avons pu observer des événements en pinces magnétiques (les données présentées dans les figures 9.5, 9.9, 9.11, par exemple). Dans le même temps, nous pouvions visualiser des *Quantum Dots* en ondes évanescentes à des concentrations compatibles avec la valeur attendue (environ 10 nM, soit quelques particules par micron-cube).

Cependant, nous n'avons jamais pu observer de manière convaincante une colocalisation de fluorescence avec la position de la bille, ni de coïncidence entre les périodes d'activité de l'ARN polymérase et la présence de fluorescence au même endroit.

Une explication que nous avons jugée possible est qu'en plus de la biotine fixée à la protéine et de la streptavidine fixée au *Quantum Dot*, peuvent se trouver en solution des

molécules de biotine et de streptavidine libres. Les premières peuvent être un reliquat des molécules de biotine libres utilisées pour éluer la protéine, et qui ont été incomplètement dialysées. Quand aux streptavidine, leur attachement aux *Quantum Dots* n'est semblait-il pas parfaitement robuste et une partie des molécules peut s'en détacher. Nous avons ultérieurement remédié à cette possibilité par une filtration analogue à celle présentée en 6.3.4 p. 113.

6.3.3 Marquage en excès

Pour les observations en molécule unique, nous souhaitons bien évidemment que toutes les molécules de protéine soient marquées par un *Quantum Dot*. Nous avons donc envisagé d'introduire, non pas une quantité stoechiométrique, mais un excès de *Quantum Dots* par rapport à la protéine. Un excès d'un facteur 2 n'a pas été plus convaincant.

Au-delà, la concentration en *Quantum Dots* va commencer à être importante et le signal parasite de tous les *Quantum Dots* non-conjugués à une protéine va polluer le signal des protéines intéressantes.

Il est donc absolument nécessaire, après la réaction de couplage, de purifier les complexes protéine-*Quantum Dot* du reste des espèces (protéines ou *Quantum Dots* libres, biotine ou streptavidine en solution, etc.). Le problème est que la masse moléculaire des *Quantum Dots* et des protéines est du même ordre de grandeur (100 kDa). La plupart des techniques dont nous disposions au début de ces travaux, utilisant un critère de séparation sur la masse ou la taille, ne nous auraient pas permis de sélectionner spécifiquement le complexe.

6.3.4 Pré-purification par critère de taille

Pour augmenter la proportion de complexe, nous avons néanmoins employé deux techniques de purification.

Dans la première, nous avons utilisé une membrane de nitrocellulose (Millipore, USA) comportant des pores de 25 nm. Nous avons déposé des gouttes de solution d'ARN polymérase biotinyllée sur une face de la membrane, l'autre face reposant sur un volume de tampon comparativement grand ($> 100\times$) par rapport à la taille de la goutte.

Après une incubation d'environ 15 minutes, conformément aux indications du fabricant, nous avons récupéré la goutte qui devrait contenir l'ARN Polymérase de T7 (de la taille des pores), mais pas la biotine (beaucoup plus petite). Cette opération n'a pas permis d'avancer significativement la recherche d'une colocalisation ADN/fluorescence. D'une part, parce qu'il est possible que le problème ne vienne pas de la solution d'ARN Polymérase de T7, d'autre part parce que la taille des pores est peut-être trop grande par rapport à celle de la protéine, qui est donc appauvrie dans la solution. L'utilisation de temps d'incubation plus longs ou de solutions d'ARN Polymérase de T7 un peu plus concentrées n'a pas permis non plus d'améliorer la situation.

La seconde technique a consisté à utiliser pour les *Quantum Dots*, non pas une membrane pour laquelle la taille de la streptavidine est trop grande, mais une colonne de cellulose YM-100 (Millipore, USA) qui agit comme un filtre passe-bas de taille de coupure 100 kDa (Biebricher 2009). La solution de *Quantum Dots* est chargée en haut de la colonne, qui est centrifugée. Nous récupérons dans la fraction retenue les *Quantum Dots* débarrassés de la streptavidine libre. Malheureusement, il est apparu que ces derniers collaient facilement à la phase stationnaire. Le rétentat récupéré est donc très appauvri en *Quantum Dots*.

Une fois l'incubation entre protéine et *Quantum Dots* réalisée, le passage sur membrane de nitrocellulose est sans intérêt, puisqu'elle retiendra probablement la protéine libre et

surtout les *Quantum Dots* libres.

6.3.5 Pré-purification par critère de charge

Le principal problème que nous avons rencontré dans ce travail est que, à partir d'un simple problème technique (l'absence d'activité simultanée en pinces magnétiques et en fluorescence), il nous a été très difficile d'engager une démarche d'aller-retour entre la préparation des protéines marquées et les expériences de molécule unique. En effet, les caractéristiques des *Quantum Dots* libres sont généralement trop proches de celles du complexe pour que nous puissions les séparer par les techniques évoquées précédemment.

Afin d'obtenir une caractérisation plus analytique et éventuellement une purification précise, nous avons engagé une étude par HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) de ces différents éléments, sous la conduite de B. DUCOS, actuellement en cours.

Nous avons déposé sur une phase stationnaire de cations ammonium quaternaires (colonne «MonoQ», *GE Healthcare*, USA) un mélange d'ARN Polymérase de T7 biotinylée et de complexe covalent streptavidine: Cy5 dans un rapport molaire 1:10. La phase mobile est un tampon de pH 8,1. Dans ces conditions, la charge apparente de l'ARN Polymérase de T7 et de la streptavidine sont négatives (leur point isoélectrique est de l'ordre de 6,8). Au fur et à mesure de l'élution, la concentration en sel (NaCl) augmente et écrante progressivement l'interaction électrostatique de la protéine avec la colonne jusqu'à provoquer son détachement. Pour une charge apparente croissante de l'espèce (protéine libre, complexe, etc.), l'élution se fait à une concentration en sel de plus en plus élevée.

Les points isoélectriques de la streptavidine et l'ARN Polymérase de T7 sont presque identiques (pI = 6.8), mais leur charge totale (ainsi que celle du complexe) est différente. De plus, la notion de point isoélectrique est définie pour l'ensemble de la chaîne protéique (en conditions dénaturantes); sous leur forme repliée, ces deux protéines peuvent avoir des charges de surface légèrement différentes.

Nous montrerons ci-dessous que nous pensons observer parmi l'excès de streptavidine libre, un complexe protéique de poids moléculaire correspondant à T7RNAP:streptavidine, ce qui confirme l'utilité analytique, mais surtout préparative, de la HPLC.

6.3.6 Purification par critère de taille

Nous avons sélectionné la fraction éluée correspondant à la charge de la streptavidine et de l'ARN Polymérase de T7 et opéré une analyse chromatographique par critère de taille. Dans un premier temps, nous avons simplement réalisé un gel de protéines en conditions dénaturantes (se reporter au protocole p. 251) pour évaluer la pré-purification précédente (*cf.* Fig 6.5 p. 115).

Dans le cas de l'ARN Polymérase de T7 sans étape de pré-purification, nous observons deux bandes. L'une correspond à l'ARN polymérase (avec un poids moléculaire voisin de 98 kDa) et l'autre à la protéine *BirA*. Ceci mis à part, ce gel est conforme à celui obtenu lors de la préparation de l'ARN Polymérase de T7. Dans le cas de la streptavidine sans étape de pré-purification, nous observons bien une première bande au voisinage du poids moléculaire théorique (58 kDa). Cependant, nous observons également une série régulière de bandes semblant correspondre à des multiples entiers de cette masse, jusqu'au 5- ou 6-mère.

Ce résultat est particulièrement surprenant : une éventuelle dégradation du complexe de streptavidine aurait pu conduire à des bandes correspondant à des sous-multiples des 58 kDa (Eckart 1995). La faible sensibilité de notre gel ne nous permet pas d'écarter leur

existence, mais leur quantité est bien inférieure à celle des multiples, dont l'existence n'a pas à notre connaissance été précédemment reportée.

Par ailleurs, le marquage proprement dit de l'ARN Polymérase de T7 semble être réalisé, puisque nous observons une bande correspondant à la somme des poids moléculaires de l'ARN Polymérase de T7 et de la streptavidine. En l'état actuel, elle est difficilement séparée des autres produits, puisque le 2-mère de la streptavidine en large excès la masque partiellement. Nous estimons qu'en pré-purifiant par un critère de taille la streptavidine, nous serons capables de produire un complexe T7RNAP:streptavidine facilement séparable des réactifs isolés.

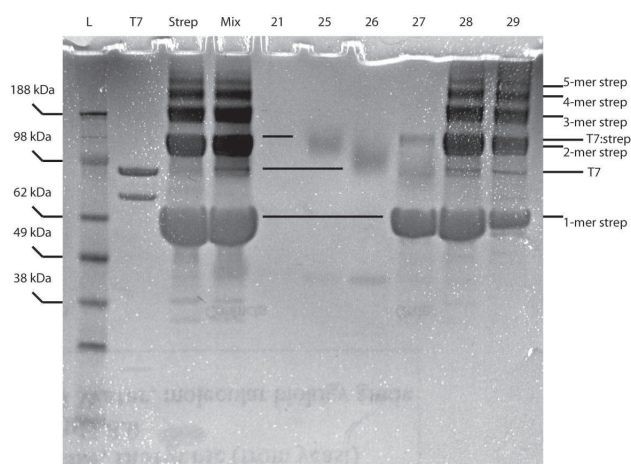


FIG. 6.5: Gel dénaturant du mélange issu du marquage de T7RNAP:biotine par streptavidine:Cy5. Le premier puits représente une échelle de poids moléculaires. Le deuxième et le troisième sont T7RNAP:biotine et streptavidine:Cy5 utilisés pour le marquage. Le quatrième est le mélange 1:10 m:m des deux précédents avant pré-purification. Les puits restants correspondent à différentes fractions issues de l'élution de la colonne MonoQ. Nous identifions des bandes faibles correspondant au complexe RNAP:streptavidine parmi les bandes largement majoritaires des oligomères de streptavidine en excès.

Nous sommes actuellement en train d'installer une colonne de chromatographie préparative par critère de taille («Sephadex», *GE Healthcare*, USA) derrière la colonne par critère de charge, afin non seulement de caractériser exactement le complexe fluorescent, mais également d'isoler la fraction purifiée. Elle nous servira également à préparer un échantillon de streptavidine avec un état oligomérique bien défini.

A titre informatif, nous signalons avoir également essayé d'effectuer une purification en utilisant une membrane de nitrocellulose, de manière analogue à celle exposée en 6.3.4 p. 113. Contrairement à la pré-purification, le complexe T7RNAP:QD est clairement trop volumineux pour passer à travers les pores. Cependant, cette technique ne s'est pas avérée suffisamment discriminante, en particulier vis-à-vis des *Quantum Dots* libres en excès, qui se sont avérés polluer le signal de fluorescence au-delà du raisonnable.

6.4 Conclusion

De manière inattendue, la formation de complexes fluorescents spécifiques par interaction biotine :streptavidine a représenté une grande difficulté pendant ce travail, alors que par ailleurs nous observions facilement des fluorophores uniques. Nous avons mis

un temps important à admettre que les difficultés rencontrées dans les expériences de molécules uniques pouvaient provenir, non pas de contaminations, mais d'un problème lié à la streptavidine.

Ceci réalisé, nous avons entrepris une démarche de purification analytique, puis préparative, afin de caractériser précisément le complexe fluorescent, et surtout de le préparer dans une forme la plus pure possible. Nous avons à cet effet mis en place très récemment (fin 2009) un système de purification par HPLC sur un double critère de charge et de taille.

Il permettra de plus, dans le cas des *Quantum Dots* dont la charge de surface est faible, d'effectuer des purifications plus précises que celles que nous avons réalisées jusqu'à présent.

Les résultats d'analyse de streptavidine commerciale montrent à notre sens que la caractérisation précise de l'interaction biotine:streptavidine dans le cas de molécules uniques est en fait très délicate, et que des précautions très importantes doivent être prises pour caractériser le complexe protéine:fluorophore. Il est possible que la stratégie de marquage par *Quantum Dot* soit intrinsèquement déficiente et qu'un marquage covalent direct, par un fluorophore organique ou par fabrication d'une chimère avec la GFP, doive être envisagé dans ce type d'expériences.

7 Etude de la transcription chez le phage T7

Dans les belles traductions il faut, comme dans les empreintes d'un cachet, quand elles sont fidèles, le relief en creux, le creux en relief

(Joseph Joubert, *Carnets*)

Introduction

Nous rappelons ici le processus de transcription de l'information génétique, ainsi que son importance. Nous présentons ensuite un état de l'art de la transcription chez *Escherichia coli* et un de ses bactériophages, avant d'introduire les questions scientifiques encore en suspens et comment nous nous proposons de répondre à certaines.

7.1 Introduction à la transcription

Une partie importante de l'information génétique héréditaire est contenue dans l'ADN génomique. Cette information, destinée à être transmise le plus fidèlement possible, est continuellement protégée, restaurée, recopiée par des systèmes biologiques qui ne sont pas du ressort de ce travail.

Aussi bien isolée cette information soit-elle, des contenus doivent régulièrement en être extraits : destinés à produire une action adaptée aux contraintes extérieures, ce sont eux qui à un instant donné sont les véritables porteurs de l'information de fonctionnement de la cellule.

7.1.1 Le dogme central de la biologie moléculaire

Formulée par CRICK en 1958 (Crick 1958), l'hypothèse fondamentale de la biologie moléculaire distingue trois classes de porteurs d'information : l'ADN, l'ARN et les protéines. Cette hypothèse propose par ailleurs explicitement une *directionnalité* du flux de l'information génétique de l'ADN vers les ARN puis les protéines, donnant en quelque sorte au premier le rôle de gardien ultime de l'information, aux seconds d'intermédiaires et aux troisièmes de purs effecteurs de l'instruction génétique.

Cette vision à grands traits, sur les limitations de laquelle CRICK est d'ailleurs revenu plus tard (Crick 1970), a été considérablement enrichie depuis une quarantaine d'années. En particulier, la biologie s'est attachée à comprendre les flux de l'information en général, et pas uniquement héréditaire : stimuli extérieurs, état instantané de la cellule, synchronisation, etc.

L'organisation de ces flux fait apparaître des *réseaux* dont les noeuds sont toujours principalement les ADN, ARN et protéines de l'hypothèse de CRICK, mais dont les liens sont des interactions qui peuvent prendre des formes très variées, et surtout dynamiques : activation par phosphorylation, activation/inhibition de la transcription, remodelage de la chromatine, marquage pour dégradation, etc.

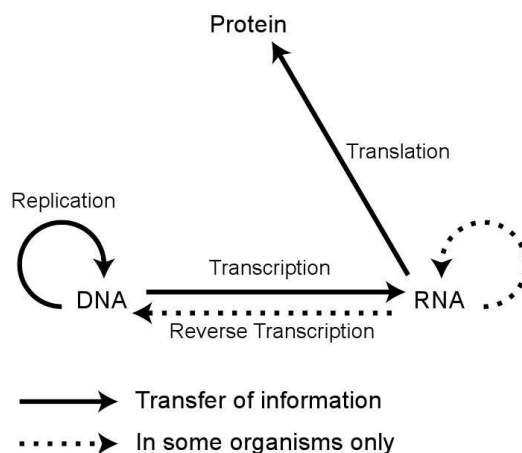


FIG. 7.1: Le dogme central de la biologie moléculaire identifie trois grandes classes de porteurs d'information et précise les flux d'information entre ces classes.

L'étude de ces réseaux en général, ainsi que de la majorité des liens cités plus haut, n'a pas été l'objet de notre travail et nous ne les détaillons donc pas. Nous avons été amenés à nous intéresser plus particulièrement à la manière dont l'information génétique contenue dans l'ADN est «libérée» sous forme d'ARN pour conduire à terme à une réponse protéique de la cellule.

7.1.2 Les formes de transcription

Ce phénomène est appelé *transcription* de l'information génétique dans la mesure où il consiste à écrire une image fidèle de l'information génétique sur un support légèrement différent, éventuellement plus facilement transportable : un Acide RiboNucléique. Ces acides nucléiques, ubiquitaires dans le fonctionnement cellulaire, peuvent prendre une variété de formes pour autant de fonctions : instructions de synthèse de protéines (ARN messagers), interpréteurs du code génétique (ARN de transfert), catalyseurs (par exemple ARN ribosomiaux), régulateurs de la durée de vie des ARN messagers (ARN interférents), constituants intrinsèques de complexes nucléoprotéiques (par exemple les télomérases), *etc.*

Dans tous les cas, ces transcriptions nécessitent d'être coordonnées au fonctionnement général de la cellule et de pouvoir réagir à des réseaux transporteurs d'information. Celle qui nous a concerné pendant ce travail est la transcription de l'information génétique en ARN messager. Conceptuellement moins exotique que les autres formes découvertes plus récemment, elle est le flux d'information ADN→ARN auquel l'hypothèse de CRICK se réfère implicitement.

Hors de tout jugement sur leur valeur respective, la transcription en ARN messagers est en quelque sorte la plus centrale dans la mesure où elle représente le modèle le plus direct de lien entre l'information génétique héréditaire (dans l'ADN) et le fonctionnement courant de la cellule (par les protéines). Par ailleurs, dans une vision peut-être un peu simplificatrice d'une part de la biologie vue par les physiciens et d'autre part de l'enseignement de la biologie, c'est l'unité de base pour comprendre comment le flux d'information génétique s'articule avec les autres flux d'information dans le vivant.

7.1.3 La régulation de la transcription

Depuis en particulier les travaux de JACOB et MONOD sur les opérons (Jacob 1961), s'est développé un modèle minimal de régulation de l'expression d'un gène en fonction d'un *input* d'information. Dans un jeu à trois partenaires — gène, ARN messenger et protéine — assistés d'une machinerie cellulaire, le gène est transcrit en ARN puis traduit en protéine. L'élément essentiel de régulation intervient lorsque l'*input* extérieur change l'état d'une des protéines présentes, qui en retour active ou inhibe la transcription d'un ou plusieurs gènes.

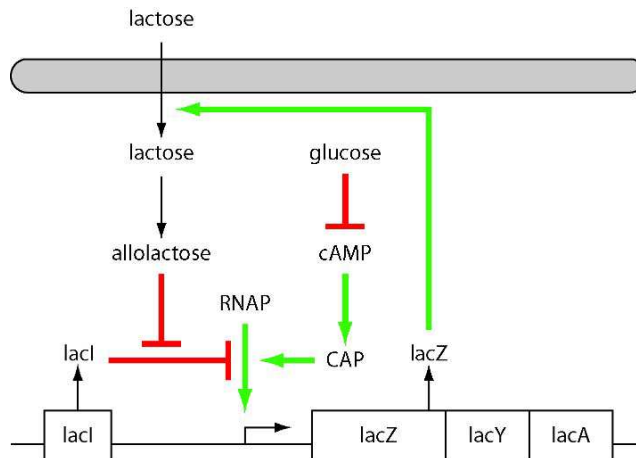


FIG. 7.2: Vue synthétique de la régulation de la transcription des gènes dans l'opéron lactose lacIZYA par le lactose (régulation négative) et le glucose (régulation positive). Les comportements de double inhibition (flèches rouges) conduisent à un comportement bistable.

Du point de vue de la physique, ces modèles presque mécaniques à l'échelle de la *systems biology* ont soulevé beaucoup d'intérêt par leur algébrisation aisée ; ils permettent de montrer l'émergence de processus complexes à partir de règles simples. Du point de vue de la biologie moléculaire, leur étude est également pertinente dans la compréhension des interactions ADN-protéine (par exemple la compréhension de la synthèse des transcrits abortifs).

Par conséquent, parmi les possibilités réalistes qui nous étaient offertes d'études des interactions ADN-protéines, la transcription d'ARN messagers nous a semblé être un sujet suffisamment riche, accessible et potentiellement porteur d'idées nouvelles.

7.2 Les mécanismes de la transcription des ARNm

Ni le but de ce travail, ni les limites de temps, ne nous ont permis d'étudier en détail la transcription et sa régulation. Il s'est agi de mettre en place des outils adaptés à l'étude de ces processus, que nous exposons ici pour les mettre en rapport avec les expériences qui ont été ou pourraient être faites. Nous allons ici rappeler les idées générales sur la transcription prokaryote.

Toutes les ARN polymérases transcrivant des ARN messagers sont des 3' (ribo-nucléotidyl)-transférases ADN-dépendantes. Cela signifie qu'elles nécessitent une matrice d'ADN pour polymériser un ARN dans le sens 5'→3'

Le mécanisme précis de la transcription, quoique légèrement différent dans ses détails, est largement conservé dans ses grandes lignes.

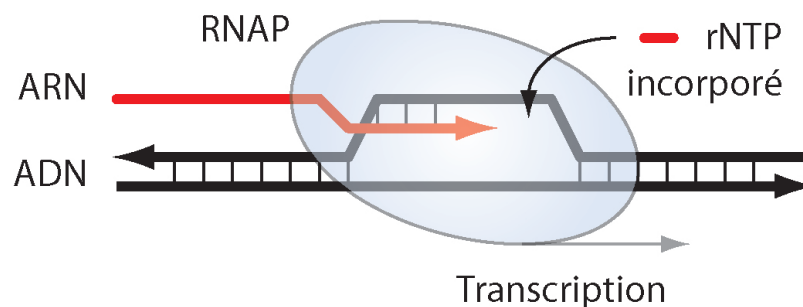


FIG. 7.3: Représentation schématique d'un complexe d'ARN polymérase en transcription sur un ADN double-brin.

7.2.1 Etudes structurales et mécanistiques des ARN polymérases

Les ARN polymérases ont fait l'objet de nombreuses études structurales (*cf.* Tab. 7.1 p. 120). De ce point de vue, bien que non systématiquement reliées structurellement, les ARN polymérases de transcription des ARN messagers possèdent une communauté importante de mécanisme d'action. Les grandes étapes sont exposées en 7.2.2 p. 121.

Organisme	Etat	Refs
T7	initiation	(Cheetham 1999a; Cheetham 1999b)
T7	élongation	(Tahirov 2002; Yin 2004; Datta 2006)
Bactérie	initiation	(Zhang 1999; Vassylyev 2002; Murakami 2002b; Murakami 2002a)
Levure	initiation	(Cramer 2001; Gnatt 2001; Lehmann 2007)

TAB. 7.1: Références pour l'état de l'art des principales observations structurales réalisées sur l'ARN polymérase.

Les études fonctionnelles en molécule unique sur les ARN polymérases ont généralement été menées sur la polymérase bactérienne, dans un dispositif de pinces optiques (*cf.* Tab. 7.2 p. 120), allant jusqu'à mesurer la cinétique d'élongation à l'échelle du pas mécanistique des complexes de l'ARN Polymérase de *Escherichia coli*.

Organisme	Etat	Technique	Refs
T7	transition $\mathbf{RP}_{itc} \rightarrow \mathbf{RP}_e$	FRET	(Tang 2009)
T7	cinétique de \mathbf{RP}_e	OT	(Thomen 2002; Thomen 2005; Thomen 2008)
<i>E. coli</i>	équilibre $\mathbf{RP}_c \rightleftharpoons \mathbf{RP}_o$	MT	(Revyakin 2004)
<i>E. coli</i>	<i>scrunching</i> dans \mathbf{RP}_{itc}	MT	(Revyakin 2006)
<i>E. coli</i>	<i>scrunching</i> dans \mathbf{RP}_{itc}	FRET	(Kapanidis 2006; Tang 2008)
<i>E. coli</i>	<i>step size</i> dans \mathbf{RP}_e	OT	(Abbondanzieri 2005a)
<i>E. coli</i>	cinétique dans \mathbf{RP}_e	OT	(Wang 1998; Abbondanzieri 2005b; Mejia 2008)
<i>E. coli</i>	pauses dans \mathbf{RP}_e	OT	(Davenport 2000; Neuman 2003; Herbert 2006)
Levure	<i>backtracking</i> dans \mathbf{RP}_e	OT	(Galburt 2007; Mejia 2008)

TAB. 7.2: Références pour l'état de l'art des principales observations fonctionnelles en molécule unique réalisées sur les ARN polymérase. OT = *Optical Tweezers*, MT = *Magnetic Tweezers*.

Nous allons présenter les principales caractéristiques fonctionnelles des ARN polymérases bactériennes, puis expliquer l'intérêt pour nous d'étudier la transcription par l'ARN

Polymérase de T7.

7.2.2 Transcription par les ARN polymérases bactériennes

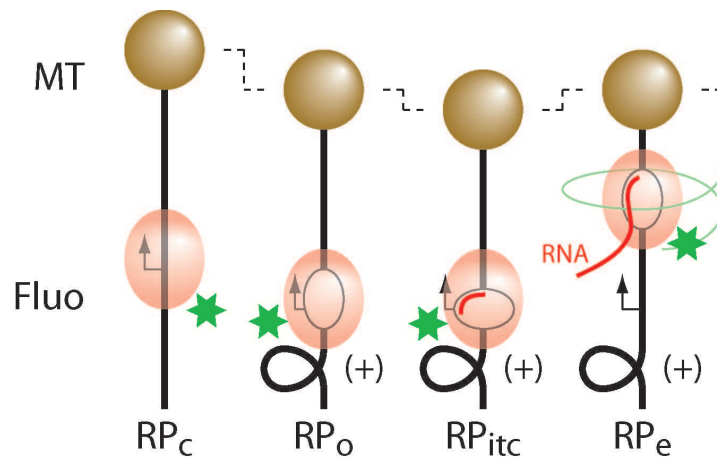


FIG. 7.4: Représentation schématique des états du complexe de l'ARN polymérase avec l'ADN, dans une configuration de pinces magnétiques. L'ADN est figuré en noir, son état de torsion signalé par un (+) et le promoteur indiqué par une flèche ; l'ARN polymérase est représentée marquée par un fluorophore, figuré par une étoile verte. L'évolution des observables entre états est indiquée pour un dispositif de pinces magnétiques (MT) et de microscopie de fluorescence (Fluo).

Initiation

Au contraire d'un certain nombre d'ADN polymérases, les ARN polymérases n'ont pas besoin d'amorce pour initier la polymérisation. Pour éviter que celle-ci soit anarchique, elle suit une séquence d'étapes comprises seulement partiellement et qui constituent l'un des objets de cette étude. Pour une revue, consulter (Young 2002).

L'ARN polymérase de *Escherichia coli* comporte une sous-unité, appelée *facteur* σ , capable d'interagir avec l'ADN par quatre motifs $\sigma_1 - \sigma_4$ relativement bien conservés chez les procaryotes, au moins structurellement. Ces interactions ont spécifiquement lieu avec une région consensus située en amont de la région transcrite, appelée le *promoteur*. La première base transcrite étant numérotée +1, ces régions sont situées vers -35 (reconnue par σ_4) et -10 (reconnue par σ_2).

La sous-unité σ est par ailleurs liée à l'holoenzyme proprement dite comprenant les 5 sous-unités $\alpha\alpha\beta\beta'\omega$. Cette holoenzyme présente des homologies de séquence et de structure très importantes avec l'ARN polymérase II, qui est la polymérase de transcription des ARN messagers chez les eucaryotes.

Formation des complexes d'initiation

L'interaction entre l'ARN polymérase $\alpha\alpha\beta\beta'\omega\sigma$ **R** et le promoteur **P** crée transitoirement un complexe dit *fermé* noté **RP_c**. La constante d'association pour *Escherichia coli* est de l'ordre de 10^7 M^{-1} (Revyakin 2004). Cette complexation n'induit pas de changement conformationnel détectable mécaniquement en pinces magnétiques ; en revanche, il devrait être facile à détecter par colocalisation d'une ARN polymérase marquée avec le promoteur.

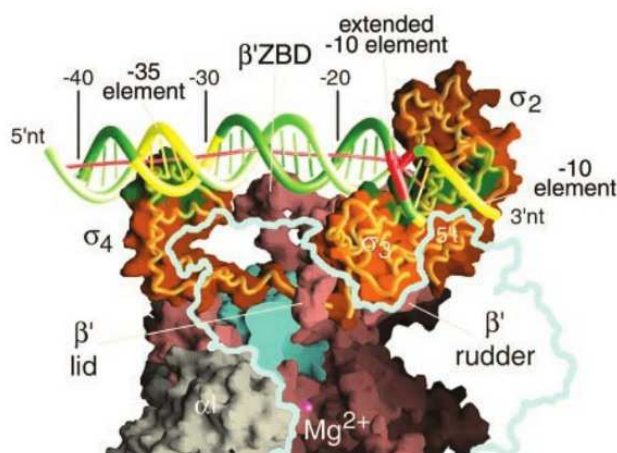


FIG. 7.5: Interaction des sous-unités σ_2 et σ_4 avec le promoteur de la transcription. Figure reproduite de (Murakami 2002a) Fig. 2B

Le complexe fermé peut subir de manière réversible un changement de conformation conduisant à un complexe dit *ouvert* noté \mathbf{RP}_o . La transition $\mathbf{RP}_c \rightarrow \mathbf{RP}_o$ semble être liée à l'éjection de l'hélice $\sigma_{1.1}$ (Murakami 2002b; Murakami 2002a) du site actif. Ce changement se traduit par l'ouverture d'une bulle de dénaturation dans l'ADN dans la région $-12 \rightarrow +5$. Pour *Escherichia coli*, des mesures en pinces magnétiques donnent $k_o = 0.3s^{-1}$, $k_c = 0.03s^{-1}$ et une dénaturation de 13 ± 1 bp (Revyakin 2004).

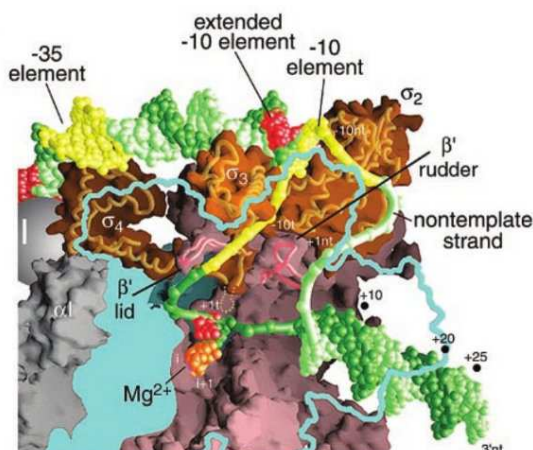


FIG. 7.6: Modèle de la conformation du complexe \mathbf{RP}_o au voisinage de l'élément -10. Figure reproduite de (Murakami 2002a) Fig. 5B

Cette dénaturation introduit $+1.2 \pm 0.1$ tours d'hélice supplémentaires en aval du promoteur. Sur des substrats d'ADN surenroulables, ce changement se traduit par un saut d'environ 65 ± 5 nm dû à la consommation de supertours négatifs ou la formation de supertours positifs selon la situation.

Initiation de la transcription

Le complexe \mathbf{RP}_o est alors compétent pour initier la transcription de l'ADN : le centre actif situé dans la sous-unité β catalyse la production d'oligo-ribonucléotides en suivant le brin matrice. Pendant la progression de β le long de l'ADN, la sous-unité σ reste liée

au promoteur. En particulier, la région σ_3 est complexée à la région -10.

Au-delà d'une certaine longueur de transcrit (typiquement 2-9 nt (Gong 2006)) la tension accumulée dans la bulle de dénaturation est trop forte (cf. Fig 7.6 p. 122) et conduit généralement au décrochage de la sous-unité β pour revenir à une situation \mathbf{RP}_o . Ces transcrits courts sont dits *abortifs* et le complexe d'initiation de la transcription qui les produit est noté \mathbf{RP}_{itc} .

La mécanique du complexe \mathbf{RP}_{itc} a été discutée, mais des expériences de molécules uniques en pinces magnétiques ont montré qu'il procédait par *scrunching*, c'est à dire que l'ADN transcrit était transitoirement extrudé dans la même boucle que la région dénaturée lors de la transition $\mathbf{RP}_c \rightarrow \mathbf{RP}_o$, accumulant ainsi des contraintes à la fois sur la région σ_3 et le centre actif dans la sous-unité β (Revyakin 2006; Kapanidis 2006; Tang 2008).

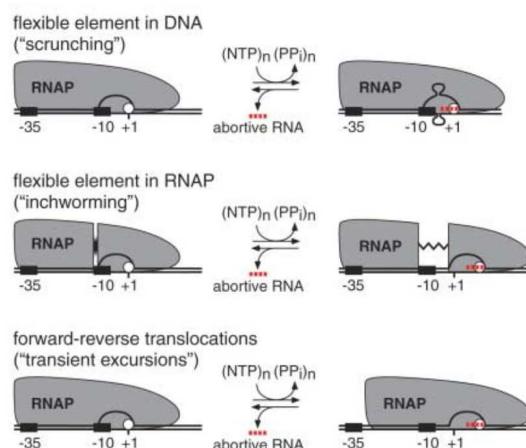


FIG. 7.7: Modèle de la dynamique du complexe \mathbf{RP}_{itc} lors du *scrunching* pendant l'initiation. Figure reproduite de (Revyakin 2006).

Elongation

Le complexe \mathbf{RP}_{itc} réalise un certain nombre de cycles abortifs ; il arrive alors parfois que l'ARN synthétisé arrive à déloger la région $\sigma_{3.2}$ de son complexe avec la région -10 du promoteur. Cela permet de détendre la boucle accumulée par *scrunching* ; la transcription peut alors continuer au-delà des 9 nt. Ces deux processus ont pour effet de finir de déstabiliser complètement l'interaction la sous-unité σ avec l'holoenzyme $\alpha\alpha\beta\beta'\omega$.

L'ARN polymérase, complètement détachée du promoteur, peut alors transcrire l'ADN en ARN virtuellement sans limitation de taille (jusqu'à 3 Mbp chez l'homme par exemple) sous forme d'un complexe dit *d'élongation*, noté \mathbf{RP}_e .

La dynamique d'élongation est constituée d'une alternance de phases de transcription à vitesse constante et de pauses (Wang 1998; Davenport 2000; Forde 2002; Neuman 2003; Herbert 2006). La distribution des vitesses (Abbondanzieri 2005b) et des temps de pause (Mejia 2008) évolue dramatiquement en fonction de la température (cf. Fig 7.8 p. 124).

Dans un dispositif de pinces optiques extrêmement performant, la résolution a pu être poussée jusqu'à la détermination du pas mécanistique de l'ARN Polymérase de *Escherichia coli*, mesuré à 0.37 ± 0.06 nm (Abbondanzieri 2005a).

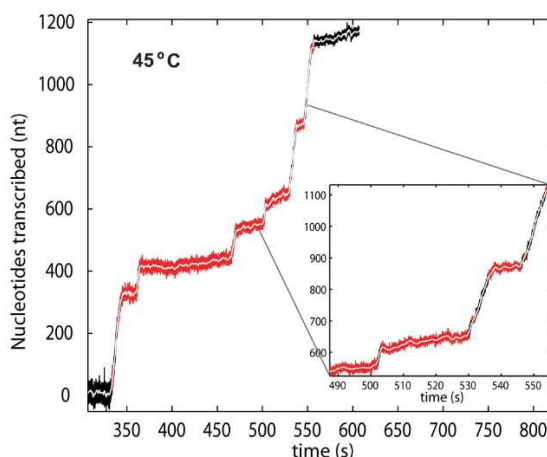


FIG. 7.8: Dynamique d'élongation observée dans un complexe d'ARN Polymérase de *Escherichia coli* à 45°C, pour lequel l'effet des pauses est amplifié. Figure reproduite de (Mejia 2008) Fig. 2D

Terminaison

La présence de tandems palindromiques dans l'ADN peut créer des structures secondaires appelées boucles en épingle à cheveux (*hairpin*). Ces boucles induisent généralement une pause transitoire de l'élongation par le complexe RP_e . Par ailleurs, la stabilité du complexe RP_e est dépendante de la force de l'interaction dans l'hétéroduplex ADN-ARN présent dans la boucle de dénaturation au voisinage du site actif.

Des séquences particulières, appelées *terminateurs*, constituée d'un tandem palindromique de 10 à 20 paires de bases riches en paires G:C et suivie d'une séquence riche en A, cause à la fois la pause de RP_e et la déstabilisation du transcrit vis-à-vis du complexe. Ils engendrent la terminaison de transcription, libérant l'ARN messager et l'holoenzyme.

Des mécanismes sans terminateurs existent également : la protéine *Rho* est capable de se fixer sur le transcrit, puis de le parcourir jusqu'à rencontrer un complexe RP_e , généralement en pause sur un *hairpin*. Cette interaction cause également une terminaison, appelée *Rho-dépendante*, de l'élongation, sous forme d'une éjection du transcrit de la bulle de dénaturation.

Enfin, chez les procaryotes, la vitesse de réplication peut ne pas être négligeable par rapport au taux de transcription. Cela est susceptible de causer des collisions entre ADN polymérase et ARN polymérase. Selon la direction respective des complexes, le sort du complexe de transcription ne semble pas être le même ; des études avec des complexes de réplication du bactériophage T4 reconstitués dans notre laboratoire pourraient un jour être menées en conjonction avec l'étude du complexe de transcription pour répondre à ces questions.

7.2.3 Discussion

Lien avec la transcription chez les eucaryotes

L'holoenzyme $\alpha\alpha\beta\beta'\omega$ est nettement homologue de l'ARN polymérase II qui accomplit la même fonction chez les eucaryotes et les concepts développés par l'étude des mécanismes de la transcription chez *Escherichia coli* y sont transposables.

Cependant, l'ARN polymérase II est une enzyme de taille considérable ; les différentes étapes (interaction avec le promoteur, initiation, élongation, terminaison) font intervenir

un jeu complexe d'interactions protéine-protéine qui est actuellement l'objet d'un effort important de déchiffrement. Bien que le complexe \mathbf{RP}_e soit relativement bien caractérisé (Darzacq 2007), les étapes restent encore mystérieuses. Ainsi, le complexe n'a pas été reconstitué *in vitro* dans des conditions permettant son étude en molécules uniques.

L'étude de la transcription des procaryotes fournit par conséquent un grand nombre d'informations sur les axes de recherche pertinents pour comprendre le phénomène chez les eukaryotes.

Importance de l'initiation abortive

La transition vers \mathbf{RP}_e traduit le passage d'un état lié très dépendant de la séquence d'ADN, *via* le facteur σ mais aussi l'interaction entre le transcrit naissant et l'ADN, à un état processif très peu dépendant de la séquence. Cette transition n'est pas véritablement réversible, puisqu'il faut introduire des mécanismes particuliers de terminaison pour arrêter l'élongation.

A condition que l'interaction σ :ADN ne soit pas limitante, on pourrait donc envisager une chaîne de transitions plus simple $\mathbf{RP}_c \rightarrow \mathbf{RP}_o \rightarrow \mathbf{RP}_e$ où l'ouverture d'une boucle de dénaturation dans \mathbf{RP}_o serait le facteur déclenchant d'une élongation irréversible. C'est finalement le cas d'un grand nombre de moteurs moléculaires à ADN qui se positionnent sur leur site de reconnaissance et entrent ensuite en translocation : enzymes de restriction de type I, primase, ADN polymérases, *etc.*

La différence de l'ARN polymérase avec ces enzymes est que la caractéristique déclenchant la transcription est finalement extrêmement dégénérée : une bulle de dénaturation. Au contraire d'un site d'enzyme de restriction de type I par exemple, cette caractéristique peut se produire presque partout et tout le temps dans le génome ; nos expériences en molécules uniques montrent par exemple clairement la propension des ARN polymérases à venir piéger des bulles de dénaturation ouvertes mécaniquement dans l'ADN (*cf.* Fig 9.8 p. 160).

Pour éviter l'initiation aléatoire d'évènements d'élongation, qui pourraient avoir des conséquences dramatiques au sens où ils ne sont pas régulés, nous partageons le point de vue que l'utilité du complexe \mathbf{RP}_{itc} est d'imposer une relation de *causalité* nécessaire entre la reconnaissance du promoteur par le facteur sigma et l'élongation.

De cette manière, la transition $\mathbf{RP}_{itc} \rightarrow \mathbf{RP}_e$ serait fixée par la balance d'une part de la spécificité apportée par la stabilité du facteur σ avec l'holoenzyme $\alpha\alpha\beta\beta'\omega$ et d'autre part de la pression de synthèse d'ARN (par exemple avec des termes entropiques dépendant de la concentration des rNTP). Le prix payé en termes de transcrits abortifs (11× sur un exemple *in vitro* dans (Murakami 2002b)) est relativement modeste devant la spécificité apportée par ce mécanisme, en regard du nombre considérable de transcrits inutiles qui seraient produits sans lui.

C'est finalement un moyen assez élégant d'utiliser une «machine» unique très efficace, peu spécifique, en lui adjoignant un élément de régulation qui peut prendre des formes très diverses au gré des conditions et des espèces.

Le facteur σ

L'efficacité de la régulation de la transcription chez les procaryotes est à double titre dépendante du facteur σ . D'une part parce que son interaction avec le promoteur conduit à un positionnement spatial le long du génome de l'initiation de la transcription. D'autre part parce que son degré d'interaction avec l'holoenzyme $\alpha\alpha\beta\beta'\omega$ fixe la probabilité de transition vers l'état d'élongation \mathbf{RP}_e .

Le premier cas préfigure une régulation *constitutive* basée sur le promoteur, dans laquelle des promoteurs différents signalent des gènes à exprimer conditionnellement : dans un tissu, à un stade du développement, etc. Cette régulation peut être complétée par des initiateurs de transcription différents qui interagissent avec certaines familles de promoteurs et pas d'autres. Ce type de régulation est en fait déjà présent chez les procaryotes, qui possèdent quelques promoteurs différents associés à des facteurs σ spécifiques : pour *Escherichia coli*, en plus du facteur σ^{70} classique, on trouve par exemple le facteur de *heat shock* σ^{32} , le facteur d'utilisation de l'azote σ^{54} et le facteur des gènes de motilité flagellaire σ^F . Ils sont tous associés à des régions promotrices -35 et -10 différentes.

Le second cas préfigure une régulation *adaptative* de l'expression par interaction protéine-protéine, par des facteurs supplémentaires capables de moduler l'affinité des facteurs σ (ou équivalent) avec tel ou tel promoteur ou avec la polymérase. Des membres d'un réseau de flux d'information peuvent ainsi déclencher l'accrochage de l'ARN polymérase sur un promoteur et réguler l'initiation de l'expression du transcrite, sous l'effet de contraintes extérieures. Ce sont de manière générale les *facteurs de transcription eucaryotes*. Des exemples simples sont la transcription sensible aux oestrogènes, ou l'opéron lactose.

Conclusion

Le système de transcription procaryote porte ainsi en lui les concepts fondamentaux pour comprendre la régulation de l'expression génétique chez les eucaryotes : la reconnaissance d'un promoteur de la transcription sur l'ADN, l'ouverture d'une boucle de dénaturation, l'interaction de la polymérase avec un facteur de transcription qui décide si le complexe entre en phase d'élongation, et enfin la terminaison conditionnelle de la transcription.

Considérablement plus simple à reconstituer que le complexe de transcription eucaryote puisque ne nécessitant qu'un seul facteur de transcription, et possédant des promoteurs bien identifiés, il est en général préféré dans des expériences en molécules uniques (Mejia 2008).

7.3 La transcription chez le bactériophage T7

7.3.1 Le bactériophage T7 et son ARN polymérase

Le bactériophage T7 est un virus infectant les enterobactéries, comme par exemple la plupart des souches de *Escherichia coli*. Dans une capsid d'environ 55 nm de diamètre est contenu son génome, sous forme d'ADN double brin, d'une longueur d'environ 38 kbp. Il contient 25 gènes répartis en trois classes selon leur séquence temporelle d'expression. Par reconnaissance sur la paroi bactérienne d'un récepteur spécifique, la queue du bactériophage est capable de s'y accrocher. Cette reconnaissance déclenche l'injection du génome viral depuis la capsid à travers la queue (25 nm) dans la bactérie.

Les 5 gènes du groupe I sont exprimés par l'ARN polymérase bactérienne ; ils engendrent en particulier l'arrêt de la transcription des gènes de l'hôte. Par ailleurs, l'un d'entre eux code pour l'ARN Polymérase de T7 qui va servir à transcrire le génome viral. Les 7 gènes du groupe II, codant pour les enzymes de réplication de l'ADN (en particulier l'ADN polymérase) et des éléments structuraux de la capsid sont ensuite exprimés et la réplication du génome viral commence.

Pendant la réplication l'expression des gènes du groupe III (essentiellement de la capsid et de l'enveloppe) a lieu et des pseudo-particules virales commencent à se former dans le cytoplasme par auto-assemblage de la capsid et du génome viral. Après les dernières

étapes de maturation pour obtenir un virus entier, une centaines de copies sont expulsées de la cellule lors de sa lyse provoquée par le virus.

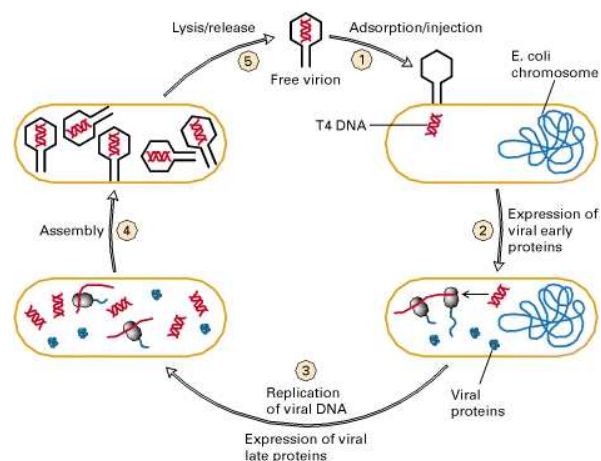


FIG. 7.9: Cycle d'infection d'une enterobactérie par un bactériophage (T4 est donné ici comme analogue de T7). Figure reproduite de (Lodish 2000) Fig. 6-16.

L'ARN Polymérase de T7 est codée par un unique gène viral ; contrairement à l'ARN polymérase procaryote, elle est constituée d'une unique sous-unité de 883 acides aminés pour une masse moléculaire totale de 99 kDa. En particulier, il n'y a pas de distinction topologique entre l'équivalent du facteur σ et la sous-unité catalytique β .

Structurellement, le domaine ARN polymérase de l'ARN Polymérase de T7 est homologue de l'ARN polymérase γ eucaryote impliquée dans la transcription des gènes mitochondriaux, la DNA Pol I procaryote de réparation et de nettoyage des fragments d'OKAZAKI, ainsi qu'aux *reverse transcriptases*. Elle est également étroitement liée aux ARN polymérases des bactériophages T3, SP6 et K11. Par contre, il n'y a pas de parenté particulière avec les ARN polymérases à plusieurs sous-unités comme celle de *Escherichia coli*.

7.3.2 Transcription par l'ARN Polymérase de T7

Malgré cet éloignement structurel, les étapes de la transcription sont très conservées entre l'ARN Polymérase de T7 et l'ARN polymérase procaryote.

L'ARN Polymérase de T7 interagit avec un promoteur spécifique : 5'-TA ATA CGA CTC ACT ATA GG-3'; l'avant-dernier G est la première base transcrite. Ce promoteur est assez proche des éléments -10 des promoteurs eucaryotes et possède une grande affinité pour la polymérase (McAllister 1993), de l'ordre de 10^{-8} M (Kochetkov 1998; Chen 2000). L'interaction est réalisée par une boucle en épingle à cheveux reconnaissant le sillon majeur de l'ADN, ainsi que par une boucle pour le sillon mineur. Le domaine N-terminal de reconnaissance du promoteur (environ 300 a.a.) n'est pas commun aux autres polymérases.

L'ARN Polymérase de T7, complexée à l'ADN sous forme RP_c subit ensuite une transition vers l'état ouvert RP_o dans laquelle elle dénature une bulle d'ADN d'environ 10 bp, soit une taille comparable à celle de l'ARN polymérase de *Escherichia coli*. Le complexe peut alors commencer à incorporer des nucléotides et produire un court transcrite (3-4 nt) dans la poche du centre actif (*cf.* Fig 7.10 p. 128).

Il subsiste une controverse sur la taille du transcrite que l'ARN Polymérase de T7 peut structurellement emmagasiner (Severinov 2001) : les études structurales indiquent

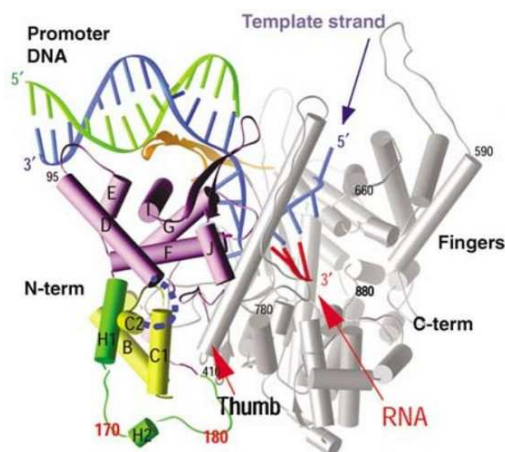


FIG. 7.10: Reconnaissance de son promoteur par l'ARN Polymérase de T7 (attention, l'état figuré ici est \mathbf{RP}_{itc}). Le domaine N-terminal de reconnaissance est figuré en mauve. Figure reproduite de l'article de revue (Steitz 2006) Fig. 1A

une taille de poche pouvant accommoder 4-5 nt de transcrit, alors que l'étude des produits d'initiation abortive montre des transcrits jusqu'à 8 nt. En tout état de cause, le complexe \mathbf{RP}_{itc} peut subir un réarrangement de grande envergure du domaine N-terminal (*cf.* Fig 7.11 p. 128) pendant lequel d'une part le domaine de liaison au promoteur (en mauve) se détache de l'ADN, et d'autre part un sous-domaine d'hélices (vert) change de conformation et vient séparer le brin codant de l'hétéroduplex transcrit:brin matrice en formant l'équivalent d'un *clamp*.

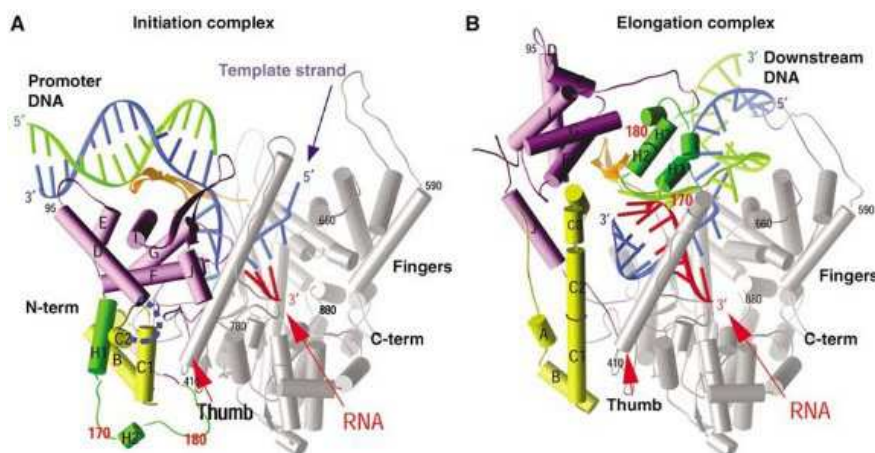


FIG. 7.11: Transition $\mathbf{RP}_{itc} \rightarrow \mathbf{RP}_e$. Le domaine N-terminal de reconnaissance du promoteur est figuré en mauve. Le *clamp* est figuré en jaune. Figure reproduite de l'article de revue (Steitz 2006) Fig. 1A et 1B.

Ce changement de configuration remarquable est également très bien visualisé sur un modèle stérique (*cf.* Fig 7.12 p. 129). En plus de la stabilisation du duplex ARN:ADN, il s'accompagne de la formation d'un canal par lequel le transcrit quitte la protéine et qui joue en quelque sorte le double rôle de séparer le duplex ARN:ADN après 10 nt et permettre la réhybridation ultérieure des deux brins d'ADN.

La structure locale de la bulle de dénaturation et du duplex ARN:ADN est relativement logique : l'ARN Polymérase de T7 dégrafe la double hélice juste en amont de la dernière

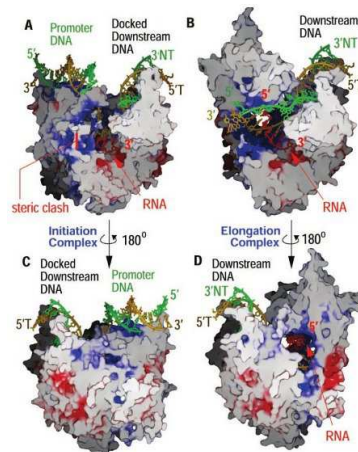


FIG. 7.12: Transition $\mathbf{RP}_{itc} \rightarrow \mathbf{RP}_e$. En plus des caractéristiques observées sur la figure 7.11, on peut observer l'ouverture du canal du transcrit. Figure reproduite de (Yin 2002) Fig. 4.

base transcrite; le transcrit forme un hétéroduplex avec le brin matrice sur 10-11 nt puis est dirigé vers son canal de transport. Le brin matrice rejoint ensuite le brin codant immédiatement derrière la boucle Val 237.

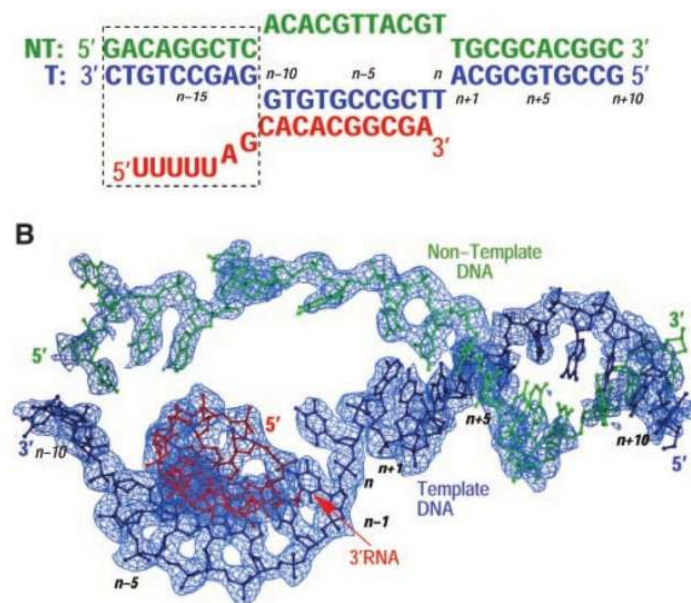


FIG. 7.13: Structure de la bulle de dénaturation dans le complexe \mathbf{RP}_e . Figure reproduite de (Yin 2002) Fig. 1.

En phase d'élongation, la transcription se fait à une vitesse particulièrement élevée, de l'ordre de $200 \text{ bp}\cdot\text{s}^{-1}$. De manière identique à la situation chez les procaryotes, la présence du *clamp* et du canal du transcrit assurent une stabilité importante au complexe ADN :ARN.

7.3.3 Un modèle pour la transcription

Bien que présentant des différences importantes en terme de séquence, les ARN polymérase virales, bactériennes et eucaryotes présentent une importante homologie de structure et de mode de fonctionnement.

Les grandes étapes de la transcription, depuis la reconnaissance du promoteur jusqu'à la terminaison obéissent à des mécanismes conceptuellement semblables qui permettent d'utiliser des modèles établis sur un système pour analyser les comportement des autres.

La petite taille, la faible complexité structurale de l'ARN Polymérase de T7, la spécificité de son promoteur, en font un système modèle pour des expériences de molécules uniques *in vitro*, nécessitant des conditions les plus minimales possibles et une grande spécificité.

Certes, le passage à l'ARN polymérase procaryote puis eucaryote apporte des éléments de régulation extrêmement précieux pour comprendre la richesse de l'expression génétique. Cependant, l'ARN Polymérase de T7 fournit les bases de la compréhension du mécanisme de transcription lui-même, qui sont très précieuses pour pouvoir être utilisées dans des modèles plus complexes intégrant la régulation.

7.4 Conclusion

C'est donc l'ARN Polymérase de T7 que nous avons choisi d'utiliser dans ce travail. Ce choix a été conforté par la présence dans notre environnement de groupes possédant l'expérience de la préparation (P. LOPEZ, ENS Biologie, Paris) et l'utilisation en molécule unique (F. HESLOT, ENS Physique, Paris, utilisant la biotine pour accrocher la protéine à une surface) de l'ARN Polymérase de T7 possédant une modification permettant son marquage par des fluorophores (Thomen 2005; Thomen 2008).

Nous proposons d'utiliser une ARN Polymérase de T7 marquée avec un fluorophore dans un appareil combiné de pinces magnétiques et de microscopie de fluorescence, dans deux expériences-clé qui n'auraient pas pu être menées avec seulement l'une ou l'autre des techniques (*cf.* Fig 7.4 p. 121). A l'aide du dispositif de pinces magnétiques, nous disposons d'un échantillon dans lequel chaque bille magnétique permet de repérer un ADN porteur d'un promoteur de la polymérase. De plus, des contraintes de tension et de torsion peuvent être exercées sur cet ADN.

Dans la première expérience, nous proposons d'observer la dynamique de formation du complexe \mathbf{RP}_c à partir de l'ARN polymérase libre. En effet, cette formation ne s'accompagne pas dans les expériences de molécule unique d'un changement d'extension de l'ADN, et n'est donc pas détectable. En étudiant la colocalisation de la fluorescence avec la position connue de l'ADN, nous espérons pouvoir mesurer les paramètres thermodynamiques, et éventuellement cinétiques, de l'interaction de l'ARN Polymérase de T7 avec son promoteur (k_{on} , k_{off} , K_d , coefficient de diffusion 1D, *etc.*).

Dans la seconde expérience, nous nous proposons de mesurer les propriétés du complexe \mathbf{RP}_e , éventuellement jusqu'à la résolution du pas mécanistique. Lors de l'élongation, les propriétés topologiques de l'ADN ne sont pas modifiées et dans un dispositif de pinces magnétiques classique, aucun évènement n'est observé. Toutefois, l'utilisation de pinces magnétiques présente un avantage sur les pinces optiques (déjà utilisées pour étudier l'ARN Polymérase de *Escherichia coli*), puisqu'elles permettent plus aisément l'imposition d'un couple, la parallélisation des expériences, et l'utilisation plus aisée en conjonction de techniques de fluorescence.

Nous proposons ainsi, comme présenté dans la figure 7.4, d'utiliser la rotation de l'ARN polymérase dans la phase d'élongation pour repérer indirectement son avancée le long de

l'ADN (cf. Fig 7.14 p. 131). Pour un fluorophore situé à $R = 10$ nm (taille typique d'un *Quantum Dot*) de l'axe hélical de l'ADN, une résolution de la paire de bases pourrait être atteinte avec une précision de pointé dans le plan (x, y) de l'ordre de $\sigma = 7$ nm.

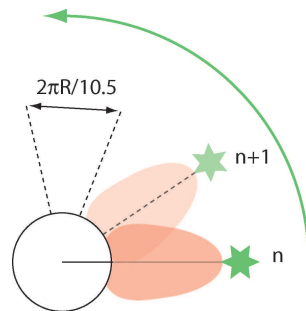


FIG. 7.14: Résolution sur le positionnement du fluorophore nécessaire à l'observation d'un déplacement correspondant à une paire de bases le long de l'ADN.

8 Caractérisation de l'activité de l'ARN polymérase

Introduction

Dans la définition des paramètres expérimentaux en manipulation de molécules uniques, on ne peut pas faire l'économie d'une étude des propriétés de la protéine moyennées sur un ensemble. En plus des éléments déjà décrits dans le chapitre 7, il est intéressant de caractériser en volume l'activité de notre système dans des conditions proches des expériences en molécule unique.

Pour étudier le système modèle de la transcription (le bactériophage T7 chez *Escherichia coli*) dans des conditions expérimentales compatibles avec notre système, il est nécessaire réduire la majorité des degrés de liberté, et à en introduire quelques uns.

Nous avons choisi de les réduire à ceux qui sont le plus caractéristiques à cette échelle de description moléculaires : la concentration des cofacteurs, la température, la variation temporelle de l'activité, la distribution de l'activité entre protéines *a priori* identiques. Par contre, nous nous sommes abstenus de faire interagir l'ARN polymérase avec d'autres protéines.

8.1 Influence de la biotinylation sur l'activité

Pour pouvoir suivre par marquage l'ARN polymérase, nous avons obtenu par une collaboration avec l'équipe de Pascal LOPEZ l'ARN Polymérase de T7 fusionnée avec un *tag* oligopeptidique terminal portant une biotine (Thomen 2002). Par comparaison avec la souche sauvage, l'adjonction du *tag* est susceptible de modifier l'activité de l'ARN polymérase par rapport à la souche sauvage ou à la situation précédemment caractérisée (Thomen 2008).

8.1.1 Principe de l'expérience

Pour tester cela, nous avons comparé la transcription du gène codant pour la chimère *lacZ-GFP* sous le contrôle du promoteur T7 (p. 127). Le gène est présent sous la forme d'une séquence de 803 paires de bases dans un plasmide de 6707 paires de bases linéarisé par restriction à un site *HindIII* unique situé 5745 paires de bases en amont du promoteur.

La souche considérée comme «sauvage» est l'ARN Polymérase de T7 distribuée commercialement par Fermentas, de masse molaire 98 kDa. Son activité est testée soit dans le tampon commercial soit dans le tampon de transcription (p. 283) décrit dans (Thomen 2008).

La présence de transcrit est testée par électrophorèse sur gel d'agarose (p. 243) en présence d'un inhibiteur de RNAses après incubation en présence de DNase I.

8.1.2 Résultats

Le résultat montre la présence d'un transcrit de la taille attendue, indiquant que l'ARN Polymérase de T7 modifiée est parfaitement capable de transcrire le gène dans les deux

Réactif	Concentration		Quantité (μL)			
	Initiale	Finale	1	2	3	4
Tampon commercial	«5×»	«1×»	10	10	-	-
Tampon de transcription	«10×»	«1×»	-	-	5	5
rATP+rCTP+rGTP+rUTP (chaque)	100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	1	1	1	1
RiboLock			1,25	1,25	1,25	1,25
ADN digéré		250 ng	9	9	9	9
T7RNAP sauvage	12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	360 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	1,5	-	1,5	-
RNAP biotinylée	20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	400 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	-	1	-	1
Eau traitée DEPC			24,5	25	29,5	30
Total			50	50	50	50
2h @ 37°C						
<i>DNase I</i>		1u/ μL				
15' @ 37°C						

TAB. 8.1: Composition des différents essais pour l'étude de l'activité *in vitro* de l'ARN Polymérase de T7.

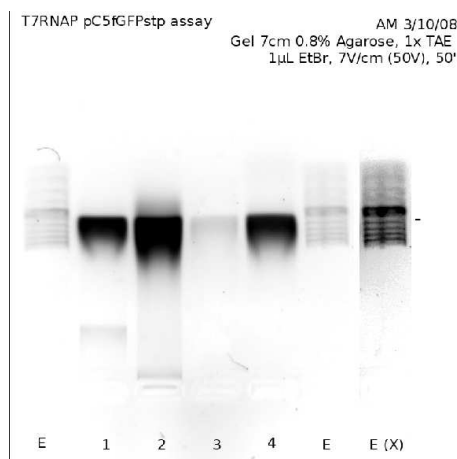


FIG. 8.1: Gel d'électrophorèse montrant la transcription par l'ARN Polymérase de T7. Après réaction, 10 μL de volume réactionnel et 2 μL de tampon de charge sont introduits dans chaque puits. La référence est assurée par 1 μL (100 ng) d'échelle de poids moléculaire d'ADN. Le tiret indique la bande de migration à 800 nucléotides. La bande notée **E (X)** est l'échelle de poids moléculaire présentée dédoublée avec un contraste amplifié.

tampons (*cf.* Fig 8.1 p. 134). La faible activité de la polymérase sauvage dans le tampon de transcription non-commercial (puits **3**) est un artefact isolé.

En admettant que les bandes du transcrit les plus saturées représentent dix fois en masse la quantité d'échelle de poids moléculaire (soit au total 1 μg), cela conduit à un taux de production molaire d'ARN (par rapport à l'ADN de départ)

$$\tau = \frac{n_{ARN}}{n_{ADN}} = \frac{m_{ARN}}{m_{ADN}} \cdot \frac{M_{1bp,ADN}}{M_{1nt,ARN}} \cdot \frac{L_{ADN}}{L_{ARN}} \quad (8.1)$$

$$= \frac{1000}{250} \cdot 2 \cdot \frac{6700}{800} \quad (8.2)$$

$$\sim 20 \quad (8.3)$$

Ramené à une vitesse de transcription, la polymérisation de l'ARN interviendrait à

$$v_{pol} \sim \frac{20 \times 800nt}{45 \times 60s} = 2 \text{ nt/s} \quad (8.4)$$

Ce chiffre est considérablement plus petit que la vitesse de référence de l'ARN Polymérase de T7, de l'ordre de 100-200 nt/s (Thomen 2008) et montre qu'une approche de mesure quantitative en volume n'est pas toujours pertinente. Par ailleurs, les nucléotides ne sont pas le réactif limitant. En admettant que l'ARN transcrit est un mélange statistique A,U,G,C la quantité maximale d'ARN polymérisable est de l'ordre de $4 \times 10^{-6} L \times 10^{-1} mol \cdot L^{-1} = 4 \cdot 10^{-7} mol$. Cela correspond à un rendement en ARN de l'ordre de

$$\rho = \frac{n_{ARN}}{n_{ARN,max}} \quad (8.5)$$

$$\sim \frac{100 \cdot 10^{-9}g}{325g \cdot mol^{-1}} \times \frac{1}{4 \times 10^{-6}L \times 10^{-1}mol \cdot L^{-1}} \quad (8.6)$$

$$\sim 10^{-3} \quad (8.7)$$

La lecture de la quantité d'ARN sur le gel est sujette à caution. En raison de la saturation de l'image, une sous-estimation d'un facteur 2-4 dans la quantité de matière est encore envisageable. Cela porterait tout de même la vitesse et le rendement à plus d'un ordre de grandeur en-dessous de la valeur attendue.

8.1.3 Analyse

Plusieurs facteurs peuvent expliquer ce hiatus :

- l'intensité de fluorescence dans le gel est une image trompeuse de la quantité de matière
- l'ARN produit s'est partiellement dégradé
- une partie des molécules d'ADN n'est pas susceptible d'être transcrite
- une partie des molécules d'ARN polymérase n'est pas fonctionnelle

Linéarité de la fluorescence

L'idéal aurait été de mesurer directement la concentration en ARN par son absorbance à 260 nm en utilisant un NANODROP. Le problème est que les nucléotides libres apportent une contribution telle à l'absorbance que l'ARN polymérisé n'est pas observable. Une filtration sur colonne de sépharose ne nous a pas permis d'améliorer suffisamment le rapport signal-sur-bruit pour obtenir une mesure correcte. La mesure sur gel reste nettement plus facile à réaliser sans nécessiter le développement d'un protocole spécifique.

Il est possible que le rapport des intensités de fluorescence de l'ADN ou de l'ARN dans ce gel ne soit pas égal au rapport des quantités de matière. En d'autres termes, la brillance [1] des complexes entre acides nucléiques et bromure d'ethidium pourrait dépendre de la concentration.

Cependant, la quantité de bromure d'ethidium ($1 \mu L$ à $25 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ soit 25 nmol) est nettement supérieure à la quantité maximale d'acides nucléiques ($1,6 \text{ nmol}$ de rNTP par puits) et n'est donc pas limitante. Nous avons par conséquent mesuré l'intensité de fluorescence de complexes en concentration saturante de bromure d'ethidium et il ne devrait pas y avoir de dépendance notable de la brillance en fonction de la concentration.

¹Le nombre de photons de fluorescence émis par photon d'excitation envoyé. C'est le produit du coefficient d'extinction molaire et du rendement quantique de fluorescence.

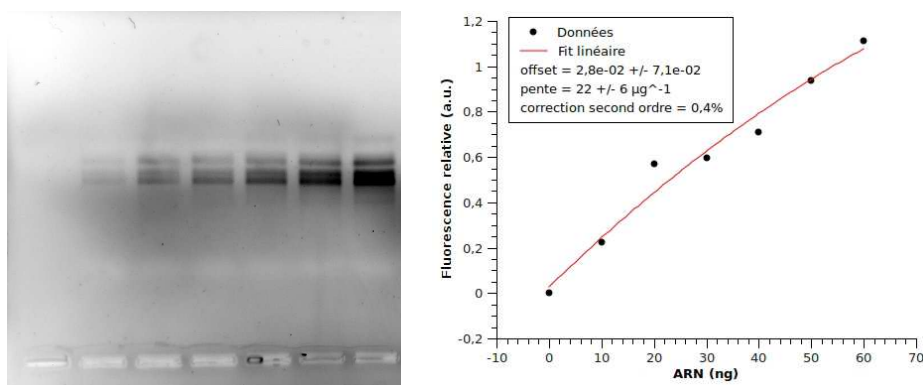


FIG. 8.2: Linéarité de la mesure de la quantité d'ARN : quantification de la fluorescence de complexes de l'ARN avec le bromure d'éthidium. [G] Gel d'agarose (0.8%, TAE, 5 cm, 0.5 μ L EtBr, 100V, 20') d'une série de quantités croissantes d'échelle de poids moléculaire d'ARN de 0 à 60 ng. [D] Données de fluorescence et analyse.

Dans la gamme de quantités d'ARN considérées, la fluorescence des complexes est bien une fonction linéaire de la quantité d'ARN. Par conséquent, la brillance est constante dans les conditions expérimentales que nous utilisons. Nous pensons donc que cette mesure de fluorescence est une image fiable de la quantité de transcrit produit.

Dégradation de l'ARN

La présence d'un groupement hydroxyle sur le carbone 2' du ribose rend les ARN très sensibles à la dégradation. De plus, une quantité de RNAses est excrétée sur la peau, contaminant notablement tout objet en contact avec elle. Nous avons travaillé en conformité avec les bonnes pratiques de laboratoire relatives à la manipulation d'ARN : espace de travail et matériel traité avec un cocktail d'inhibiteurs de nucléases, tubes et cônes réservés à la manipulation d'ARN, réactifs spécifiques. En l'absence d'une quantification directe de l'ARN par absorbance, nous ne pouvons faire mieux que supposer que la qualité de ces manipulations a préservé l'essentiel de l'ARN transcrit.

Par ailleurs, le traitement à la *DNAse I* et l'opération d'électrophorèse représentent des étapes pour lesquelles le comportement de l'ARN est peu maîtrisé. La comparaison des gels d'électrophorèse avec et sans traitement postérieur à la *DNAse I*, ainsi que de gels coulés en présence ou en l'absence de bromure d'éthidium (données non présentées) montre que ces paramètres n'ont pas d'influence sur la quantité d'ARN totale ni sur les proportions relatives des différents transcrits.

Dégradation de l'ADN

L'ADN matrice utilisé pour la transcription a été purifié après digestion sur colonne de sépharose pour le débarrasser de l'enzyme de restriction et du tampon de réaction. Nous l'avons quantifié en utilisant un NANODROP par mesure de l'absorbance à 260 nm. Le quotient des absorbances à 260 et 280 nm a été mesuré à 1,97 pour cet échantillon.

Le quotient théorique des coefficients d'absorption massiques est connu et vaut $\epsilon(260)/\epsilon(280) = 2.0$ pour les acides nucléiques (AN) et $\epsilon(260)/\epsilon(280) = 0.57$ pour les protéines (P). Nous savons de plus que $\epsilon_{NA}(280)/\epsilon_P(280) = 10$. En supposant que les protéines sont les seuls contaminants absorbant à ces longueurs d'onde, on a

$$\begin{cases} A(260) &= \epsilon_{AN}(260) \cdot m_{AN} + \epsilon_P(260) \cdot m_P \\ A(280) &= \epsilon_{AN}(280) \cdot m_{AN} + \epsilon_P(280) \cdot m_P \end{cases} \quad (8.8)$$

Ce système à deux inconnues conduit facilement au quotient

$$\frac{m_{AN}}{m_P} = \frac{\epsilon_P(280) \cdot A(260) - \epsilon_P(260) \cdot A(280)}{-\epsilon_{AN}(280) \cdot A(260) + \epsilon_{AN}(260) \cdot A(280)} \quad (8.9)$$

$$= -\frac{\epsilon_P(280)}{\epsilon_{AN}(280)} \cdot \frac{\frac{A(260)}{A(280)} - \frac{\epsilon_P(260)}{\epsilon_P(280)}}{\frac{A(260)}{A(280)} - \frac{\epsilon_{AN}(260)}{\epsilon_{AN}(280)}} \quad (8.10)$$

$$= -10 \frac{1.97 - 0.57}{1.97 - 2.0} \sim 500 \quad (8.11)$$

La contamination protéique (des protéines auraient pu séquestrer l'ADN par exemple) est donc négligeable. Malgré tout, cette donnée ne nous permet pas de faire la différence entre un ADN intègre et un ADN fragmenté puisqu'il ne donne pas d'information sur la masse molaire des acides nucléiques. Nous pouvons obtenir indirectement cette information par électrophorèse sur gel d'agarose. Ce gel montre un unique fragment obtenu après restriction, de taille 7.0 ± 0.5 kbp. Aucun fragment de taille supérieure à 50 bp n'est par ailleurs détectable (*cf.* Fig 8.3 p. 137). Nous en concluons que la qualité de l'ADN utilisé est satisfaisante.

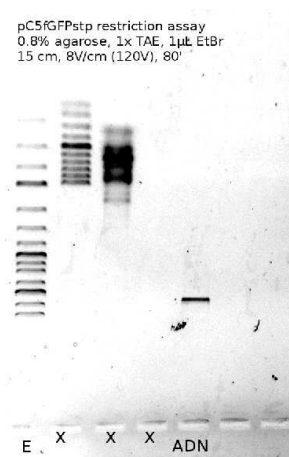


FIG. 8.3: Gel d'électrophorèse montrant 100 ng du produit de restriction du plasmide pC5fGFPstp par *HindIII*, utilisé dans certaines expériences en molécule unique. Après réaction, 10 μL de volume réactionnel et 2 μL de tampon de charge sont introduits dans le puits **ADN**. La référence est assurée par 1 μL (100 ng) d'échelle de poids moléculaire d'ADN dans le puits **E**. Les puits notés **X** correspondent à des échelles utilisées pour d'autres puits du gel (données non présentées ici).

Nous ne pouvons pas dans l'absolu exclure une dégradation sous forme d'oligonucléotides ou de nucléotides. Une quantification par absorbance à 260 nm des acides nucléiques non retenus par une colonne de sépharose pourrait éventuellement permettre de trancher définitivement ; cependant, la contribution de cette contamination est très certainement négligeable par rapport à la quantité d'ADN intact. Nous ne l'avons donc pas réalisée.

Polymérase non fonctionnelles

Nous nous sommes assurés de l'intégrité des réactifs (tampons, nucléotides, etc.) utilisés. Par absorption à 280 nm, nous avons déterminé l'absorbance des solutions de protéine commerciale et biotinylée qui ont été utilisées. Par simulation avec le programme

ExpASy (www.expasy.ch), la séquence de la protéine conduit à des coefficients d'extinction molaire identiques aux incertitudes près : $\epsilon_{RNAP}(280) = 1.4 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. L'utilisation de la loi de BEER-LAMBERT conduit immédiatement aux concentrations indiquées par exemple dans le tableau 8.1.

Ces solutions de protéines sont issues de purifications dont nous estimons qu'elles sont de raisonnablement bonne qualité (voir par exemple gel dénaturant de l'ARN Polymérase de T7 biotinylée). La contribution d'autres espèces que l'ARN Polymérase de T7 à l'absorption à 280 nm peut donc être négligée.

Cependant, rien n'assure que parmi ces ARN polymérases, toutes sont fonctionnelles. Une petite fraction pourrait à chaque instant être pleinement fonctionnelle, mais en moyenne la vitesse de transcription serait faible. Le résultat mitigé du test de transcription (p. 134) montre finalement qu'il ne permet que d'estimer la quantité totale d'ARN transcrit, mais n'est pas un moyen efficace d'évaluer la vitesse de transcription de l'ARN polymérase ni de discriminer les enzymes actives de celles inactives.

8.2 Eléments de cinétique

8.2.1 Principe de l'expérience

Le substrat d'ADN utilisé est le même que précédemment. Pour établir une cinétique de production d'ARN, nous avons préparé une série de tubes réactionnels possédant l'ensemble de réactifs, excepté l'ARN polymérase, préincubés à la température souhaitée (ici 37°C).

A intervalles réguliers, nous avons ajouté l'ARN Polymérase de T7 dans un des tubes de manière à synchroniser la fin des réactions de toute la série au même temps. La réaction est alors arrêtée par chauffage à 70°C pendant 10 minutes. Un contrôle avec un temps d'incubation nul et un autre sans polymérase ont également été préparés.

Afin de quantifier la transcription d'ARN à partir de la mesure de l'intensité de fluorescence, nous avons introduit une quantité connue d'ARN sous forme d'échelle de poids moléculaire. Elle permet d'exprimer des vitesses en unités ayant du sens physique.

Réactif	Concentration		Quantité (μL)		
	Initiale	Finale	1	2-10	11
Tampon commercial	«5×»	«1×»	2	2	2
rNTP (chaque)	80 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	0,25	0,25	0,25
RiboLock			0,50	0,50	0,50
ADN digéré		100 ng	1,10	1,10	1,10
T7RNAP sauvage	12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	400 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	-	0,35	-
Eau traitée DEPC			6,15	5,80	6,15
Total			10	10	10
Incubation (min)		@ 37°C	0	0-60	60
10' @ 70°C					

TAB. 8.2: Composition des différents essais pour l'étude de la cinétique de transcription *in vitro* de l'ARN Polymérase de T7 à 37°C. Les temps de transcription utilisés sont 0, 3, 6, 9, 12, 15, 30, 45 et 60 minutes.

8.2.2 Attribution des bandes

L'analyse du gel du produit de la réaction de transcription montre la présence de quatre bandes principales (*cf.* Fig 8.4 p. 139). Une seule est un ADN puisqu'elle est spécifiquement dégradée par la *DNAse I* (données non présentées). Les trois autres sont de l'ARN.

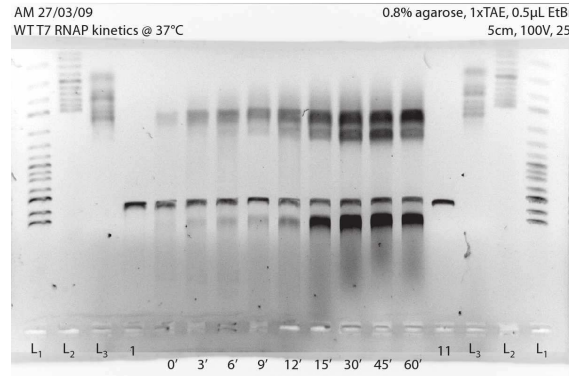


FIG. 8.4: Gel d'électrophorèse montrant la cinétique de production d'ARN par l'ARN Polymérase de T7 à 37°C. Les marqueurs de poids moléculaire sont notés L_1 (ADN 250-10000 bp, 200 ng) L_2 (ADN 100-1000 bp, 200 ng) et L_3 (ARN 100-1000 nt, 500 ng).

La bande de migration la plus lente est un ARN isotache d'un ADN double brin d'environ 10 kbp (nous ne disposons pas de marqueurs d'ARN de poids moléculaire aussi élevé). A longueur identique, une molécule d'ARN simple brin migre dans ces conditions à environ 0.7 fois la vitesse d'une molécule d'ADN double brin. Cela est équivalent à une molécule de 7 ± 1 knt. Elle correspond donc probablement au produit de transcription de l'intégralité du plasmide, celui-ci étant censé avoir été entièrement digéré par *Hind III*.

Ensuite, une bande très bien définie et en quantité stable quelque soit le temps de réaction, sensible à l'action de la *DNAse I*, migre comme un ADN double brin de 7.0 ± 0.5 kbp. Elle correspond au plasmide utilisé comme matrice.

Enfin, un groupe de deux bandes insensibles à la *DNAse I*, migrent comme 1.0 ± 0.1 knt et 1.4 ± 0.2 knt. La plus rapide correspond probablement au produit de transcription entre le promoteur de T7 et le site de restriction *Hind III* situé 970 bp en aval. La moins rapide est difficile à attribuer.

8.2.3 Résultats

Vitesse

Dans une première approximation, la cinétique d'incorporation des ribonucléotides est du premier ordre en $[rNTP]$ avec une constante apparente k_{app} qui dépend des conditions expérimentales. Par conséquent, la quantité de rNTP incorporés au cours du temps devrait suivre une loi

$$n_{rNTP}(t) = n_{rNTP}(\infty) \left(1 - e^{-k_{app}t}\right) \quad (8.12)$$

Pour analyser les données, nous avons mesuré l'intégrale de la fluorescence de la bande d'intérêt corrigée de l'autofluorescence, puis ramenée en quantité apparente de masse d'ARN par comparaison avec la fluorescence de l'ARN de référence L_3 .

La fluorescence des trois bandes d'ARN augmente à peu près linéairement pendant 15 à 30 minutes avec des constantes semblables puis sature jusqu'au dernier point à 60

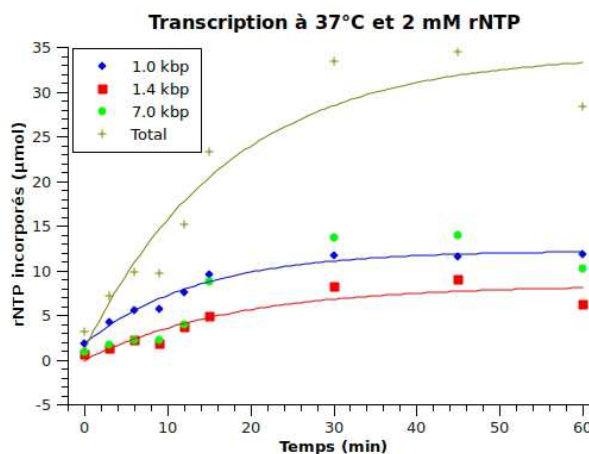


FIG. 8.5: Analyse du gel d'électrophorèse montrant la quantité de rNTP incorporés par l'ARN Polymérase de T7 à 37°C. Les chiffres indiquent la quantité de rNTP incorporés dans chaque type de transcrit. Le meilleur ajustement paramétrique exponentiel est figuré par une ligne pleine. Légende : losanges bleus = ARN 1.0 knt ; carrés rouges = ARN 1.4 knt ; ronds verts = ARN 7.0 knt ; croix marron = ARN total.

minutes. Par comparaison avec la référence de quantité d'ARN présente dans l'échelle de poids moléculaire, nous en déduisons la masse puis le nombre de moles de nucléotides incorporés. L'ajustement paramétriques des courbes de la figure 8.5 donne les valeurs de k de la table 8.3.

Transcrit	$1/k_{app}$ (s)
1.0 knt	820 ± 10
1.4 knt	1050 ± 10
7.0 knt	1160 ± 10
ARN total	1030 ± 10

TAB. 8.3: Vitesse d'incorporation des rNTP par l'ARN Polymérase de T7 à 37°C pour les trois types de transcrits, ainsi que pour l'ensemble des ARN.

Dans ces conditions, la vitesse apparente d'incorporation de nucléotides est de l'ordre de $1/k_{app} = 1000 \pm 10$ s.

Proportions

Pendant les premières minutes, les proportions relatives des ARN sont environ 75% :20% :5% pour les ARN 1.0:1.4:10 knt, et atteignent environ 60% :30% :10% à la saturation (*cf.* Fig 8.6 p. 141).

Ces chiffres concernent le nombre de transcrits produits, pas la proportion des rNTP incorporés dans un transcrit donné. Ces proportions sont plus équilibrées, de l'ordre de 30% pour chaque transcrit (*cf.* Fig 8.7 p. 141).

Rendement

L'analyse indique une consommation totale à saturation d'environ 30 nanomoles de nucléotides. Or la quantité totale de nucléotides introduits est de 20 nanomoles. Aux

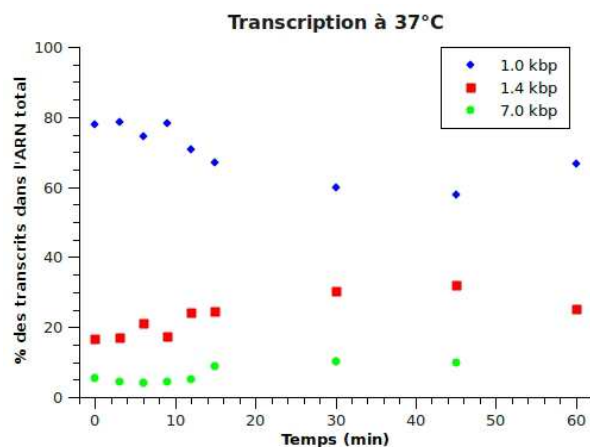


FIG. 8.6: Analyse du gel d'électrophorèse montrant la proportion de production des différents transcrits par l'ARN Polymérase de T7 à 37°C. Légende : losanges bleus = ARN 1.0 knt ; carrés rouges = ARN 1.4 knt ; ronds verts = ARN 7.0 knt.

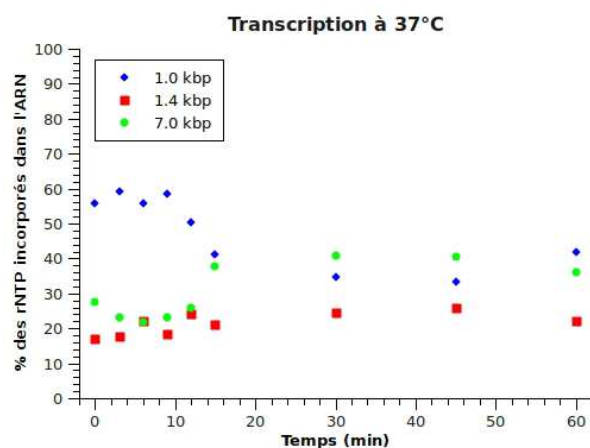


FIG. 8.7: Analyse du gel d'électrophorèse montrant la proportion d'incorporation des rNTP dans les différents transcrits par l'ARN Polymérase de T7 à 37°C. Légende : losanges bleus = ARN 1.0 knt ; carrés rouges = ARN 1.4 knt ; ronds verts = ARN 7.0 knt.

incertitudes de mesure près, la saturation est donc probablement due à l'épuisement des ribonucléotides dans le milieu réactionnel.

8.2.4 Analyse

L'expérience réalisée est subtile à interpréter : en réalité, elle ne mesure pas la cinétique d'élongation (c'est à dire la taille du transcrit au cours du temps) mais le taux de production d'un transcrit de taille donné. Une illustration de la différence est donnée dans la figure 8.8.

La principale différence réside dans le fait que l'ARN polymérase possède un certain nombre d'autres états que l'état processif, et qu'il est difficile de les discriminer dans cette expérience. L'argument principal de cette mesure en volume est que, tant que l'élongation est suffisamment longue (pas nécessairement lente) par rapport aux autres étapes, la mesure donne une bonne image de la cinétique microscopique.

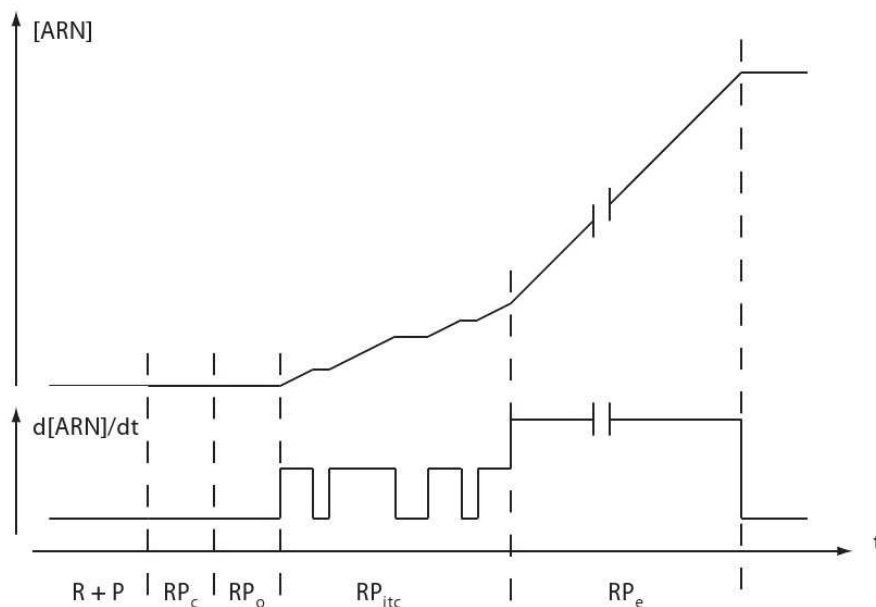


FIG. 8.8: [Bas] Le complexe passe par différentes phases, caractérisées par des vitesses de production d'ARN différentes. Les vitesses relatives ainsi que les temps caractéristiques indiqués ne servent qu'à illustrer le propos et ne sont pas à prendre littéralement. Les pauses lors de l'élongation ne sont pas représentées mais peuvent être prises en compte de manière analogue. [Haut] Quantité totale d'ARN synthétisée au cours du temps. Sur un grand ensemble de protéines, ces quantités s'additionnent sans corrélation entre elles et on obtient une courbe qui représente peu ou prou la quantité molaire de transcrit au cours du temps.

Le problème est qu'il n'est pas certain que ce soit le cas ; la figure 8.8 p.142 présente l'état au cours du temps d'une unique molécule d'ARN polymérase de *Escherichia coli*. L'élongation du transcrit est une étape assez rapide par rapport à l'initiation ou encore temps d'attente. Bien évidemment, les conditions expérimentales sont différentes ; en particulier elles sont optimisées en molécules uniques pour augmenter le plus possible le temps d'attente entre deux évènements, ce qui ne traduit pas nécessairement la situation biologique.

Il n'en reste pas moins qu'il faut rester prudent sur l'interprétation microscopique des expériences en volume, dans le sens où elles moyennent des états d'intérêt avec des états indésirables. On obtient certes un taux moyen de transcription (qui finalement est intéressant du point de vue de la comparaison avec les données *in vivo*), mais qui n'est pas directement applicable à l'élucidation du mécanisme.

Enfin, on remarque que le *stop* de transcription à 1.8 kbp du promoteur de T7 semble être relativement permissif puisque des produits de transcription alternatifs sont observés dans une proportion non négligeable (environ 1:1:2 en nombre pour les ARN du plus léger au plus lourd). Nous ne nous expliquons cependant pas que les transcrits alternatifs apparaissent sous forme de bandes discrètes et reproductibles.

8.3 Influence de la température

8.3.1 Principe de l'expérience

L'expérience précédente est répétée à 15°C et 25°C dans les conditions données dans la table 8.4. Par analogie avec le comportement observé sur l'ARN Polymérase de *Escherichia coli* (Abbondanzieri 2005b; Mejia 2008) et, de manière générale, la variation de la réactivité chimique en fonction de la température, nous souhaitons pouvoir diminuer la vitesse de translocation en travaillant à de plus basses températures.

Réactif	Concentration		Quantité (μL)		
	Initiale	Finale	1	2-8	9
Tampon commercial	«5×»	«1×»	2	2	2
rNTP (chaque)	80 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	0,25	0,25	0,25
RiboLock			0,50	0,50	0,50
ADN digéré		100 ng	1,10	1,10	1,10
T7RNAP sauvage	12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	400 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	-	0,35	-
Eau traitée DEPC			6,15	5,80	6,15
Total			10	10	10
Incubation (min)		@ 15/25°C	0	0-60	60
10' @ 70°C					

TAB. 8.4: Composition des différents essais pour l'étude de la cinétique *in vitro* de l'ARN Polymérase de T7 à 15°C et 25°C. Les temps de transcription utilisés sont 0, 5, 10, 15, 30, 45 et 60 minutes.

8.3.2 Résultats

Le résultat qualitatif est le même, avec la présence de quatre bandes correspondant à trois ARN et un ADN.

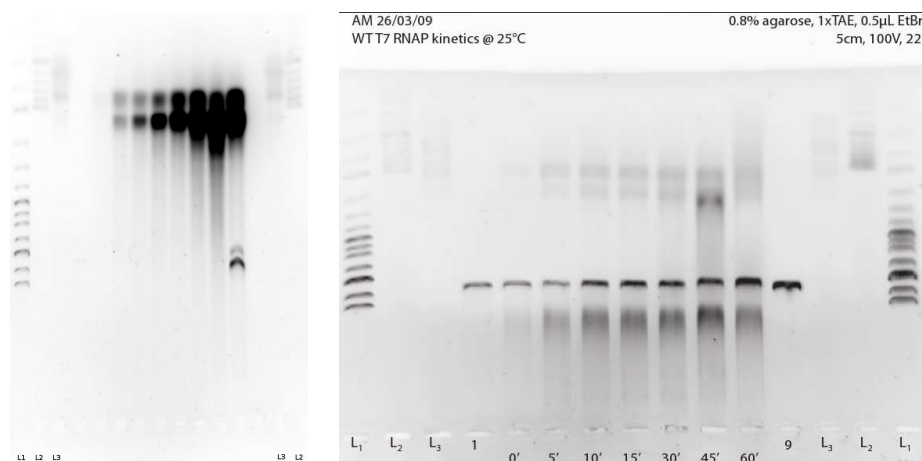


FIG. 8.9: Gel d'électrophorèse montrant la cinétique de production d'ARN par l'ARN Polymérase de T7 [G] à 15°C [D] à 25°C. Les marqueurs de poids moléculaire sont notés **L₁** (ADN 250-10000 bp, 200 ng) **L₂** (ADN 100-1000 bp, 200 ng) et **L₃** (ARN 100-1000 nt, 500 ng).

8.3.3 Analyse : Cinétique

Comme dans le cas à 37°C, la quantité de rNTP croît d'abord presque linéairement puis atteint un palier vers 15-30 minutes avec une quantité totale de 25 nanomoles (cf. Fig 8.10 p. 144) proche de la quantité totale présente dans le milieu (20 nanomoles).

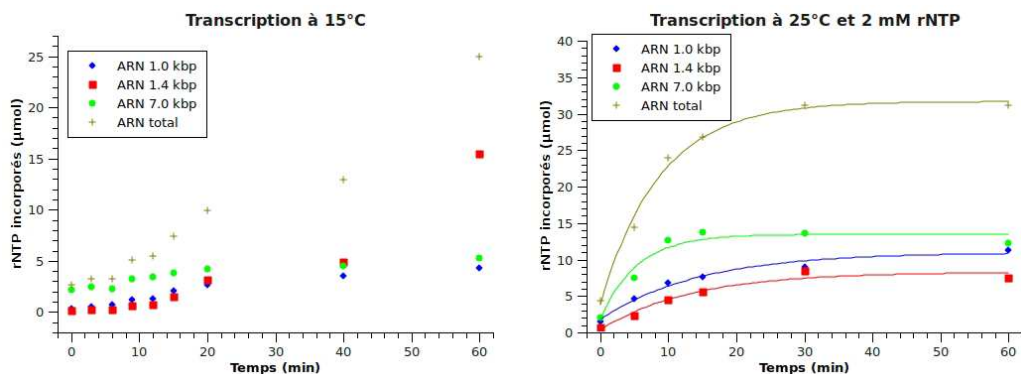


FIG. 8.10: Analyse du gel d'électrophorèse montrant la quantité de rNTP incorporés dans les différents transcrits par l'ARN Polymérase de T7 [G] à 15°C [D] à 25°C. Dans le cas de la cinétique à 25°C, le meilleur ajustement paramétrique exponentiel est représenté en trait plein. Légende : losanges bleus = ARN 1.0 knt ; carrés rouges = ARN 1.4 knt ; ronds verts = ARN 7.0 knt ; croix marron = ARN total.

L'ajustement de la quantité de nucléotides incorporés au cours du temps (pour les données à 25°C) donne la constante cinétique d'incorporation (cf. Tab.8.5 p. 144).

Transcrit	$1/k_{app}$ (s)
1.0 knt	870 ± 10
1.4 knt	800 ± 10
7.0 knt	$320 [^\dagger]$
ARN total	520 ± 10

TAB. 8.5: Vitesse d'incorporation des rNTP par l'ARN Polymérase de T7 à 25°C pour les trois types de transcrits, ainsi que pour l'ensemble des ARN. [^\dagger] : données de mauvaise qualité.

Nous obtenons dans ces conditions pour les données de bonne qualité (transcrits légers) $1/k_{app} = 850 \pm 10$ s. Aux incertitudes de mesure près, cette valeur correspond à une vitesse légèrement supérieure à celle observée à 37°C. Dans le cas de la transcription à 15°C, même si un ajustement paramétrique n'est pas possible, le temps caractéristique apparent est en revanche nettement plus long qu'aux plus hautes températures.

8.3.4 Analyse : Répartition des transcrits

La répartition des transcrits change également relativement peu : pendant les premières minutes, les proportions relatives des ARN sont environ 65% :25% :10% pour les ARN 1.0:1.4:10 knt, et atteignent environ 55% :30% :5% à la saturation (cf. Fig 8.11 p. 145).

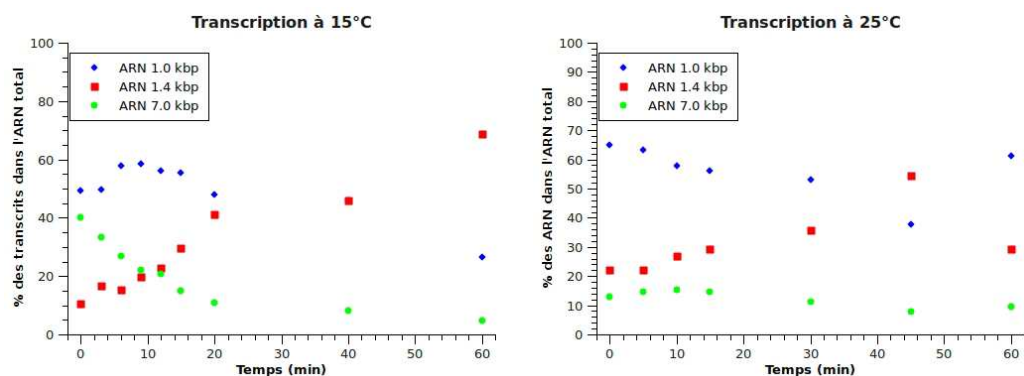


FIG. 8.11: Analyse du gel d'électrophorèse montrant la proportion de production des différents transcrits par l'ARN Polymérase de T7 [G] à 15°C [D] à 25°C. Légende : losanges bleus = ARN 1.0 knt ; carrés rouges = ARN 1.4 knt ; ronds verts = ARN 7.0 knt.

8.3.5 Analyse : Proportion de rNTP incorporés

Enfin, la proportion de rNTP incorporés par l'ARN Polymérase de T7 dans un transcrit donné converge dans les deux cas vers une valeur voisine de 30% quelque soit le type de transcrit (*cf.* Fig 8.12 p. 145).

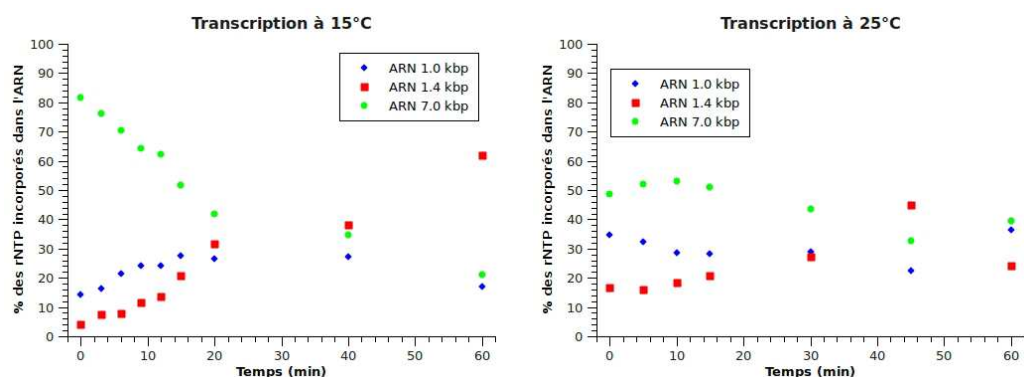


FIG. 8.12: Analyse du gel d'électrophorèse montrant la proportion de production des différents transcrits par l'ARN Polymérase de T7 [G] à 15°C [D] à 25°C. Légende : losanges bleus = ARN 1.0 knt ; carrés rouges = ARN 1.4 knt ; ronds verts = ARN 7.0 knt.

8.3.6 Conclusion

Les données de cinétique montrent une influence à peine qualitative de la température sur la constante apparente d'incorporation des nucléotides. En tout état de cause, l'ordre de grandeur de cette constante est identique dans l'ensemble des expériences. Ce résultat est particulièrement surprenant : par comparaison, les données disponibles sur l'ARN Polymérase de *Escherichia coli* (Abbondanzieri 2005b; Mejia 2008) indiquent une variation d'un facteur de l'ordre de 3 pour la vitesse d'incorporation des nucléotides entre 15°C et 37°C.

Quelle que soit la température, après un temps caractéristique de l'ordre de la vingtaine de minutes, les transcrits légers sont majoritaires en nombre, avec généralement un faible

avantage à l'ARN de 1.0 knt.

L'analyse détaillée de ces différents transcrits montre qu'en fait la quantité de rNTP incorporés dans chacun de ces transcrits est la même aux incertitudes de mesure près.

Dans la limite des données rassemblées par ces expériences, le comportement qualitatif de l'ARN Polymérase de T7 est donc conservé de 37°C à 25°C et 15°C. Même si nous ne pouvons exclure que l'étape cinétiquement déterminante de l'incorporation des nucléotides par l'ARN Polymérase de T7 soit différente de celle pour l'ARN Polymérase de *Escherichia coli*, nous estimons que ce résultat est étonnant et devra être étudié en conditions de molécule unique.

8.4 Influence de la concentration en nucléotides

8.4.1 Principe de l'expérience

Nous avons répété la détermination de la cinétique de transcription à 25°C en présence de quantités variables de rNTP. A 37°C l'analyse des données fait apparaître une cinétique du premier ordre en [rNTP] avec une constante k_{app} ; cependant, dans un modèle enzymatique de MICHAËLIS-MENTEN où l'incorporation des rNTP dans l'ARN est l'étape limitante, la constante apparente devrait dépendre de la quantité de nucléotides présents.

Cette caractérisation nous est très utile dans l'optique de mesures en molécules uniques. En effet, la gamme dynamique de la microscopie de fluorescence couplée à des pinces magnétiques est à relativement faible bande passante; il nous est donc indispensable de pouvoir diminuer l'activité de l'ARN Polymérase de T7 en diminuant la concentration de rNTP.

8.4.2 Résultats

Le résultat qualitatif reste toujours le même, avec la présence de quatre bandes correspondant à trois ARN et un ADN (*cf.* Fig 8.13 p. 146). Ces résultats sont à comparer avec les données précédentes à 25°C en présence de 2 mmol·L⁻¹ rNTP.

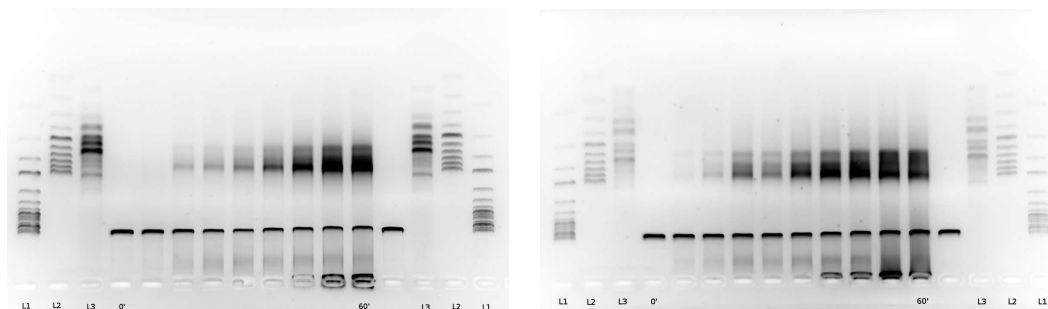


FIG. 8.13: Gel d'électrophorèse montrant la cinétique de production d'ARN par l'ARN Polymérase de T7 à 25°C en présence [G] de 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rNTP [D] de 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rNTP. Les marqueurs de poids moléculaire sont notés L₁ (ADN 250-10000 bp, 200 ng) L₂ (ADN 100-1000 bp, 200 ng) et L₃ (ARN 100-1000 nt, 500 ng).

8.4.3 Analyse : cinétique

Même si la constante apparente d'incorporation des nucléotides est nettement inférieure à basse concentration (250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), elle est en revanche plus grande à 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ que 2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (*cf.* Tab.8.6 p. 147).

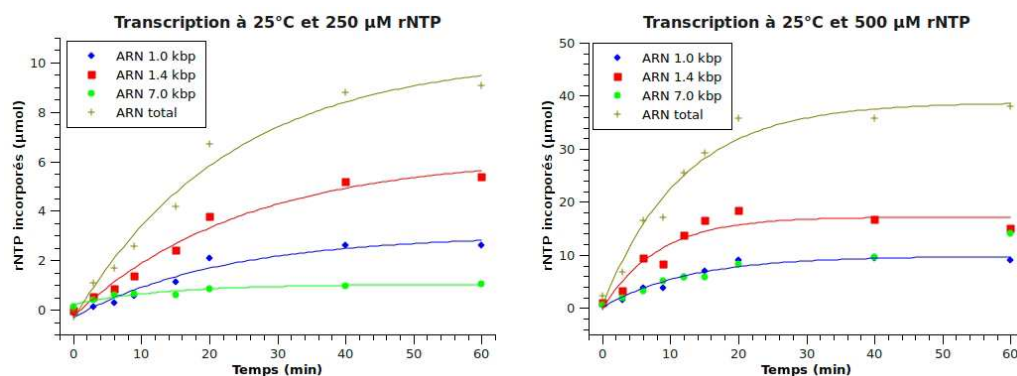


FIG. 8.14: Analyse du gel d'électrophorèse montrant la quantité de rNTP incorporés dans les différents transcrits par l'ARN Polymérase de T7 à 25°C en présence [G] de 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rNTP [D] de 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rNTP. Le meilleur ajustement paramétrique exponentiel est représenté en trait plein. Légende : losanges bleus = ARN 1.0 knt ; carrés rouges = ARN 1.4 knt ; ronds verts = ARN 7.0 knt ; croix marron = ARN total.

	250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rNTP	500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rNTP	2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rNTP
Transcrit	$1/k_{app}$ (s)		
1.0 knt	1300 \pm 10	760 \pm 10	870 \pm 10
1.4 knt	1490 \pm 10	490 \pm 10	800 \pm 10
7.0 knt	800 \pm 10	-[†]	320[†]
ARN total	1370 \pm 10	700 \pm 10	520 \pm 10

TAB. 8.6: Vitesse d'incorporation des rNTP par l'ARN Polymérase de T7 à 25°C en présence de 250, 500 ou 2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de rNTP pour les trois types de transcrits, ainsi que pour l'ensemble des ARN. [†] : données de mauvaise qualité.

8.4.4 Analyse : Répartition des transcrits

Comme dans les études précédentes, la proportion de transcrits en nombre est en faveur des ARN légers, avec une domination un peu plus nette de l'ARN à 1.4 knt (*cf.* Fig 8.15 p. 147).

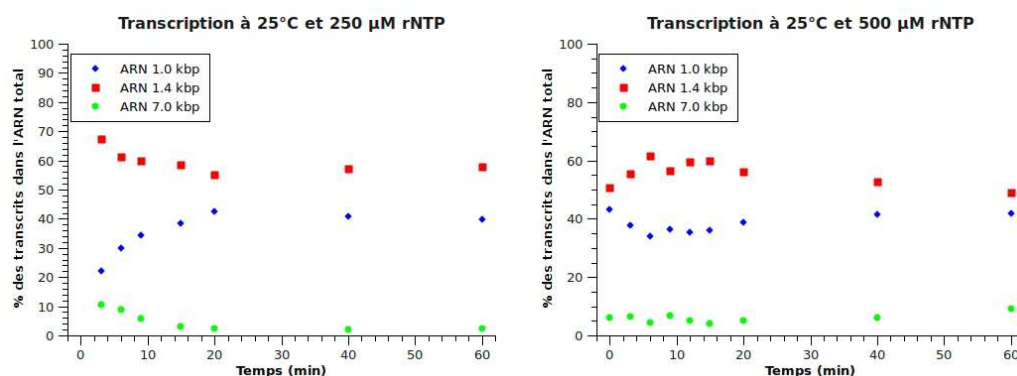


FIG. 8.15: Analyse du gel d'électrophorèse montrant la proportion de production des différents transcrits par l'ARN Polymérase de T7 à 25°C en présence [G] de 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rNTP [D] de 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rNTP. Légende : losanges bleus = ARN 1.0 knt ; carrés rouges = ARN 1.4 knt ; ronds verts = ARN 7.0 knt.

8.4.5 Analyse : Proportion de rNTP incorporés

La domination en nombre des transcrits à 1.4 knt sur ceux à 1.0 knt se traduit par une part plus importante d'incorporation des rNTP dans ce transcrit (de l'ordre de 40-50%), particulièrement à bas [rNTP] (*cf.* Fig 8.16 p. 148). En l'absence de précisions sur la nature des différents transcrits (promoteur et terminateur différents, même promoteur et terminateur différent, différents promoteurs et même terminateur), nous ne sommes pas en mesure de proposer une explication.

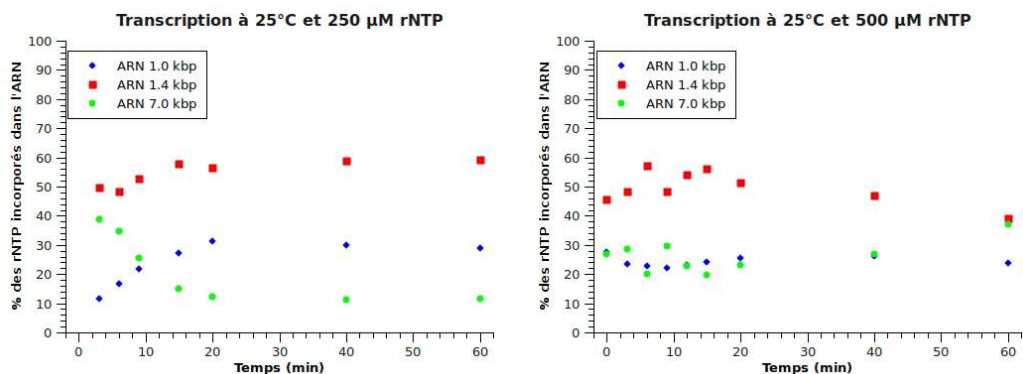


FIG. 8.16: Analyse du gel d'électrophorèse montrant la proportion de production des différents transcrits par l'ARN Polymérase de T7 à 25°C en présence [G] de 250 μmol·L⁻¹ rNTP [D] de 500 μmol·L⁻¹ rNTP. Légende : losanges bleus = ARN 1.0 knt ; carrés rouges = ARN 1.4 knt ; ronds verts = ARN 7.0 knt.

8.4.6 Conclusion

Nous avons montré par ces expériences que la concentration totale en rNTP avait une influence sur la cinétique d'incorporation des nucléotides. A 25°C et à basse concentration en rNTP (250 μmol·L⁻¹), il est possible de ralentir la transcription par un facteur au moins 2 ou 3 par rapport aux plus hautes concentrations. Ces conditions correspondent à celles que nous souhaitons utiliser dans les expériences de molécule unique.

Par ailleurs, il semble qu'à basse concentration en [rNTP] commencent à être révélés des comportements d'incorporation différents selon les transcrits. De même, la dépendance de la vitesse en fonction de la concentration en rNTP n'est pas triviale. Nous souhaitons utiliser les expériences en molécule unique pour comprendre plus précisément ce régime.

8.5 Incorporation de nucléotides modifiés

Une méthode que nous envisageons pour l'étude en molécules uniques de la transcription est l'incorporation de ribonucléotides fluorescents, afin de produire un ARN également fluorescent, qui serait plus facile à visualiser. Pour cela, nous avons testé l'incorporation *in vitro* de rATP:Alexa647 par l'ARN Polymérase de T7 biotinylée destinée à être utilisée dans nos expériences. Cette approche avait été précédemment décrite avec l'action de l'ARN Polymérase de T7 sur un ADN peigné par un autre groupe (Gueroui 2002).

En l'absence d'intercalants, le gel d'électrophorèse des produits de la réaction présente une fluorescence correspondant pour une part à l'auto fluorescence des acides nucléiques (voir par exemple les marqueurs de poids moléculaire ou la bande correspondant au plasmide) et pour une autre part à la fluorescence des Alexa647 incorporés dans le transcrit

Réactif	Concentration		Quantité (μL)		
	Initiale	Finale	1	2	3-10
Tampon commercial	«5×»	«1×»	2	2	2
rUTP + rGTP + rCTP (chaque)	5 mmol·L ⁻¹	250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.5	0.5	0.5
rATP	1 mmol·L ⁻¹	var.	2.5	2.5	var.
rATP:Alexa647	1 mmol·L ⁻¹	var.	-	0.25	var.
ADN digéré	105 ng· μL^{-1}	100 ng	1	-	1
T7RNAP:biotine	8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	400 nmol·L ⁻¹	-	0.5	0.5
Eau traitée DEPC			4	4.5	var.
Total			10	10	10
Incubation (min)		@ 37°C	60	60	60
10' @ 70°C					

TAB. 8.7: Composition des différents essais pour l'étude de l'incorporation *in vitro* de rATP:Alexa647 par l'ARN Polymérase de T7 à 37°C. La concentration totale de rATP (marqué ou non) est constante et vaut 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Les pourcentages de rATP:Alexa647 sont : 0%, 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 20%, 50% et 100%.

(cf. Fig 8.17 p. 150).

Ultérieurement, nous avons plongé le gel dans une solution de bromure d'éthidium et mesuré la quantité totale d'acides nucléiques. Nous avons alors représenté le rapport de signal entre les transcrits fluorescents et les transcrits totaux en fonction du pourcentage d'ATP fluorescent présent (cf. Fig 8.17 p. 150).

A faible proportion d'ATP fluorescent, l'autofluorescence des acides nucléiques induit un palier dans la quantité apparent de transcrits fluorescents. Au-delà de 10% de nucléotides fluorescents, la proportion de transcrits fluorescents est proportionnelle à celle des nucléotides fluorescents.

Nous montrons donc que l'ARN Polymérase de T7 peut incorporer un nucléotide fluorescent avec un taux proportionnel à la concentration de nucléotide marqué, jusqu'à une concentration en nucléotide modifié au moins égale à 50% des nucléotides totaux.

8.6 Couplage à un fluorophore

Nous avons étudié la transcription *in vitro* de l'ARN Polymérase de T7 biotinylée en présence de streptavidine, pour déterminer si et comment le marquage peut modifier l'activité de transcription.

8.6.1 Protocole

Nous avons réalisé une expérience à quantité fixe d'ARN Polymérase de T7, analogue aux expériences précédentes, mais en présence de quantités croissantes de streptavidine dans un rapport molaire avec l'ARN Polymérase de T7 de 1:4, 1:2, 1:1, 2:1 et 3:1 respectivement (cf. Tab.8.8 p.150).

8.6.2 Influence du couplage sur l'activité

Cette expérience confirme qu'en l'absence d'ARN Polymérase de T7, aucun transcrit n'est produit (cf. Fig 8.18 p. 151). La colonne 5 (polymérase commerciale) nous permet d'attribuer la bande correspondant au transcrit (par opposition aux deux bandes corre-

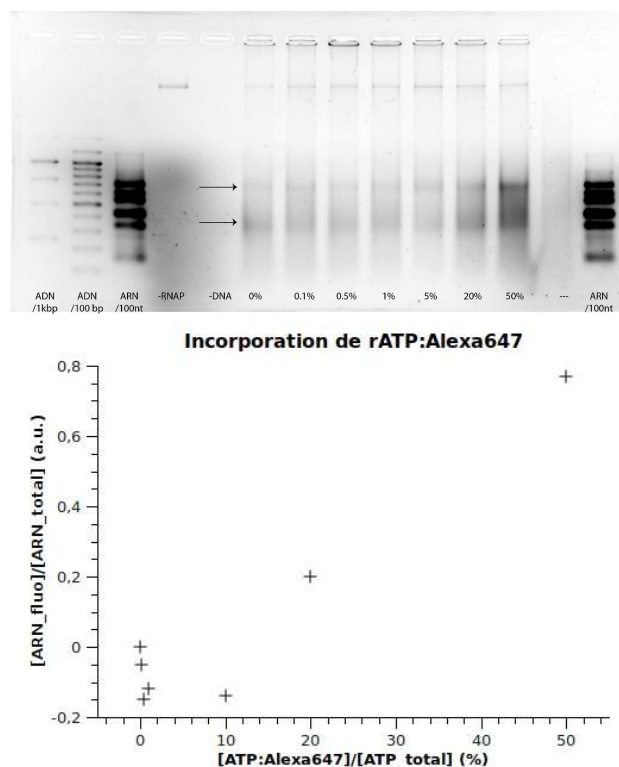


FIG. 8.17: Données montrant l'incorporation de rATP:Alexa647 par l'ARN Polymérase de T7 à 37°C en présence d'un total de 250 μM pour chaque nucléotide. Pour rATP, la proportion de rATP:Alexa647 varie de 0% à 50%. [H] Gel (sans intercalant) de la fluorescence. Remarquer la légère autofluorescence des acides nucléiques. Les flèches délimitent la région de poids moléculaire du transcrit. [B] Analyse de la fraction d'ARN fluorescent par rapport à l'ARN total (les données représentées sont une fonction affine de cette quantité) en fonction du pourcentage de rNTP:Alexa647. Après le seuil de détection dû à l'autofluorescence des acides nucléiques, la relation est bien linéaire.

Réactif	Concentration		Quantité (μL)				
	Initiale	Finale	4	5	6	7	8–12
Tampon commercial	«5×»	«1×»	2	2	2	2	2
rNTP (chaque)	80 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
RiboLock			0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
ADN pMAMA digéré Sph I	100 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	100 ng	1	1	1	1	1
T7RNAP commerciale	12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	400 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	-	0.35	-	-	-
T7RNAP:biot	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	400 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	-	-	-	0.4	0.4
streptavidine	1.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	(var.)	-	-	2.1	-	var.
ddH ₂ O		10 μL	6.25	5.9	4.15	6	var.
60' @ 37°C							
10' @ 70°C							

TAB. 8.8: Influence de la concentration en streptavidine sur l'incorporation de rNTP *in vitro* par l'ARN Polymérase de T7 à 37°C. Les tubes 8–12 contiennent de la streptavidine dans un rapport molaire avec l'ARN Polymérase de T7 de 1:4, 1:2, 1:1, 2:1 et 3:1 respectivement.

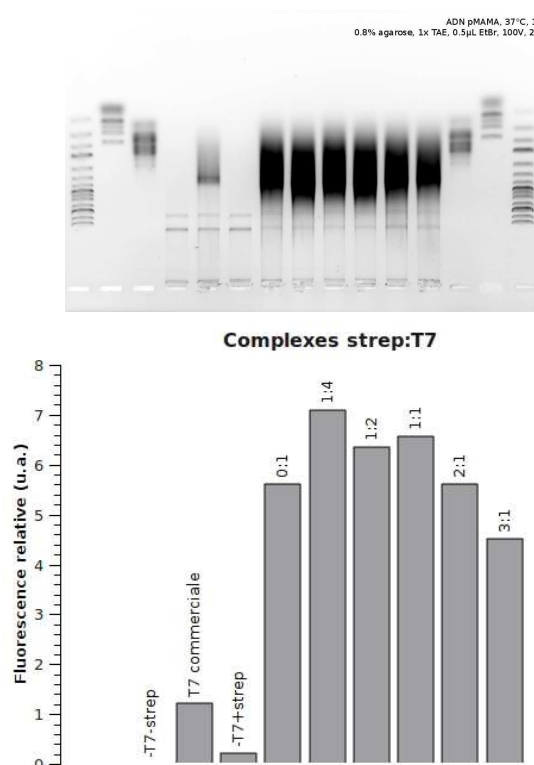


FIG. 8.18: Données montrant l'incorporation de rATP par l'ARN Polymérase de T7 à 37°C en présence d'un total de $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pour chaque nucléotide. La T7RNAP:biot peut être complexée par des quantités croissantes (de 1:4 à 3:1 équivalents molaires) de streptavidine. [H] Gel d'électrophorèse du produit de la réaction. La composition de chaque colonne se trouve dans le tableau 8.8. Les colonnes 1–3 et 9–12 sont des marqueurs de poids moléculaires (ADN pour les deux premiers, ARN pour le troisième). [B] Analyse de la quantité d'ARN total en fonction du rapport molaire [strep]/[RNAP]. La quantité relative d'ARN produit est évaluée par mesure de l'intensité de fluorescence. La colonne 4 est prise comme référence.

spondant à l'ADN) à un ARN d'environ $2.9 \pm 0.2 \text{ knt}$, cohérent avec la transcription du gène immédiatement en aval du promoteur.

En présence d'ARN Polymérase de T7 biotinylée (sans streptavidine, colonne 7), un transcrit est également abondamment produit. Il est localisé principalement dans la bande attribuée précédemment (la saturation de l'image présentée ne permet pas de le voir précisément) mais s'étend jusqu'à environ 1.5 knt.

En présence de quantités croissantes de streptavidine (colonnes 8-12), le comportement reste qualitativement le même (*cf.* Fig 8.18 p. 151). La quantification effectuée par mesure de l'intensité de fluorescence (sur une image non saturée) confirme une activité équivalente pour toutes les situations testées dans cette expérience.

Nous estimons donc qu'en présence de streptavidine, l'activité ARN polymérase de la protéine biotinylée n'est pas affectée, ni qualitativement, ni quantitativement.

Conclusion

Nous avons réalisé une série d'expériences en volume sur des substrats identiques ou comparables à ceux que nous souhaitons utiliser dans des expériences de molécule unique.

Nous avons montré d'une part que nous pouvons extraire de ces expériences certaines données biochimiques, comme la vitesse moyenne d'incorporation des nucléotides, tout en soulignant la nécessité d'expériences en molécule unique pour mesurer ces données de manière plus pertinente.

Nous avons ensuite comparé le comportement de l'ARN Polymérase de T7 biotinylée que nous avons préparée à celui de la polymérase sauvage commerciale, et montré que son activité de transcription *in vitro* est comparable, sinon plus importante.

Nous avons enfin vérifié que l'ARN polymérase que nous utilisons possède une activité de transcription dans les conditions que nous souhaitons utiliser en molécules uniques : travail à plus basse température, concentration de nucléotides plus faible, utilisation de nucléotides modifiés, marquage de la protéine par de la streptavidine, *etc.*

9 Expériences en molécules uniques sur l'ARN polymérase

Et je voudrais, pour moi, qu'on
ne me fit savoir
Que ce qu'avec clarté l'on peut
me faire voir

(Molière, *Le Misanthrope*)

9.1 Introduction

9.1.1 Contraintes des manipulations en molécule unique

Nous avons défini par des expériences en volume les conditions dans lesquelles une activité de transcription pouvait être observée. Cependant, ces expériences menées à l'échelle de la picomole, c'est à dire tout de même quelques 10^{12} molécules, amènent des questions en particulier sur la distribution de l'activité d'un ensemble de protéines. Nous allons d'abord aborder ces questions avant de présenter les expériences en molécule unique que nous avons effectuées.

Cinétique de complexation

Pour descendre à l'échelle de protéines individuelles, sachant que nous observons un champ d'environ $100\mu m \times 100\mu m$, une concentration d'environ 1 protéine par micromètre cube est l'ordre de grandeur adapté. Cela correspond à des concentrations de l'ordre de la *nanomole par litre*.



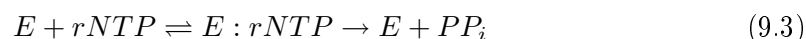
Si on considère un modèle à deux états libre/complexé de constantes cinétiques k_+ et k_- (eq. 9.1), le temps caractéristique τ des fluctuations autour de l'équilibre s'exprime comme

$$\tau^{-1} = k_+ \left([RNAP]_{eq} + [ADN]_{eq} \right) + k_- \quad (9.2)$$

Cela implique que le temps d'attente entre deux évènements de fixation de la protéine à son substrat peut être long. Cependant, les expériences d'activité mécanique en molécule unique suggèrent que ce temps est de l'ordre de la dizaine de secondes lorsqu'on observe un ADN dans une solution d'ARN Polymérase de T7 à quelques dizaines de nanomoles par litre, ce qui correspond à $K_a \sim 200 \mu M$ (Thomen 2005).

Cinétique d'élongation

Si on note E un complexe d'élongation comprenant l'ARN polymérase, l'ADN et l'ARN, le modèle le plus simple pour décrire la transcription est le cycle d'incorporation d'un nucléotide (9.3).



Dans ce modèle de cinétique michaelienne, la vitesse d'élongation est décrite par

$$v = \frac{k [E]_{tot}}{1 + \frac{K_M}{[rNTP]}} \quad (9.4)$$

La constante d'association (K_M) des nucléotides est de l'ordre de $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. La concentration des nucléotides n'est pas limitée par les besoins de l'expérience. A une concentration classique de $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en rNTP et une fois que le complexe est entré en élongation, la transcription atteint pratiquement sa valeur limite : de l'ordre de 200 nucléotides par seconde.

9.1.2 Substrats d'ADN utilisés

Quelles que soient les expériences réalisées, la nature du promoteur, sa distance par rapport à la surface, son orientation, la nature du transcrit, sont des paramètres cruciaux à maîtriser. Nous avons utilisé principalement trois sources d'ADN rassemblées dans le tableau 9.1 p.154.

A partir de ces plasmides, différentes constructions ont été réalisées pour mettre en évidence la transcription. Ces constructions sont résumées dans le tableau 9.2 p.155.

Plasmide	Longueur bp	Promoteur	Transcrit		
			Nature	knt	Propriétés
pC5fGFPstp	6707	T7 natif	GFP	1.8	-
pMAMA-Arg5	6887	T7 natif	LacZ	2.9	Terminateur
p24ms2	4724	T7 cloné	24× site MS2		Reconnu par MS2
p24ms2	4780	<i>Coli</i> cloné	24× site MS2		Reconnu par MS2

TAB. 9.1: Tableau des plasmides utilisés pour étudier la transcription par l'ARN polymérase. Le terme «natif» signifie que le plasmide tel que nous l'avons obtenu comportait la séquence du promoteur.

Le transcrit peut coder pour un gène quelconque (LacZ, GFP) ou bien posséder des caractéristiques particulières comme des sites de reconnaissance de la protéine MS2 (voir la section 9.3.3).

Le plasmide peut également comporter un terminateur *rho-indépendant* formant une épingle à cheveu qui déstabilise le complexe d'élongation et force le détachement de l'ARN polymérase. Toutefois, en l'absence de ce terminateur, l'ARN polymérase est susceptible de se décrocher spontanément ; en particulier dans les régions palindromiques riches en bases G/C et dans des répétitions poly-T. Nous n'avons pas utilisé cette propriété dans nos expériences.

9.2 Activité mécanique en molécule unique de l'ARN Polymérase de T7

9.2.1 Principe de l'expérience

La chambre expérimentale est celle que nous avons décrite dans le chapitre 3. La surface inférieure est recouverte d'anti-digoxigenine et la chambre est initialement remplie de tampon de passivation PB (p. 282).

Nom	Plasmide	Surface	Distance		Extrémité	Longueur		Direction
			bp	nm		bp	μm	
RNAP-B	pC5fGFPstp	<i>XhoI</i> dig	5918	2000	<i>BamHI</i>	6670	2,2	Solution
RNAP-C	pC5fGFPstp	<i>AatII</i> dig	183	60	<i>SphI</i> biot	2168	0,7	Solution
RNAP-D	pC5fGFPstp	<i>SpeI</i> dig	6076	2000	<i>SacI</i> biot	6142	2,0	Surface
RNAP-E	pC5fGFPstp	<i>SacI</i> dig	66	20	<i>SpeI</i> biot	6142	2,0	Solution
RNAP-F	pC5fGFPstp	<i>XhoI</i> dig	789	270	<i>EcoRI</i> biot	4908	1,6	Surface

TAB. 9.2: Exemples de constructions d'ADN utilisées dans les expériences de transcription en molécule unique. Ces constructions sont présentées graphiquement dans la figure 9.1.

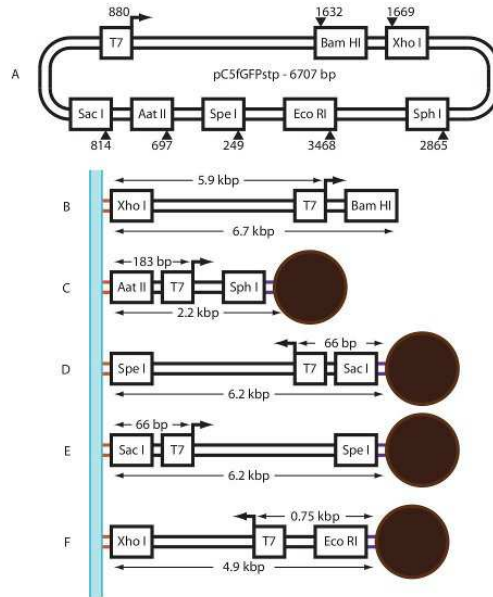


FIG. 9.1: Exemple de constructions d'ADN utilisées dans les expériences de transcription en molécule unique, basées sur le plasmide pC5fGFPstp, réalisées pour ce travail. La numérotation reprend celle du tableau 9.2.

Nous pré-incubons une solution d'ADN possédant des extrémités digoxigénine et biotine (ca. $10 \text{ fmol}\cdot\text{L}^{-1}$) avec des billes magnétiques ($50 \text{ fmol}\cdot\text{L}^{-1}$) recouvertes de streptavidine, de façon à obtenir une majorité de billes libres et quelques billes portant un unique ADN.

Cette solution est mise en contact avec la surface, incubée quelques minutes, puis rincée pour éliminer les billes libres. C'est à nouveau le tampon de passivation qui est utilisé, de façon à empêcher les billes de coller non-spécifiquement à la surface.

Un champ de vue contenant des billes intéressantes est sélectionné à la main et nous positionnons une fois pour toutes des marqueurs pour indiquer les billes à suivre à l'ordinateur. Celles-ci sont alors caractérisées automatiquement : construction de l'image de calibration (pour la mesure de position en z), caractéristique extension-torsion (pour s'assurer qu'un unique ADN est bien présent, que la molécule est sensible à la torsion et repérer n_{rot} correspondant à $\sigma = 0$), éventuellement caractéristique force-extension.

Le mélange réactionnel contenant l'ARN polymérase ($1-100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), les nucléotides ($100-500 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sauf indication contraire), le tampon de transcription (p. 283) et des cofacteurs éventuels est ensuite injecté dans la chambre expérimentale et nous pouvons

alors effectuer les observations.

9.2.2 Dénaturation spontanée de l'ADN

Dans la partie 16.1.3 p.289, nous avons montré que l'ADN subissait une transition de dénaturation pour

$$\begin{cases} \sigma < -\frac{\eta_{DP}}{8\pi^2 k_B T C_B} \approx -3\% \\ F > \frac{\eta_D^2}{16\pi^2 k_B T G} \approx 0.4 \text{ pN} \end{cases} \quad (9.5)$$

Au voisinage de cette transition, des bulles de dénaturation peuvent se former transitoirement dans le domaine d'existence de la phase plectonémique (*cf.* Fig 9.2 p. 156). Si l'ADN utilisé dans l'expérience est sensible à la torsion, l'ouverture d'une bulle de dénaturation de n_D paires de bases est compensée par la consommation de $n_D/10,5$ boucles de plectonèmes et donc un allongement de $4 - 6 \cdot n_D \text{ nm}$.

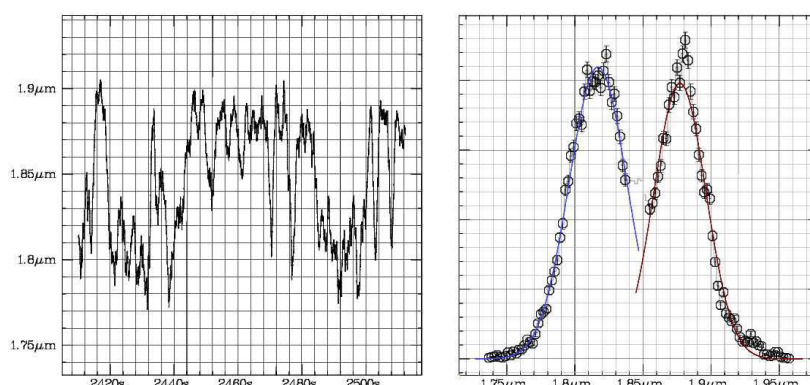


FIG. 9.2: [G] Exemple d'ouvertures et fermetures de bulles de dénaturation ($\sigma = -2.8\%$, $F = 0.15 \text{ pN}$) en l'absence d'ARN polymérase. Le signal présenté résulte d'un filtrage sur 128 points (1.4 s) de la position en temps réel. [D] Histogramme des valeurs relevées sur l'ensemble de l'acquisition (800 s) montrant la présence de deux états séparés de $60 \pm 20 \text{ nm}$.

D'un côté, ces ouvertures spontanées peuvent être interprétées à tort comme des insertions d'ARN polymérase dans l'ADN. D'un autre, la grande affinité de l'ARN polymérase pour les bulles de dénaturation peut permettre de piéger des molécules dans une configuration favorable à l'initiation de l'élongation.

Nous avons donc exploré le comportement de l'ADN au voisinage de cette dénaturation, de façon à pouvoir nous placer dans le domaine souhaité selon le type d'expérience réalisée. Même à faible force (0,1 pN), des bulles de dénaturation peuvent apparaître dès $\sigma = -2\%$ (*cf.* Fig 9.3 p. 157) dans les conditions salines utilisées.

Dans la plupart des expériences ultérieures, nous nous sommes donc placés dans la région où aucune bulle de dénaturation ne se forme, de façon à pouvoir attribuer clairement les signaux à l'activité de l'ARN polymérase. En revanche, dans des cas où l'activité était difficile à observer, nous nous sommes transitoirement placés dans la région où des bulles nucléent, afin de faciliter le chargement de l'ARN polymérase sur l'ADN.

9.2.3 Visualisation de l'insertion

Sur deux molécules d'ADN de séquence identique, nous avons mené des expériences en molécule unique dans des conditions comparables afin d'étudier l'insertion de l'ARN

9.2 Activité mécanique en molécule unique de l'ARN Polymérase de T7

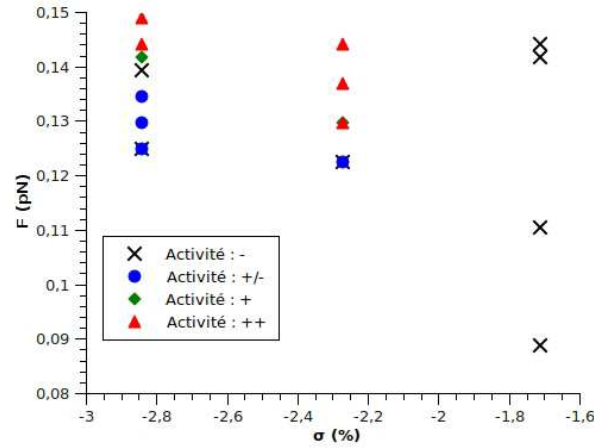


FIG. 9.3: Diagramme de phase de l'activité d'ouverture spontanée de bulles de dénaturation dans pC5fGFPstp (6.6 kbp).

Polymérase de T7 dans l'ADN et l'influence des nucléotides. A $\sigma = -1,70\%$ et en l'absence d'ARN polymérase, nous n'observons aucune activité, conformément aux observations de la section 9.2.2.

En présence d'ARN Polymérase de T7 ($40 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), et pour des forces jusqu'à 0.21 pN , l'activité est faible et nous observons des sauts entre 25 et 50 nm , correspondant à la consommation de boucles de plectonèmes par les bulles de dénaturation créées. La distribution de la durée de vie à la fois des états ouvert et fermé fait apparaître des temps longs et largement distribués ($20\text{-}1000 \text{ s}$).

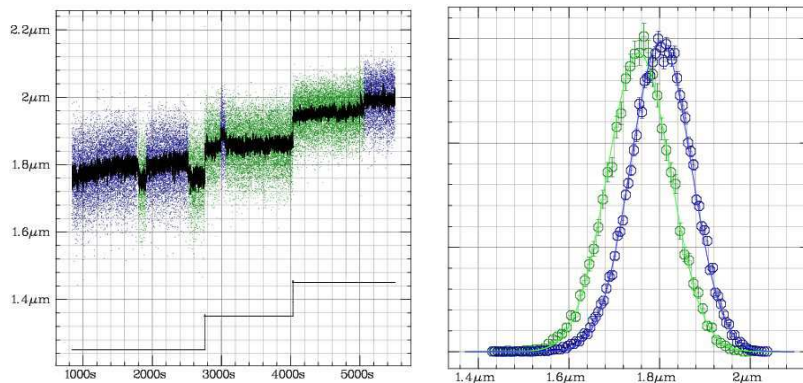


FIG. 9.4: Insertion de l'ARN Polymérase de T7 en l'absence de rNTP. Les conditions sont les suivantes : $[\text{RNAP}] = 40 \text{ nM}$, $\sigma = -1.70\%$ et $F = 0.13 - 0.21 \text{ pN}$ (de gauche à droite). [G] Trace des changements d'extension entre l'état fermé (vert) et ouvert (bleu). Le graphe inférieur signale les changements de force. Le signal présenté comporte les points expérimentaux et le signal filtré sur 128 images (1.4 s). [D] Histogramme de l'extension de l'ADN avant et après le saut à $t = 1900 \text{ s}$. Le décalage mesuré est de 48 nm .

Toujours en présence d'ARN Polymérase de T7 ($20 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), et pour des forces de l'ordre de 0.90 pN , la présence de nucléotides ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) engendre une intense activité (dans ces conditions, en l'absence de nucléotides, une activité très faible est observée). Nous observons que l'extension de l'ADN passe d'un état à l'autre avec des temps de vie nettement plus courts ($1\text{-}10 \text{ s}$, comparer l'échelle de temps avec la figure 9.4). L'ordre de grandeur des changements d'extension est légèrement plus élevé ($60\text{-}80$

nm) car la force est plus importante (cf. Fig 9.5 p. 158).

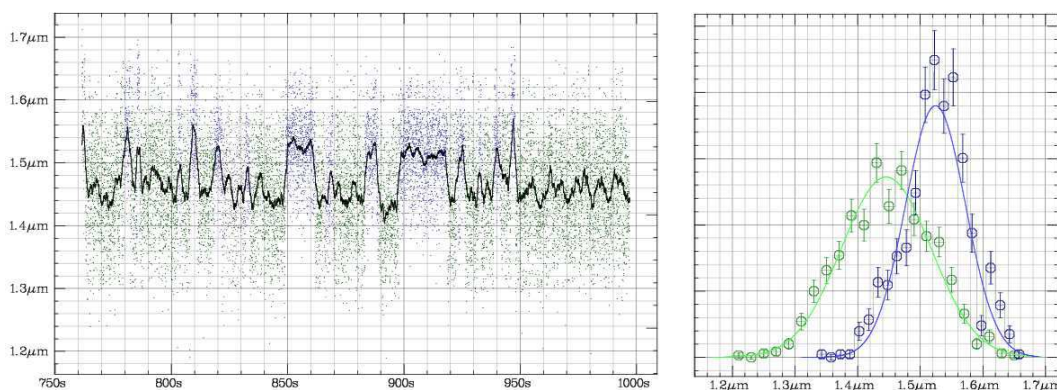


FIG. 9.5: Insertion de l'ARN Polymérase de T7 en présence de rNTP. Les conditions sont les suivantes : $[RNAP] = 40 \text{ nM}$, $[rNTP] = 100 \mu\text{M}$, $\sigma = -2.20\%$ et $F = 0.89 \text{ pN}$. [G] Trace des changements d'extension entre l'état fermé (vert) et ouvert (bleu). Le signal présenté comporte les points expérimentaux et le signal filtré sur 128 images (2.1 s). [D] Histogramme de l'extension de l'ADN avant et après le saut à $t = 850 \text{ s}$. Le décalage mesuré est de 79 nm.

La différence de distribution des changements d'extension est très similaire à celle observée dans des conditions voisines ($\sigma = -2\%$, $[rNTP] = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $F = 0.30 \text{ pN}$) sur l'ARN Polymérase de *Escherichia coli* (Revyakin 2006). Bien que nous n'ayons pas pu distinguer les états \mathbf{RP}_o et \mathbf{RP}_{itc} , nous pensons être à même d'observer les signaux d'élongation de l'ARN Polymérase de T7.

9.2.4 Sensibilité de l'insertion à la torsion

En l'absence d'ARN polymérase, le comportement de l'extension de l'ADN en fonction de l'ADN (à basse force) est décrit par une courbe symétrique, dite «en chapeau» (chapitre 4).

En présence de l'ARN Polymérase de T7, si une molécule s'insère dans l'ADN, une bulle de dénaturation de 9-12 paires de bases est créée autour de la protéine (Chen 2000; Gong 2006). A surenroulement σ donné, l'ADN se comporte apparemment comme s'il avait absorbé une torsion correspondant à 0.9 - 1.1 tours supplémentaires. La courbe «en chapeau» doit donc apparaître décalée vers la gauche d'environ 1 tour par rapport à la courbe en l'absence de protéine (cf. Fig 9.6 p. 159).

Expérimentalement, en l'absence de protéine, toutes les molécules d'ADN sensibles à la torsion présentent une courbe extension-torsion symétrique et centrée sur la même valeur de n_{rot} (le zéro de torsion est mesuré à environ 1 tour près). En présence de protéine ($200 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) et de l'ensemble des ribonucléotides ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) dans le tampon de transcription (p. 283), des décalages sont observés sur une partie des ADN (cf. Fig 9.6 p. 159).

Dans la plupart des cas cependant, la situation est plus complexe : en partant d'un surenroulement négatif, la courbe extension-torsion suit d'abord une trajectoire correspondant à une courbe «en chapeau» décalée vers la gauche. A un certain moment, un décrochement se produit et la trajectoire correspond alors à la courbe «en chapeau» de l'ADN nu (cf. Fig 9.7 p. 159). Nous attribuons ces observations à une ARN polymérase, initialement insérée dans l'ADN à surenroulement négatif, qui se décroche lors de la rotation.

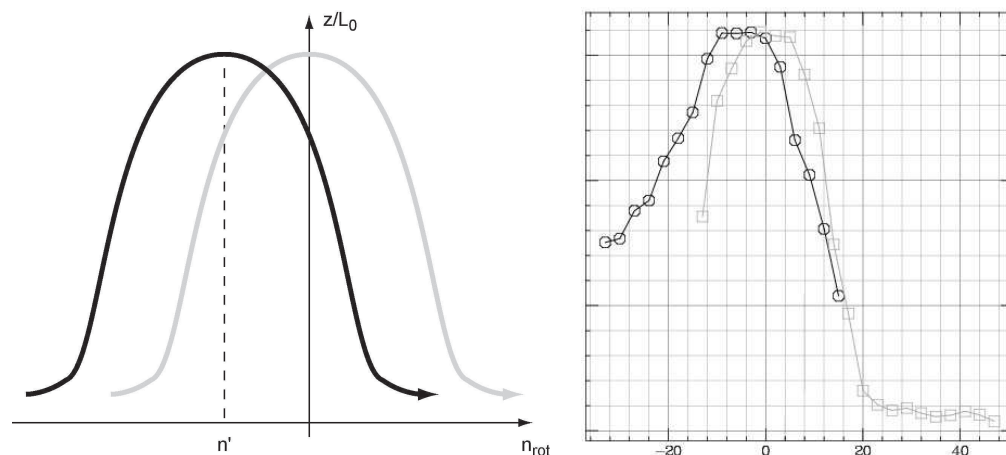


FIG. 9.6: L'insertion de molécules d'ARN polymérase entraîne le décalage de la courbe extension-rotation de l'ADN. [G] Schéma de principe. La courbe de référence est en gris, la courbe mesurée est en noir. [D] Données expérimentales. La courbe de référence est en carrés et trait gris, la courbe mesurée en présence d'ARN polymérase est en cercles et trait noir. Le décalage mesuré est de 5,2 tours, correspondant à l'insertion de 4 à 5 molécules d'ARN Polymérase de T7 dans l'ADN.

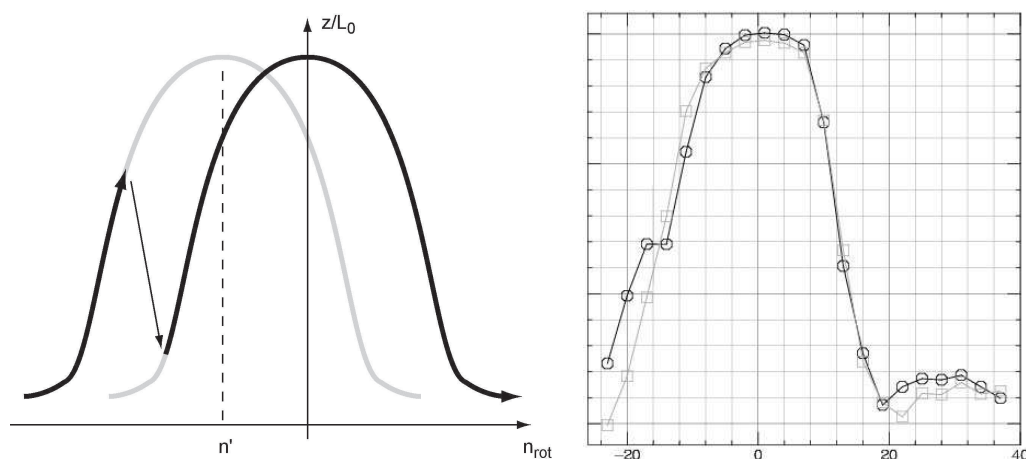


FIG. 9.7: Décrochement dans la courbe extension-torsion d'une molécule d'ADN en partant d'un surenroulement négatif. [G] Schéma de principe. La courbe de départ est décalée à gauche. Le système suit le chemin en trait noir, puis saute sur la courbe en chapeau de l'ADN nu. [D] Données expérimentales. La courbe de référence est en carrés et trait gris, la courbe mesurée en présence d'ARN polymérase est en cercles et trait noir. Le décalage estimé est de 2.3 tours, correspondant à l'insertion de 2 molécules d'ARN Polymérase de T7 dans l'ADN.

Afin de savoir si c'est la perturbation induite dans l'ADN par la rotation de la bille magnétique, ou si c'est le changement de torsion qui induit le décrochage de l'ARN polymérase, nous avons réalisé l'expérience symétrique : à partir d'un surenroulement initialement positif, la courbe force-extension suit presque systématiquement celle de l'ADN nu. Parfois, nous observons un décrochement dans la courbe extension-torsion, qui correspond à une trajectoire sur une courbe «en chapeau» décalée vers la gauche. En continuant la rotation vers les surenroulements de plus en plus négatifs, nous n'observons

jamais de retour à la courbe de l'ADN nu (cf. Fig 9.8 p. 160). Nous en concluons que c'est la torsion qui contrôle l'équilibre insertion/décrochement de l'ARN polymérase.

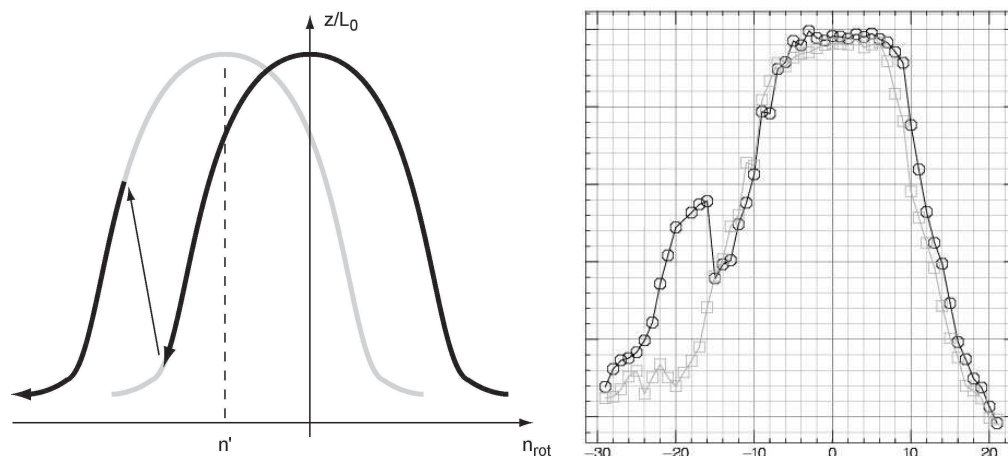


FIG. 9.8: Décrochement dans la courbe extension-torsion d'une molécule d'ADN en partant d'un surenroulement positif. [G] Schéma de principe. La courbe de départ est celle de l'ADN nu. Le système suit le chemin en trait noir, puis saute sur la courbe en chapeau de l'ADN décalée à gauche. [D] Données expérimentales. La courbe de référence est en carrés et trait gris, la courbe mesurée en présence d'ARN polymérase est en cercles et trait noir. Le décalage estimé est de 7,7 tours, correspondant à l'insertion de 7 molécules d'ARN Polymérase de T7 dans l'ADN.

A partir d'un surenroulement initialement négatif, nous observons qu'au moins une ARN polymérase est généralement insérée dans l'ADN. A l'issue d'un aller-retour en surenroulement, elle aura été généralement éjectée, puis éventuellement une (ou plusieurs) ARN polymérase se sera insérée à nouveau. Cette mesure nous permet donc de mesurer le nombre de protéines insérées dans l'ADN dans différentes situations sans avoir à observer de traces de l'extension de l'ADN en fonction du temps.

9.2.5 Visualisation de l'insertion en présence de bruit

Pour éviter la présence de bulles de dénaturation il est nécessaire de travailler à faible force. Par conséquent, les fluctuations en z de l'ADN sont importantes. Si la molécule d'ADN choisie est longue (par exemple dans le cas de la séquence codant pour la répétition $24 \times MS2$: 9.3 p.163), l'amplitude totale du bruit en z peut masquer des événements d'insertion d'une ARN polymérase (correspondant à un allongement d'environ 50-60 nm).

Cependant, l'insertion d'ARN polymérase peut être vérifiée *a posteriori* par une méthode indirecte. Cette méthode repose sur le fait que la stabilité du complexe entre l'ARN polymérase et l'ADN est une fonction décroissante de la contrainte de torsion σ (voir les expériences de la section 9.2.4).

A partir d'un substrat légèrement surenroulé négativement ($\sigma \leq 2\%$), nous augmentons le surenroulement jusqu'à $\sigma \sim +3 \rightarrow +8\%$. L'extension de l'ADN suit la courbe «en chapeau» et passe par un maximum avant de se stabiliser à une extension inférieure à celle de départ. Au cours de cette étape, les molécules d'ARN polymérase éventuellement présentes ont été éjectées.

Après un temps d'attente d'environ une seconde, nous diminuons le surenroulement jusqu'à sa valeur initiale. L'extension passe à nouveau par un maximum avant de diminuer

uer.

Deux cas sont alors possibles (*cf.* Fig 9.9 p. 161) :

- si aucune ARN polymérase n'était présente initialement dans l'ADN, l'extension de l'ADN au retour est identique à celle à l'aller ;
- si une ARN polymérase était présente initialement, son éjection dans la région $\sigma > 0$ a pour conséquence la disparition de la bulle de dénaturation de 9 - 12 bp dans laquelle elle se logeait, et par conséquent une diminution d'extension de l'ADN au retour d'environ 50-60 nm par rapport à l'extension à l'aller

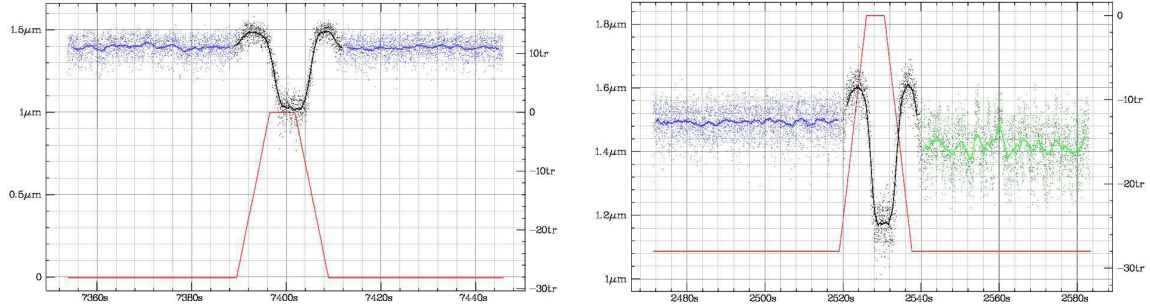


FIG. 9.9: Trace de l'extension de l'ADN suite à un aller-retour en torsion entre -2.3% et +3.0%. Le zéro de rotation correspond à -12 tours et la longueur cristallographique de l'ADN est de $1.9 \mu\text{m}$. Les points correspondant à l'extension de départ sont en bleu, ceux correspondant à l'éjection d'ARN polymérase sont en vert. Dans chaque condition, un filtrage sur 128 points (1.4 s) est également représenté. La concentration en RNAP est de $2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, celle en rNTP est de $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. [G] Pas de changement d'extension. [D] Changement d'extension correspondant à l'éjection d'une ARN Polymérase de T7. Analyse dans la figure 9.10.

Notons que l'absence de changement d'extension entre l'aller et le retour signifie simplement que les états sont les mêmes, pas qu'aucune ARN polymérase ne s'est complexée : elle a pu ne pas se détacher dans la région $\sigma > 0$, ou bien reformer un complexe avec l'ADN le temps du retour à $\sigma < 0$. Cependant, si les changements de σ sont faits rapidement, et si la torsion est suffisamment positive pour bien éjecter toute ARN polymérase présente, la différence d'extension entre l'aller et le retour sera une mesure du nombre d'ARN polymérase insérées.

Dans une trace $z(t)$ continue de l'extension de l'ADN, le bruit empêche de déceler les événements d'insertion. En forçant toutes les ARN polymérase à être éjectées à un moment que nous choisissons, cet aller-retour *synchronise* le système. Plutôt que d'avoir à chercher un événement dans une trace bruitée, nous n'avons plus qu'à comparer l'extension avant et après cette synchronisation. Il nous suffit pour cela de tracer l'historique de $z(t)$ et de déterminer la distance entre les deux valeurs moyennes (*cf.* Fig 9.10 p. 162).

9.2.6 Visualisation en présence de bruit (suite)

Dans des conditions expérimentales favorables à l'insertion d'ARN polymérase dans l'ADN, l'état formé au retour est un ADN dépourvu de polymérase. Si la durée de vie de cet état est relativement faible (1-10 s), une insertion d'ARN polymérase interviendra rapidement après un cycle aller-retour (*cf.* Fig 9.11 p. 162) ; ce cycle a donc pour effet d'activer l'insertion de l'ARN polymérase au moment que nous avons choisi.

En fournissant à tout moment une référence propre d'extension de l'ADN sans ARN polymérase (juste après le retour), cette synchronisation nous facilite également beaucoup

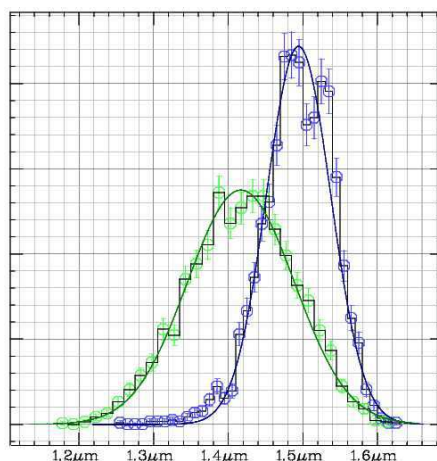


FIG. 9.10: Analyse de l'évènement d'éjection présenté dans la figure 9.9. L'histogramme en bleu représente les points avant l'aller-retour en torsion, celui en vert l'extension à l'issue de l'aller-retour. L'ajustement de ces deux histogrammes conduit à un changement d'extension apparent de 77 ± 2 nm.

la détection des évènements ultérieurs ; elle joue en quelque sorte le rôle d'une remise à zéro des dérives à temps long de l'extension.

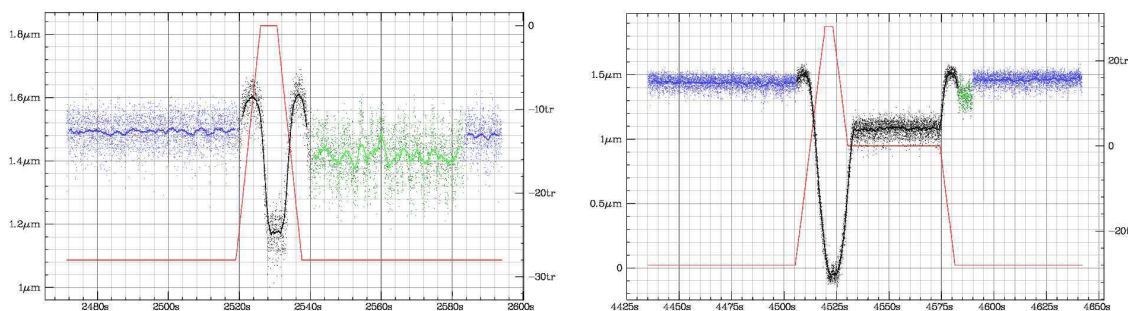


FIG. 9.11: Insertion de l'ARN Polymérase de T7 dans un ADN rapidement après un aller-retour en torsion. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles décrites dans la figure 9.9. [G] Vue étendue de l'évènement présenté dans les figures précédentes (σ varie de -2.3% à $+3.0\%$ puis à nouveau à -2.3%). [D] Évènement montrant que l'insertion ne se fait pas lors de la pause à $\sigma = +2.3\%$ mais est rapide à l'état final (σ varie de -2.3% à $+8.3\%$ puis à $+2.3\%$ et enfin à -2.3%).

9.2.7 Complexe pré-chargés

Pour augmenter la probabilité que, pour un ADN observé donné, celui-ci forme un complexe actif, nous avons reproduit plusieurs méthodes de pré-chargement de l'ARN polymérase sur l'ADN.

Complexes bloqués en élongation

Le gène inséré en aval du promoteur de T7 possède la séquence suivante : (+1)-AGG GAG ACC CAA GCT-(+15) GGC TAG... Le premier nucléotide rUTP incorporé est donc en position +15. Lorsque le complexe protéique atteint cette position, il s'est néces-

sairement détaché du promoteur et se trouve dans l'état d'élongation \mathbf{RP}_e (voir la partie 7.2.2 p.123).

Nous avons utilisé un protocole analogue à celui décrit dans la littérature (Thomen 2002; Thomen 2008) : dans du tampon de transcription (p. 283) supplémenté à $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de glutamate de potassium, nous introduisons l'ARN Polymérase de T7 ($200 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) et un mélange des trois nucléotides rATP, rCTP et rGTP à $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ chacun. Pour aider à stabiliser le complexe bloqué, nous introduisons éventuellement du rUDP ($400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (Huang 2000).

Les complexes ADN:bille préalablement incubés sur la surface sont caractérisés (calibration de la mesure de z , courbe extension-torsion) puis mis en présence de ce mélange pendant une dizaine de minutes. Pour une partie des ADN observés, une molécule d'ARN polymérase devrait s'être insérée au niveau du promoteur puis être entrée dans l'état \mathbf{RP}_{itc} et éventuellement s'être détachée du promoteur et être dans l'état \mathbf{RP}_e .

Au niveau du nucléotide +14, le complexe s'arrête alors nécessairement par absence de rUTP. En présence de rUDP, le complexe est probablement stabilisé par interaction dans la poche catalytique, mais sans possibilité d'hydrolyse.

Nous suppléons alors le milieu en rUTP en rinçant la chambre expérimentale avec du tampon de transcription (p. 283) contenant les quatre ribonucléotides ($400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Comme le complexe est déjà en élongation, les cycles d'ouverture et fermeture de la bulle de dénaturation ne sont plus observables et l'extension de l'ADN ne varie pas. Dans un certain nombre de cas, nous observons cependant une diminution brusque et irréversible de l'extension de l'ADN, d'environ 50 à 100 nm, quelques secondes après injection des quatre nucléotides (données non présentées).

Nous interprétons ce saut comme la terminaison de la transcription et le détachement de l'ARN Polymérase de T7 de l'ADN. Comme cette expérience, de type *one shot* est destinée à préparer des complexes fluorescents (avec une ARN polymérase marquée) bloqués, nous nous sommes plutôt concentrés sur la préparation des ARN polymérase fluorescentes que sur la caractérisation du complexe bloqué en élongation. Les observations obtenues et la reproductibilité des résultats de la littérature nous laissent bon espoir que le protocole que nous avons employé est efficace.

9.3 Marquage fluorescent de l'ARN

Au delà du marquage fluorescent de l'ARN polymérase, nous avons envisagé différentes stratégies de marquage de l'ARN transcrit. Le marquage direct de l'ARN Polymérase de T7 étant une priorité, nous avons simplement effectué des expériences de principe pour ces différentes stratégies.

9.3.1 Incorporation de nucléotides fluorescents

Nous avons montré dans la partie 8.5 (p.148) que l'ARN Polymérase de T7 que nous avons purifiée est capable d'incorporer en volume un analogue fluorescent du rATP, à concentration totale des différentes formes de l'ATP égale à $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Nous avons alors testé l'activité de l'ARN Polymérase de T7 ($240 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) en molécules uniques en présence uniquement du dérivé ATP:Alexa647 ($25 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Pour augmenter la processivité du complexe, nous avons amené les concentrations des autres nucléotides rUTP, rGTP, rCTP à $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ chacun. Pour avoir des événements les plus clairs possibles, nous avons travaillé à $\sigma = -1.5\%$ et $F = 0.19 \text{ pN}$.

Dans ces conditions, nous observons de rares sauts, mais d'assez grande amplitude (100 nm) (*cf.* Fig 9.12 p. 164). La rareté des événements ne nous permet pas de déterminer

si ces sauts sont attribuables à un complexe \mathbf{RP}_o en l'absence d'ATP (donc à longue durée de vie) ou à des complexes \mathbf{RP}_{itc} faisant de longues pauses en attendant l'arrivée ou l'hydrolyse d'un ATP:Alexa647.

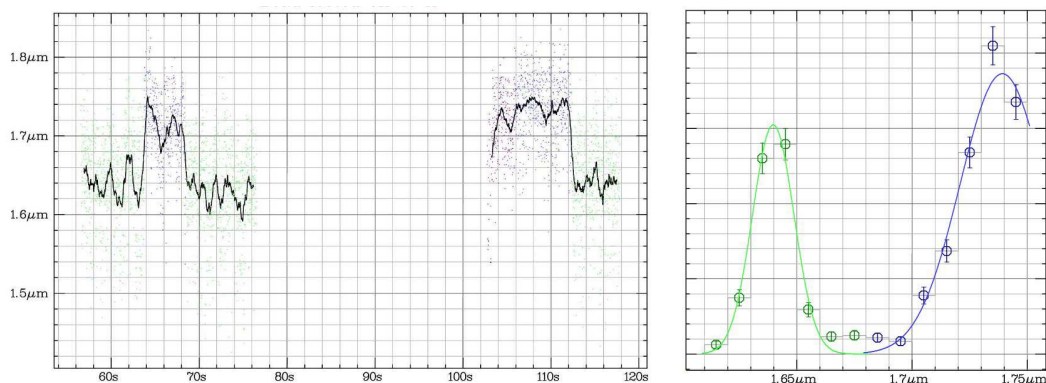


FIG. 9.12: Activité de l'ARN Polymérase de T7 commerciale ($240 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) en présence de rUTP, rGTP, rCTP ($500 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), rATP:Alexa647 ($25 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) et KGlu ($25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) à $\sigma = -1.5\%$. [G] Trace de l'extension de l'ADN (points expérimentaux) et signal filtré sur 64 points (0.7 s). [D] Histogramme des extensions relevées, montrant un saut de $100 \pm 27 \text{ nm}$.

9.3.2 Sonde fluorescente

Connaissant la séquence d'ADN transcrite, nous avons conçu une série d'oligonucléotides complémentaires de l'ARN à différentes étapes de l'élongation. Ces oligonucléotides portent une base modifiée, marquée avec un fluorophore (en l'occurrence la fluorescéine) ou une biotine.

En présence d'ARN polymérase et de nucléotides, l'ARN transcrit au cours de l'élongation va former une pelote statistique au voisinage de la polymérase. La longueur de persistance de l'ARN simple brin, en admettant qu'il ne forme pas de structures secondaires, étant très faible (1-2 nm (Liphardt 2001; Seol 2007)), le rayon de giration du transcrit sera donc de l'ordre de 20 nm.

Nous nous attendons donc à voir apparaître à un moment donné la fluorescence de la sonde presque colocalisée avec l'ARN polymérase. Nous pensons donc que les questions évoquées dans la partie 7.4 pourront également être approchées par cette méthode, qui ne nécessite pas d'introduire un élément extérieur sur l'ARN polymérase.

Cette méthode peu perturbative présente également l'avantage de pouvoir accéder à des éléments de cinétique. En effet, l'utilisation non plus d'une, mais d'une série de sondes permettrait d'observer l'avancée de la transcription par des augmentations successives du signal de fluorescence.

9.3.3 Marquage secondaire de l'ARN

Le bactériophage MS2, un phage à génome d'ARN simple brin, est capable d'inhiber la traduction de sa propre réplicase (Peabody 1990) en séquestrant par la protéine de la capsid une petite structure secondaire d'ARN située sur le site de traduction de la réplicase : AAC AUG AGG AUU ACC CAU GU. La constante d'association est de l'ordre de $10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Talbot 1990).

Depuis ces observations, ces propriétés ont été utilisées pour développer un système de marquage de l'ARN *in vivo* et *in vitro* par un grand nombre de groupes. Nous avons

obtenu (par X. DARZACQ) un plasmide contenant le promoteur de l'ARN Polymérase de T7 et dont le transcrit contient 24 répétitions du motif. Par ailleurs, nous avons également obtenu (par T. LIONNET) la protéine MS2 marquée par un *His-tag*. Par marquage secondaire avec un anticorps fluorescent, nous pouvons donc générer un transcrit très brillant qui permettra de suivre l'ARN polymérase au cours de l'élongation.

Bien que nous ayons utilisé le substrat contenant la séquence codant pour le transcrit $24 \times MS2$, nous n'avons pas encore effectué d'expérience de transcription *in vitro* en présence de la protéine MS2 fluorescente.

Conclusion

Technique	Ref	Résultats	Perspectives
Diagramme de phases	9.2.2	Définition d'une zone où les signaux sont clairement attribuables à la RNAP	
Insertion à σ fixé	9.2.3	Evènements de molécule uniques observés	Distinction de l'état \mathbf{RP}_{itc} , mesures de la distribution des temps dans chacun des états
Sensibilité à la torsion	9.2.4	Insertion à $\sigma < 0$ et éjection à $\sigma > 0$	
Insertion à σ variable	9.2.5	Observation <i>a posteriori</i> de la présence d'une molécule de RNAP	Observations en conditions bruitées (faible force), synchronisation de l'insertion à un moment choisi par l'utilisateur
Excursions à $\sigma \ll 0$	9.2.6	Activation de l'insertion de la RNAP	Remise à zéro de l'état de référence correspondant à \mathbf{RP}_c
Complexes pré-chargés	9.2.7	Préparation de complexes bloqués en élongation	Synchronisation du départ de l'élongation
Incorporation de rNTP marqués	9.3.1	Incorporation efficace des nucléotides modifiés	Obtention d'un ARN fluorescent très brillant et suivi par microscopie
Sonde d'acide nucléique marqué	9.3.2	-	Obtention d'un ARN fluorescent et suivi par microscopie
Marquage secondaire de l'ARN	9.3.3	-	Obtention d'un ARN spécifiquement fluorescent et suivi par microscopie

TAB. 9.3: Observation en molécules uniques de l'ARN Polymérase de T7, principaux résultats et perspectives.

Nous avons donc développé une série de méthodes directes et indirectes de détection mécanique en molécules uniques de l'activité d'insertion et de transcription de l'ARN polymérase. Ces méthodes sont applicables en présence de bruit en z relativement important, consécutif à la zone du diagramme de phases de l'ADN dans laquelle nous devons nous placer.

Pour privilégier la visualisation mécanique directe (donc en temps réel) de l'insertion de l'ARN Polymérase de T7 dans son promoteur, nous souhaitons utiliser de nouveaux

substrats d'ADN, plus courts, qui auront pour effet de diminuer le bruit total en z .

Par ailleurs, nous proposons une série de méthodes de marquage direct et indirect permettant de suivre par microscopie de fluorescence l'activité de l'ARN polymérase. Nous avons montré précédemment les difficultés expérimentales auxquelles nous avons été confrontés pour le marquage direct de la protéine.

Nous proposons par conséquent des solutions alternatives qui ont été déjà été utilisées par d'autres groupes dans des expériences en volume. Cependant, nous restons convaincus de la pertinence du marquage direct de l'ARN Polymérase de T7 et nous avons plutôt concentré nos efforts sur ce point.

10 FtsK et la ségrégation des chromosomes chez *Escherichia coli*

Introduction

Nous allons ici rappeler les principales caractéristiques connues de FtsK, et présenter les questions scientifiques auxquelles nous nous sommes intéressés durant ce travail.

FtsK est une protéine bactérienne, bien étudiée chez *Escherichia coli*, dont l'inactivation *in vivo* entraîne un phénotype de croissance filamenteuse dans lequel les bactéries sont incomplètement séparées les unes des autres et l'ADN génomique est mal ségrégué (Begg 1995). En conditions sauvages, FtsK est localisée au voisinage du *septum* de division marqué par FtsZ (Barre 2000; Wang 2005).

Par ailleurs, il a été montré que FtsK est une protéine nécessaire *in vivo* et nécessaire et suffisante *in vitro* pour activer la recombinaison par le système XerCD (Recchia 1999; Aussel 2002). Lors de la réplication du chromosome circulaire bactérien, des processus de recombinaison homologue ont en effet pour conséquence la production, non pas de deux chromatides-soeurs identiques, mais d'un unique chromosome circulaire de taille double, formé de la dimérisation des deux génomes. En se fixant sur une paire de séquences spécifiques appelées *dif* situées sur chacune des chromatides-soeurs, les recombinases XerCD activent l'échange double brin entre les deux sites et entraînent la résolution du dimère (*cf.* Fig 10.1 p. 167).

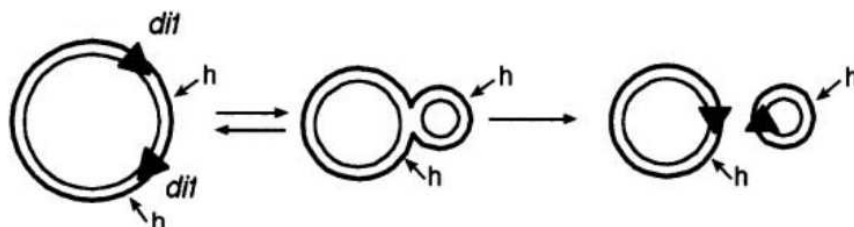


FIG. 10.1: Représentation de la résolution d'un dimère par recombinaison aux sites *dif* (triangles noirs) par le système XerCD. *In vivo*, la recombinaison conduit à deux chromosomes circulaires identiques. Reproduit de (Aussel 2002)

Le rôle de FtsK est alors d'amener le chromosome dans une configuration spatiale telle que les deux sites *dif* sont co-localisés au niveau du *septum* de division, puis d'activer la recombinaison par XerCD.

10.1 FtsK et les protéines ASCE

10.1.1 La superfamille FtsK/HerA

Du point de vue de la structure secondaire, FtsK peut être rapprochée successivement d'une série de classes importantes de protéines.

En premier lieu, elle est phylogénétiquement reliée à l'hélicase HerA présente chez les *archae*. En compagnie également de son homologue SpoIIIE chez *Bacillus subtilis* et

de la protéine de conjugaison TrwB chez *Escherichia coli*, FtsK forme ainsi la super-famille FtsK/HerA (cf. Fig 10.2 p. 168). Des études biochimiques et structurales menées sur ces protéines et les *ssDNA/dsDNA phage packaging motors* qui leurs sont apparentées montrent qu'elles forment généralement un anneau hexamérique autour de l'ADN et fonctionnent comme des pompes par un mécanisme de translocation. C'est par exemple le cas de TrwB chez *Escherichia coli* (Gomis-Rüth 2001; Hormaeche 2002; Cabezon 2006), de MlaA chez *Pyrococcus furiosus* (Manzan 2004), de SpoIIIE chez *Bacillus subtilis* (Ptacin 2008) ou de gp16 chez le bactériophage $\phi 29$ (Morais 2008). Dans ce dernier cas, l'anneau formé est pentamérique.

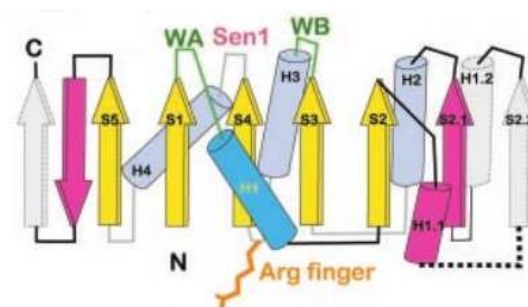


FIG. 10.2: Représentation schématique de la structure secondaire de FtsK. L'importance des sites WA, WB et *Arginine finger* sera soulignée dans le chapitre 12 p. 195. Figure reproduite de (Iyer 2004b) Fig. 1.

La richesse des données structurales et biochimiques connues dans cette superfamille permet de mettre en rapport les modèles d'activité postulés pour FtsK et ceux connus pour les protéines apparentées (cf. 10.3 p. 174).

10.1.2 ASCE core ATPases

Les protéines de la superfamille FtsK/HerA partagent de façon plus large des homologies de structure secondaire avec des protéines interagissant toujours avec l'ADN, mais à l'activité plus variée, comme les recombinases de la famille RecA/Rad51, l'hélicase hexamérique de terminaison de la transcription Rho (Finger 1982), les hélicases monomériques des superfamilles I (UvrD, RecB) et II (RecQ) impliquées dans la réparation et la recombinaison de l'ADN et les hélicases hexamériques répliquatives de la famille dnaB : dnaB (Bailey 2007), T4gp41, T7gp4 (Egelman 1995). Les données tant structurales que mécanistiques sur ces protéines sont également abondantes.

Ce supergroupe, appelé *RecA-like ATPases* peut à son tour être mis en relation avec un important supergroupe, appelé AAA+ (*ATPases Associated with various Activities*). Ce dernier comprend notamment les hélicases virales de la superfamille III (SV40, Rep) et de manière générale un ensemble de protéines aux fonctions extrêmement variées (Iyer 2004a; Erzberger 2006; Tucker 2007) comme par exemple ClpX (Grimaud 1998), un composant du protéasome de *Escherichia coli*, qui joue le rôle d'une hélicase pour les protéines et sur lequel des expériences comparables à celles du chapitre 11 p. 183 ont été mises en oeuvre (Martin 2005).

Ces deux supergroupes se rattachent finalement à un motif commun, appelé *ASCE core* (cf. Fig 10.3 p. 169). Les protéines qui le composent constituent probablement la filiation d'un ancêtre commun (Iyer 2004a); leur étude comparative avec FtsK nous permet par conséquent de postuler des éléments structuraux et mécanistiques raisonnables.

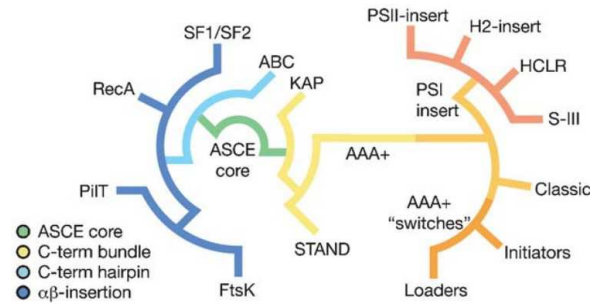


FIG. 10.3: Représentation schématique des protéines apparentées structurellement et phylogénétiquement à FtsK. Des exemples de la plupart des familles sont cités dans le texte. Figure reproduite de (Erzberger 2006) Fig. 1a.

10.2 Structure et activité *in vitro* de FtsK

Nous allons ici rappeler les principales données structurales et mécanistiques connues sur FtsK.

10.2.1 Structure primaire et secondaire

Du point de vu de la séquence primaire, toutes les FtsK connues (en particulier chez *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Haemophilus influenzae*) sont structurées en trois grands domaines : une partie N-terminale FtsK_N transmembranaire très hydrophobe, un *linker* riche en proline et glutamine et un domaine cytosoluble FtsK_C (cf. Fig 10.4 p. 169).



FIG. 10.4: Structure primaire de FtsK de *Escherichia coli*. Reproduit de (Sivanathan 2006) Fig. 1A.

Le domaine FtsK_N se positionne au septum de division cellulaire pour coordonner la ségrégation des chromosomes et la division (Barre 2000; Wang 2005). Il est essentiel à la division mais pas à la recombinaison ni la résolution de dimères de chromosomes (Dubarry 2010). Du fait de son insolubilité, les protéines utilisées pour tester l'activité *in vitro* sont des mutants FtsK_{ΔN}, à l'exception d'un domaine de 50 acides aminés présents dans le variant FtsK_{50C} pour en faciliter la multimérisation.

Le *linker* est de taille variable, mais essentiel à la division cellulaire et la recombinaison aux sites *dif* (Bigot 2004).

Sur la base de critères de structure secondaire, le domaine C-terminal peut être séparé en trois sous-unités α , β et γ . FtsK_{C α} est une sous-unité ATPase spécifique à la famille FtsK/SpoIIIE/Tra. Elle est séparée de FtsK_{C β} par un court bras de quelques acides aminés.

L'ATPase RecA-like FtsK_{C β} peut être rapprochée de la famille beaucoup plus large des ATPases ASCE (Iyer 2004b; Erzberger 2006), en particulier les hélicases de la superfamille I/II et de la superfamille recA-like.

Le sous-domaine FtsK_{C γ} est à la fois le domaine de lecture de la séquence de l'ADN (Sivanathan 2006; Ptacin 2006; Löwe 2008) et celui d'interaction avec XerD (Yates 2006).

Il est relié à FtsK_{Cβ} par une séquence intrinsèquement flexible et sa structure ne peut donc être résolue en même temps que celle du domaine moteur FtsK_{Cαβ}.

10.2.2 Activité *in vitro*

Activité ADN translocase

Des expériences en volume (Aussel 2002; Levy 2005; Bigot 2006) et en molécules uniques (Saleh 2004; Pease 2005; Ptacin 2006) ont mis en évidence l'activité ADN translocase de FtsK_C *in vitro*. Dans certaines conditions, FtsK peut inverser son sens de translocation. La vitesse de translocation observée est de l'ordre de 5000 bp·s⁻¹ et la processivité peut être aussi élevée que 15000 bp; FtsK est à ce jour la translocase la plus rapide connue, quel que soit le type de substrat.

Par ailleurs, FtsK est capable de déplacer des structures secondaires de l'ADN comme des cruciformes et des triplex (Aussel 2002; Bigot 2005; Levy 2005), ainsi que des liaisons streptavidine-biotine (Croizat 2010).

La vitesse de translocation est insensible à la force de tension de l'ADN jusqu'à environ 40 pN (Saleh 2004); la force d'arrêt (jamais mesurée) est supérieure à la force de décrochement de FtsK de l'ADN (60 pN) (Pease 2005).

Lecture de la séquence d'ADN

L'activité *in vivo* de FtsK, d'activation de la recombinaison au site *dif* des dimères de chromosomes bactériens, nécessite une directionnalité de la translocation de FtsK le long de l'ADN. Il a été montré indépendamment que le chromosome bactérien contient des séquences spécifiquement orientées en direction des sites *dif* (Cornet 1996; Kuempel 1996; Péral 2000). Des expériences *in vitro* (Pease 2005) ont confirmé l'inversion reproductible du sens de translocation de FtsK sur une molécule d'ADN de polarité inverse.

Par analyse bioinformatique ont été proposées des séquences appelées dans un cas FRS (FtsK Recognition Sequence) : GNGNAGGG (Levy 2005) et dans l'autre KOPS (FtsK Orienting Polar Sequence) : GGGNAGGG (Bigot 2005). De manière analogue, des séquences candidates pour expliquer la directionnalité de la translocation de SpoIIIE chez *B. subtilis* ont été proposées : SRS (SpoIIIE Recognition Sequence), GAGAAGGG (Ptacin 2008).

Dans les trois cas ces séquences, introduites de manière contrôlée dans un substrat d'ADN, ont été identifiées comme interagissant effectivement avec SpoIIIE (Ptacin 2008) ou FtsK en pinces optiques (Pease 2005), pinces magnétiques (Ptacin 2006; Bigot 2006) ou en volume (Bigot 2005).

Bien que ces expériences montrent que les KOPS sont reconnues par FtsK, leur activité n'est sans doute pas de coupler la translocation et la lecture de la séquence d'ADN. Ils pourraient plutôt jouer le rôle de séquences de chargement polaire (Bigot 2006) (et *vide infra*).

Introduction de torsion

In vitro, FtsK est capable d'introduire des contraintes de torsion dans l'ADN. La résolution en volume d'une jonction de HOLLIDAY en forme de \propto s'accompagne de la libération d'un plasmide dont le degré de surenroulement est mesuré par migration 2D en présence de chloroquine (Aussel 2002).

De plus, la translocation de FtsK sur un plasmide à surenroulement fixé, en présence de TopIA qui a pour effet de relaxer le surenroulement négatif conduit à un ensemble de

plasmides surenroulés positivement (Massey 2006). FtsK semble donc en particulier capable de compartimenter le plasmide en deux régions indépendantes où le surenroulement positif et négatif créés ne s'annihilent pas mutuellement.

Une étude quantitative, en molécules uniques, montre que la translocation de FtsK sur un ADN contraint en rotation s'accompagne de l'introduction de surenroulement positif, à raison de $+1/150$ de tour par base parcourue (Saleh 2005). En effet, sur un ADN possédant un *nick*, l'ADN subit un raccourcissement global, qui est explicable par la formation d'une boucle qui séquestre une partie de la longueur de l'ADN. D'autre part, sur un ADN linéaire contraint en torsion et préalablement surenroulé négativement, les plectonèmes présents sont titrés par l'introduction de torsion (positive) hors de la boucle ; le bilan de la variation de longueur combinée de la formation de la boucle et de la disparition des plectonèmes conduit à un *allongement* de l'ADN au fur et à mesure de la translocation de FtsK.

Stimulation de l'activité recombinase

La résolution du dimère de chromosomes formé par recombinaison homologue lors de la réplication du génome est réalisée par le système XerCD. Elle consiste en un échange de brins réalisé sur un site spécifique (*dif*) situé en deux copies disposées exactement anti-symétriquement sur le chromosome.

Bien que seuls XerC et XerD soient essentiels à la résolution du dimère, FtsK active fortement l'activité du complexe (Aussel 2002). Cette activation provient d'une part de l'activité translocase de FtsK, qui contribue à positionner les deux sites *dif* à proximité l'un de l'autre. D'autre part, FtsK active directement le système XerCD en déclenchant un changement d'état catalytique dans les recombinases (Aussel 2002).

L'étude d'une forme fortement tronquée mais encore processive FtsK_{50C} (Aussel 2002) puis d'un fragment essentiellement de type FtsK_{C γ} (Yates 2006) ont montré que la sous-unité γ interagit directement avec la partie C-terminale de la recombinase XerD et active alors la recombinaison.

10.2.3 Structure tertiaire et quaternaire

FtsK_{C $\alpha\beta$} : structure générale

La structure de FtsK _{ΔN} , notée FtsK_C pour plus de simplicité, a été obtenue en présence d'ions magnésium et d'ATP- γ S (*cf.* Fig 10.5 p. 171). Elle montre en particulier la structuration secondaire en deux sous-unités α et β et la poche d'interaction avec l'ATP de FtsK_{C β} . Dans ces conditions, l'unité de cristallisation est un dimère tête-à-queue de deux FtsK_C. La sous-unité γ n'est pas visible car son lien flexible avec β fait qu'elle adopte une configuration désordonnée en moyenne.

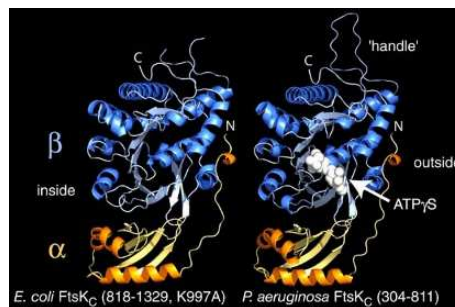


FIG. 10.5: Structure de FtsK_C. Reproduit de (Massey 2006) Fig. 3A.

Dans les mêmes conditions, $FtsK_{C\Delta\gamma} \equiv FtsK_{C\alpha\beta}$ cristallise sous forme d'hexamères. Les six sous-unités α et les six sous-unités β forment deux anneaux concentriques et superposés, définissant un canal intérieur de 3,0 nm de diamètre (*cf.* Fig 10.6 p. 172).

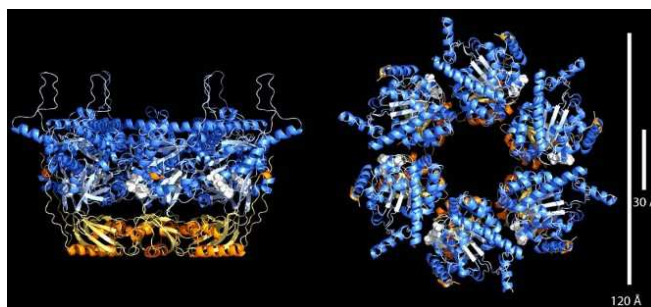


FIG. 10.6: Structure de $FtsK_{C\alpha\beta}$. Reproduit de (Massey 2006) Fig. 3B.

10.2.4 $FtsK_{C\alpha\beta}$: interaction avec l'ADN

Ce canal est capable d'accommoder un ADN double brin en phase B sans déformation significative (*cf.* Fig 10.7 p. 172). En particulier, aucun raccourcissement de l'ADN lors de la fixation d'un complexe de *FtsK* n'est visible en électro-microscopie (Massey 2006). Le mode d'interaction n'est donc pas de type *wrapping* ou *looping* mais probablement *threading*. L'analyse d'échantillons en électro-microscopie et cryo-électromicroscopie confirme cette structure. Selon les cas, le complexe peut être formé d'un seul hexamère ou de deux hexamères tête-à-tête (cette configuration pourrait expliquer la formation de boucles d'ADN *in vitro*), *cf.* p. 174).

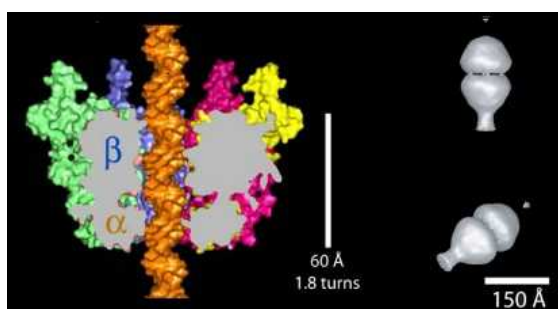


FIG. 10.7: [G] Structure modélisée du complexe $FtsK_{C\alpha\beta}$ -ADN. Reproduit de (Massey 2006) Fig. 3D. [D] Structure observée de complexes $FtsK_{C\alpha\beta}$ -ADN à concentration sous-saturante en *FtsK*. Reproduit de (Massey 2006) Fig. 4B.

La formation de ces hexamères ne requiert que la présence de dsDNA d'au moins 15 bp. En particulier, la multimérisation est indépendante de la concentration en nucléotides et magnésium (Massey 2006) et de la séquence de l'ADN.

Par contraste avec la plupart des hélicases des superfamilles III et *dnaB*, l'interaction avec un site donné de l'ADN est réalisée par des résidus d'un seul monomère et ne requiert pas la mise en commun de résidus de monomères voisins. Pour chaque monomère de $FtsK_{C\alpha\beta}$ se trouvent deux sites d'interaction avec l'ADN : un sur la sous-unité α et l'autre sur la sous-unité β .

FtsK_{Cαβ} : activité ATPase et changement conformationnels

En présence d'ATP- γ S, le complexe peut être cristallisé ; les nucléotides présents dans la poche ATPase des sous-unités γ sont majoritairement sous forme ADP dans l'hexamère et ATP- γ S dans les dimères. Cela indique que, dans les conditions de cristallisation, la formation de l'hexamère s'est accompagnée de l'hydrolyse de l'ATP. Des expériences *in vitro* montrent parallèlement que, sous forme monomérique, FtsK_C ne possède pas d'activité ATPase (même avec un ATP hydrolysable), ni ADN translocase, ni d'activation des recombinaisons (Aussel 2002).

De plus, l'analyse de la région FtsK_{Cαβ} par comparaison entre les formes ATP- γ S (dimères) et ADP (hexamères) permet de montrer le changement structural qui s'opère lors de l'hydrolyse de l'ATP (*cf.* Fig 10.8 p. 173). Par comparaison avec les points d'interaction des sous-unités α et β avec l'ADN, le mouvement de balancier résultant conduit au détachement de α et à l'attachement de β , avec une variation de l'éloignement relatif des deux sous-unités de 0.55 nm, soit 1.6 bp. Le retour de α à son état initial correspondrait pour un cycle catalytique à un déplacement net de FtsK par rapport à l'ADN.

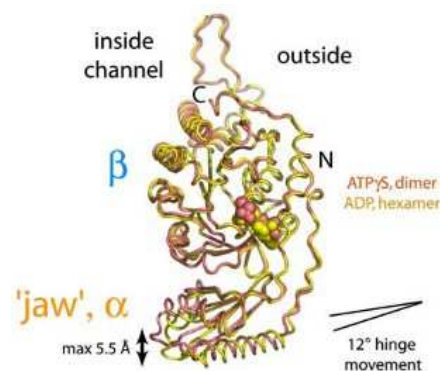


FIG. 10.8: Changement conformationnel résultant de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP par la sous-unité β . Reproduit de (Massey 2006) Fig. 5A.

Lors du changement de point d'attachement de α à β , les boucles d'acides aminés concernés sont situés presque exactement l'une au-dessus de l'autre, à une distance d'un pas hélical. L'hydrolyse de l'ATP et le détachement de α n'induisent donc pas de rotation relative de FtsK par rapport à l'ADN, au contraire du réattachement de α (*vide infra*).

Ces changements conformationnels sont une base possible d'explication pour l'activité ADN translocase observée *in vitro*. Cependant, bien que suspectée par analogie structurale avec SpoIIIE, la réalité de l'activité de ségrégation chromosomique *in vivo* est encore discutée (Allemand 2009). En particulier, le taux de mortalité de *Escherichia coli* possédant un mutant FtsK sans activité ATPase est identique au taux de dimérisation du chromosome, ce qui laisse à penser que seule l'activation par FtsK de la résolution des dimères par XerCD ne peut pas être complétée.

FtsK_{Cγ} : interaction avec la séquence de l'ADN

Des études RMN (Sivanathan 2006) et cristallographiques (Löwe 2008) ont permis d'obtenir la structure à 0.19 nm de FtsK_{Cγ} interagissant avec un motif KOPS (*cf.* 10.3.6 p. 180), ici de séquence GGGCAGGG. Elles montrent que trois molécules de FtsK_{Cγ} interagissent respectivement avec les deux triplets GGG et le doublet CA (*cf.* Fig 10.9 p. 174). Seuls trois FtsK_{Cγ} par hexamère semblent donc être nécessaires à la lecture de la séquence d'ADN.

De manière analogue, l'homologue SpoIIIE chez *B. Subtilis* exhibe également une reconnaissance de séquence analogue à FtsK (Ptacin 2008). L'interversion des domaines $C\gamma$ de FtsK et SpoIIIE conduit à des protéines chimères reconnaissant les séquences d'orientation de l'autre protéine (Ptacin 2008).

Par ailleurs, dans la même conformation du trimère $3\times FtsK_{C\gamma}$, la séquence KOPS rencontrée en sens opposée GGGACGGG n'est pas reconnue, ce qui indique que FtsK est sensible à la polarité de l'ADN si des séquences KOPS sont présentes. Cependant, puisque FtsK ne semble pas capable de reconnaître les KOPS lorsqu'elle les rencontre dans le «mauvais» sens, cela signifie que le motif KOPS est probablement une séquence de chargement polaire de FtsK sur l'ADN plutôt que de reconnaissance de l'orientation de l'ADN.

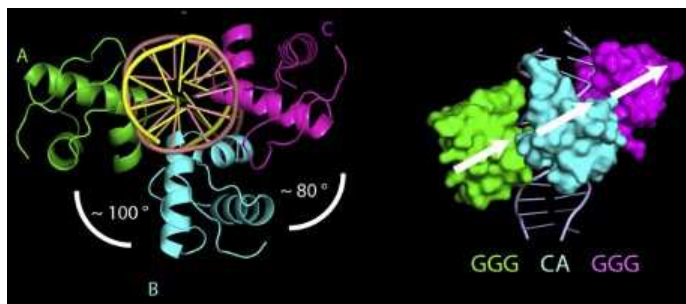


FIG. 10.9: Structure du complexe KOPS-FtsK $C\gamma$. Reproduit de (Löwe 2008) Figs. 1C et 1F.

10.3 Modèles structuraux et mécanistiques de FtsK

10.3.1 Introduction

A la lumière des données présentées dans la section précédente, nous allons discuter ici un ensemble de modèles vraisemblables de l'activité de FtsK. Nous mettrons également en rapport ces modèles avec les typologies et les résultats établis pour des protéines proches de FtsK, en particulier dans la superfamille FtsK/HerA.

10.3.2 Composition de l'unité moteur

La plupart des protéines de la famille ASCE, et en particulier les analogues proches de FtsK, conduisent *in vitro* à des complexes hexamériques avec leur substrat (*cf.* Tab. 10.1 p. 175). Dans ce cas, les multimères forment un anneau autour de leur substrat, analogue à celui présenté pour FtsK $C_{\alpha\beta}$ (*cf.* Fig 10.7 p. 172).

L'étude par ultracentrifugation de FtsK $C_{\Delta\gamma}$ semble confirmer que cette structure de symétrie 6 est réellement un hexamère (Massey 2006) (et pas un autre multiple de 6 par exemple). Cette structure est formée apparemment par une transition de phase monomère-hexamère sans intermédiaire (dimère, trimère, *etc.*) à une concentration critique en monomère de l'ordre de $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Ces arguments sont en faveur d'un complexe hexamérique comme décrit pour FtsK $C_{\Delta\gamma}$.

La structure des complexes avec l'ADN de FtsK C ou FtsK $_{50C}$, qui sont ceux pertinents dans les expériences en molécules uniques, et à plus forte raison celle des complexes avec la protéine FtsK *in vivo*, n'est pas connue. La structure des complexes de l'ADN avec SpoIIIE, l'homologue de FtsK chez *B. subtilis*, n'a pas non plus été déterminée à ce jour.

Enzyme	Activité	Mult.	Ref	ATPase	Ref
FtsK _{Cαβ}	dsDNA helicase	6×	(Massey 2006)	?	-
SpoIIIE	dsDNA helicase	6×?	-	?	-
MlaA	dsDNA ATPase	6×	(Manzan 2004)	?	-
φ29 gp16	dsDNA helicase	5×	(Morais 2008)	Concertée	(Moffitt 2009)
TrwB	dsDNA ATPase	6×	(Gomis-Rüth 2001)	?	-
RecA	DNA ATPase	1×	(Chen 2008)	-	-
Rho	5'→3' ssRNA helicase	6×	(Finger 1982)	Sequentielle	(Stitt 1998)
UvrD	3'→5' ssDNA helicase	1×	(Lee 2006)	-	-
dnaB	5'→3' ssDNA helicase	6×	(Bailey 2007)	?	-
T7 gp4	5'→3' ssDNA helicase	6×	(Singleton 2000)	Sequentielle	(Crampton 2006)
T4 gp41	5'→3' ssDNA helicase	6×	(Dong 1995)	?	-
E1	3'→5' ssDNA helicase	6×	(Enemark 2006)	?	-
MCM	ss/dsDNA helicase	6×	(Pape 2003)	Mixte	(Moreau 2007)
ClpX	protein helicase	6×	(Grimaud 1998)	Stochastique	(Martin 2005)

TAB. 10.1: Résumé des principales données structurales et de mécanisme d'hydrolyse de l'ATP pour des ATPases de type ASCE. Une revue sur certaines de ces hélicases est donnée dans (Patel 2000).

Cependant, des arguments d'homologie de la structure de FtsK_C avec celle de FtsK_{Cαβ} d'une part, et de FtsK avec celle des protéines de la superfamille FtsK/HerA, nous conduisent à fortement soupçonner l'existence de complexes hexamériques de FtsK avec l'ADN.

Cette intuition est confirmée, au moins dans le cas de complexes de FtsK_C avec des oligomères d'ADN, par des expériences de migration retardée d'oligonucléotides marqués. En l'absence de FtsK_C, une unique bande de migration est observée, correspondant au substrat d'ADN (*cf.* Fig 10.10 p. 175).

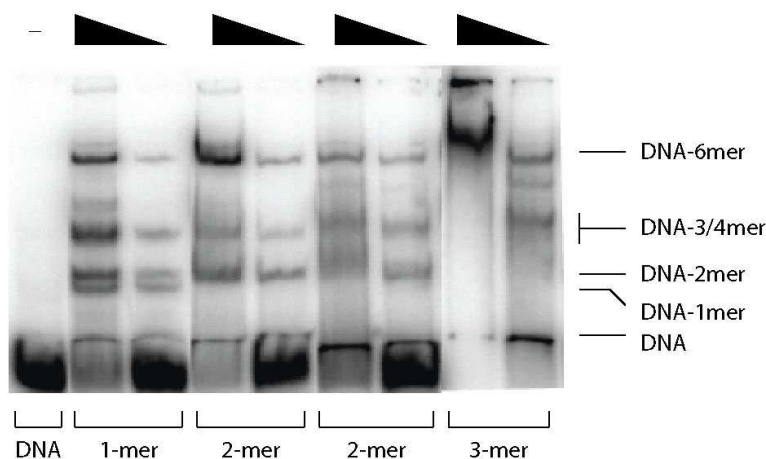


FIG. 10.10: Expérience de migration retardée d'oligonucléotides marqués (35 bp dsDNA) comportant une séquence KOPS. Les données sont cohérentes avec la formation de multimères de FtsK d'ordre élevé. Figure reproduite de (Löwe 2008) Fig. 4.

Des multimères covalents de FtsK_C, correspondant à ceux décrits dans (Crozat 2010), sont introduits en compagnie du substrat. Les complexes formés modifient les propriétés de migration de l'ADN et conduisent à des profils de bandes différents. L'analyse de ces

profils montre de manière concluante que les monomères de $FtsK_C$ forment avec l'ADN des complexes se comportant comme des 3- ou 4-mer. Ils forment également des complexes d'ordre plus élevé, pour lesquels l'explication la plus simple est la formation de 6-mer (le plus petit commun multiple compatible avec les complexes formés respectivement par les 2-mer et 3-mer covalents).

Nous estimons par conséquent que la structure des complexes avec l'ADN de $FtsK_C$, et à plus forte raison des trimères covalents, est un hexamère. Nous appelons cette structure «unité moteur».

10.3.3 Nombre d'unités moteur

Le consensus actuel est que $FtsK$ est présente sur l'ADN sous forme d'une ou plusieurs unités moteur. Ces unités peuvent être des multimères de $FtsK$. Chaque unité possède un vecteur d'orientation intrinsèque (probablement $\alpha \rightarrow \beta$), ainsi qu'un vecteur représentant le dipôle de la «charge» de torsion créée. Le sens de ce dipôle ne dépend que du sens relatif du vecteur d'orientation et du vecteur vitesse de l'unité. Chaque unité moteur peut de plus exister dans une configuration active (du point de vue de l'activité ADN translocase) ou inactive.

Selon les auteurs, la structure du complexe actif peut être classifiée en 3 types (*cf.* Fig 10.11 p. 176)

1. le «simple hexamère» où l'unité moteur est unique, et constituée d'un hexamère de $FtsK$ sur le modèle de la structure cristallographique de $FtsK_{C\Delta\gamma}$ ou en supposant qu'un lien supplémentaire peut être créé avec une surface (Saleh 2004)
2. le «double hexamère» tête-à-tête où les deux unités moteur possèdent un vecteur d'orientation antiparallèle, sur le modèle du dodécamère présent dans certains cristaux de $FtsK_{C\Delta\gamma}$ ou le modèle proposé pour SpoIIIIE (Ptacin 2008)
3. le «double hexamère» tête-à-queue où les deux unités moteur possèdent un vecteur d'orientation parallèle (Pease 2005)

D'autres types de structure, comme une chaîne d'unités moteur sur le modèle du nucléofilament de Rad51 par exemple (Miné 2007), sont envisageables.

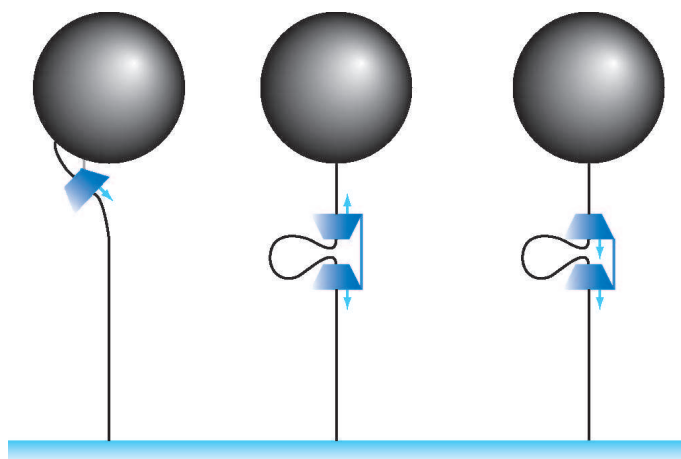


FIG. 10.11: Modèles de la structure du complexe actif de $FtsK$ expliquant la formation de boucles d'ADN. [G] Simple hexamère. [C] Double hexamère tête-à-tête. [D] Double hexamère tête-à-queue.

Activité	1UM	2UM TT	2UM TQ	Expérience
Formation de boucles	Oui	Oui	Oui	Oui
Torsion hors de la boucle	> 0	> 0	> 0	Probablement > 0
Vitesse double	Non	Oui	Non	Non
Evenements <i>kissing KOPS</i>	Non	Oui	Oui	Oui
Rotation lors de la formation de boucle	Oui	Oui	Oui	Pas de données
Retournement d'une UM (rallongement réversible)	Oui	Oui	Non	Pas de données
Translocation sans boucle	Non	Non	Oui	Pas de données

TAB. 10.2: Conséquences des modèles envisagés pour le complexe actif de FtsK sur quelques propriétés mesurables. 1UM : unité moteur simple ; 2UM TT : unité moteur double, tête-à-tête ; 2UM TQ : unité moteur double, tête-à-queue.

L'analyse des données connues en molécule unique sur les complexes de FtsK_{50C} avec l'ADN (Saleh 2004; Pease 2005; Levy 2005; Saleh 2005; Bigot 2005; Sivanathan 2006; Ptacin 2006; Bigot 2006) montre que le modèle le plus raisonnable est celui d'un complexe actif constitué de deux unités moteur tête-à-queue (*cf.* Tab. 10.2 p. 177). Nous proposons par conséquent une expérience permettant de confirmer clairement cette hypothèse, puisque elle seule est compatible avec une activité ADN translocase sans formation de boucles d'ADN. Le marquage fluorescent de FtsK permettrait par conséquent d'une part de confirmer le nombre d'unités moteur dans le complexe, et d'autre part d'observer directement l'activité ADN translocase (en microscopie de fluorescence) en parallèle de la formation de boucles d'ADN (en pinces magnétiques).

10.3.4 Coordination de l'activité ATPase

Modèles de coopérativité

Dans une unité moteur donnée, que nous supposons dorénavant hexamérique pour l'illustration, l'activité ATPase d'un monomère de FtsK peut être, ou pas, couplée à l'activité des autres monomères pour produire une activité donnée.

Le cas le plus simple, appelé *probabiliste* ou *stochastique*, est que les activités ATPase sont totalement indépendantes les unes des autres (*cf.* Fig 10.12 p. 178).

Un degré de coopérativité plus élevé peut être invoqué dans un modèle *séquentiel*. Dans ce cas, l'activité ATPase des différents monomères suit une séquence prédéterminée. Selon les cas, cette séquence peut être *permissive* ou *stricte* selon qu'elle tolère ou non des écarts ponctuels.

Enfin, dans un modèle dit *coordonné*, l'ensemble des monomères accomplit simultanément son activité ATPase.

Conséquences de mutations

La distinction présentée ci-dessus a été appliquée avec succès dans l'étude de la coopérativité de l'activité ATPase dans diverses protéines ASCE : l'hélicase MCM (Moreau 2007), l'hélicase du protéasome ClpX (Martin 2005), l'hélicase de terminaison de la transcription Rho (Stitt 1998), l'hélicase répliquative de T7 (Crampton 2006) et la protéine gp16 de $\phi 29$ (Moffitt 2009). Les résultats de ces études montrent que chacun des modèles décrits possède au moins un représentant dans la famille ASCE (*cf.* Tab. 10.1 p. 175).

Le principe général de ces expériences consiste à introduire, dans un certain nombre n de monomères du complexe actif, une mutation conduisant à l'abolition de l'activité

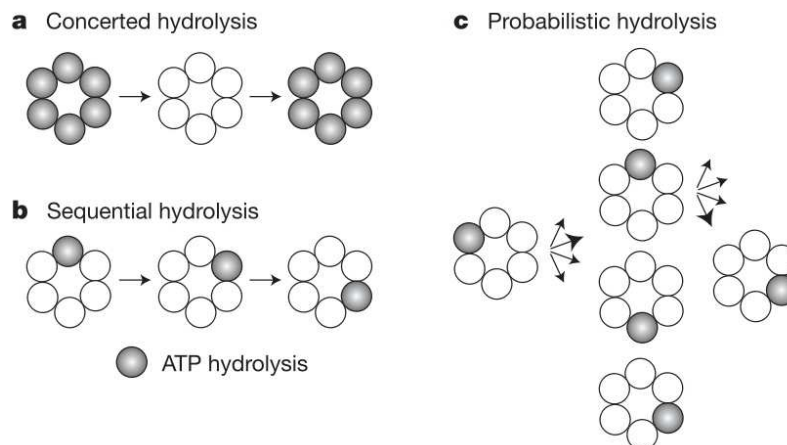


FIG. 10.12: Modèles de coopérativité de l'activité ATPase dans une unité moteur de *FtsK*. Il peut également exister des modèles avec des séquences plus compliquées, mais qui se rattachent toujours à une de ces trois classes. Figure reproduite de (Martin 2005) Fig. 4.

ATPase. Les détails de ces mutations et du protocole dans le cas de *FtsK* sont présentés dans (Crozat 2010) et dans la section 12.1 p. 195. Selon le degré de coopérativité entre monomères, l'activité observée du complexe en fonction de n sera différente (*cf.* Tab. 10.3 p. 178).

Modèle	n=0	n=1	n	effet <i>trans</i>
Stochastique	100%	83%	$(1-n/6) \times 100\%$	aucun
Séquentiel permissif	100%	proche stochastique	non-linéaire	pauses
Séquentiel strict	100%	proche coordonné	non-linéaire	<i>rescue</i>
Coordonné	100%	0%	0%	tout-ou-rien

TAB. 10.3: Effet de mutations sur n monomères d'un complexe actif sur l'activité globale du complexe. Nous supposons ici un complexe actif hexamérique. Un exemple d'effet «linéaire» et «non-linéaire» est donné dans la figure 10.13 p. 178.

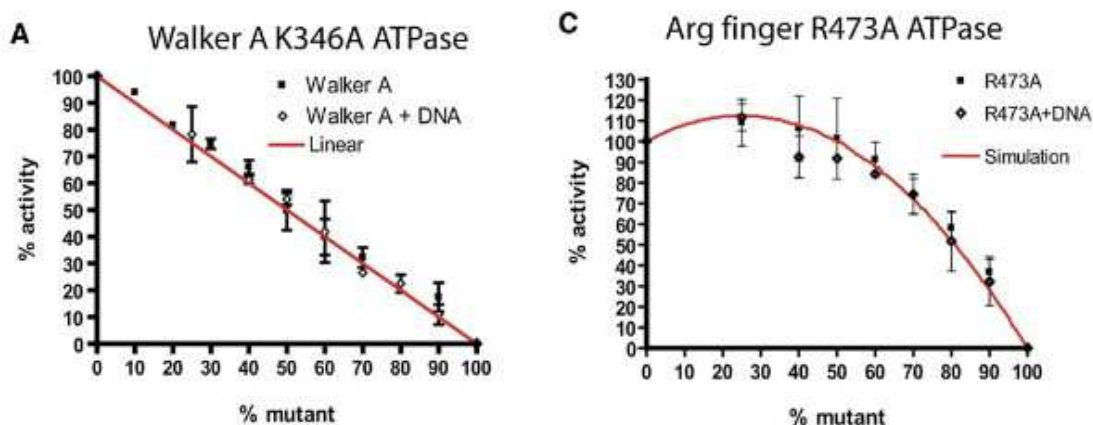


FIG. 10.13: Exemple d'effet [A] linéaire et [C] non-linéaire de deux mutations sur l'activité ATPase de la protéine MCM. Figure reproduite de (Moreau 2007) Fig. 4.

L'observation de la variation de l'activité en fonction du nombre de monomères mutés est par conséquent une indication du degré de coopérativité. Par ailleurs, pour une même mutation, le modèle correspondant à un certain type d'activité pourra être différent de celui correspondant à une autre. Dans l'exemple de la protéine MCM, la mutation K346A montre que les monomères hydrolysent l'ATP de manière stochastique, mais que l'activité hélicase nécessite une certaine coopérativité entre monomères.

Nous proposons par conséquent d'effectuer une analyse de coopérativité sur FtsK, en repérant les quatre principales activités : ATPase, ADN translocase, formation de boucles d'ADN et génération de force.

Observation directe

Par ailleurs, l'observation directe de l'activité ATPase dans un complexe de FtsK permettrait de discriminer *visuellement* les modèles présentés dans la figure 10.12. En présence d'un analogue fluorescent de l'ATP, les cercles pleins représentés sur cette figure apparaîtraient comme des points lumineux, du fait de la localisation de l'ATP à cet endroit. Inversement, les cercles représentés creux apparaîtraient comme des zones plus sombres.

En fixant à la surface de la chambre expérimentale des molécules de FtsK, de telle sorte qu'elle forment un complexe actif avec l'ADN, nous proposons d'observer la statistique spatiale du nombre de photons émis par l'analogue fluorescent de l'ATP. Selon la résolution spatiale et temporelle obtenue, nous pourrions discriminer déterminer les mécanismes entre eux, ou seulement en éliminer certains.

10.3.5 Couplage mécano-chimique

Parallèlement à l'étude de l'hydrolyse de l'ATP, nous avons rappelé que la coopérativité entre monomères peut se manifester de manière différente selon l'activité qui est mesurée : ATPase, hélicase, génération de force, *etc.* Une question importante dans l'étude des protéines ASCE est par conséquent celle du couplage mécano-chimique entre l'hydrolyse de l'ATP et d'autres activités.

A titre d'exemple de pensée, on pourrait très bien imaginer que pour une certaine ADN translocase, l'activité ATPase puisse être stochastique, mais qu'en présence d'un obstacle sur l'ADN la génération de force pour le déplacer nécessite une action concertée de tous les monomères pour être efficace.

L'étude de l'activité en fonction de contraintes extérieures, comme la concentration en ATP, une force de tension ou un couple, permet de sonder les étapes limitantes du mécanisme. Couplée à un raisonnement structural, cette étude permet dans certains cas de proposer un mécanisme mécano-chimique couplant l'hydrolyse de l'ATP aux changements conformationnels engendrés dans la protéine.

Ces études ont été menées jusqu'à des degrés de compréhension divers dans plusieurs ATPases ASCE :

- ϕ 29 gp16 (Moffitt 2009)
- Rho (Schwartz 2009; Thomsen 2009)
- FtsK (Massey 2006; Saleh 2005; Crozat 2010)
- T7 gp4 (Crampton 2006)
- ClpX (Glynn 2009)

Contrairement aux modèles de coordination de l'activité ATPase, qui peuvent être vus chacun comme des séquences particulières d'hydrolyse de l'ATP dans un modèle général, les études du couplage mécano-chimique ne permettent pas de dégager de cadre commun.

Dans les cas les mieux compris (Rho, ClpX et gp16), les monomères sont clairement structurellement distinguables, consécutivement à des états de liaison différents avec l'ATP ou l'ADP.

Ces variations locales se traduisent au niveau du complexe actif par une asymétrie dans la manière avec laquelle les monomères interagissent avec l'ADN, l'ARN ou un chaîne protéique, selon le cas. En particulier, le mécanisme de Rho (Thomsen 2009) et de gp16 (Moffitt 2009) sont compatibles avec une plasticité de l'hexamère, sous forme de distorsions de l'anneau par rapport à une conformation plane (cf. Fig 10.14 p. 180).

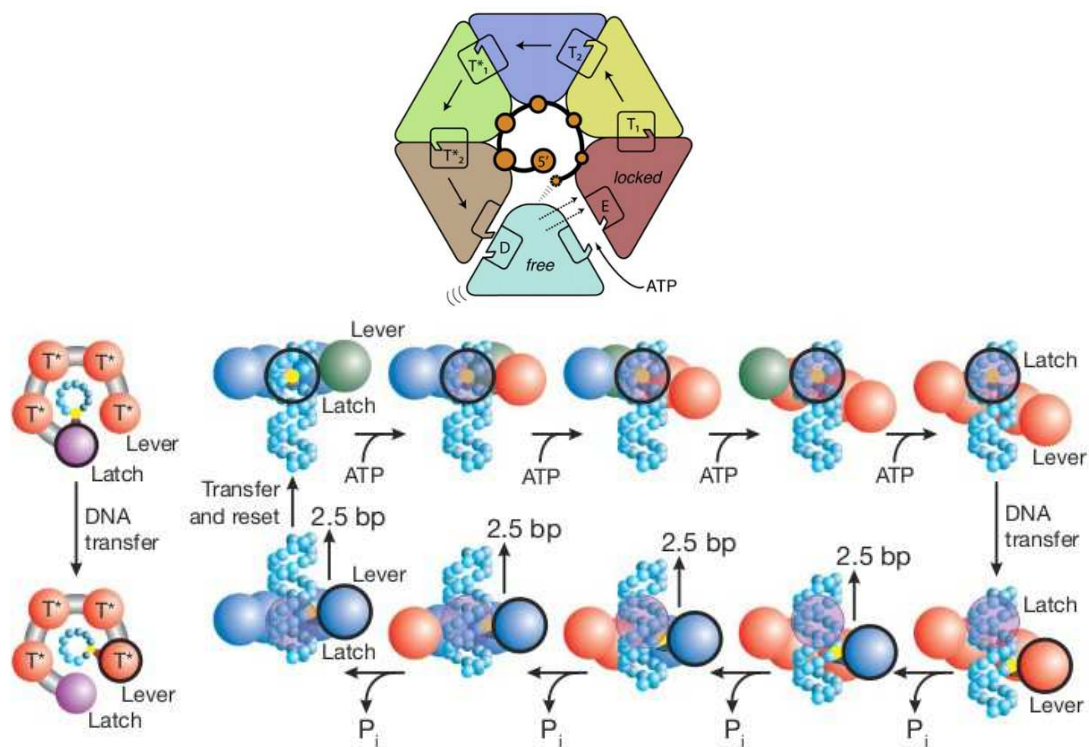


FIG. 10.14: Modèles mécano-chimiques proposés pour [H] l'hélicase Rho (Thomsen 2009) et [B] le *portal motor* gp16 (Moffitt 2009).

On peut dans ce cas distinguer deux principales typologies : un cas où le contact du complexe avec son substrat se fait par un seul monomère, l'ensemble des monomères changeant d'état à chaque pas (*hand-off model*) (Massey 2006; Enemark 2008) ou au contraire où le contact se fait par l'ensemble des monomères, sauf un qui se déplace d'une distance correspondant au pas hélicale d'enroulement de l'ATPase autour de son substrat (*escort model*) (Enemark 2008; Thomsen 2009).

Nous proposons par conséquent de répondre, par l'utilisation de monomères mutants incapables d'interagir correctement avec l'ADN, de déterminer avec quel modèle mécano-chimique le comportement de FtsK est le plus compatible. Nous proposons plus spécifiquement des éléments d'analyse dans (Croizat 2010).

10.3.6 Interaction avec les séquences de polarisation du chromosome

Par des analyses structurales et fonctionnelles, il a été montré que l'interaction de FtsK et SpoIIIE avec ces séquences se faisait par l'intermédiaire de la sous-unité γ de la partie ATPase du moteur (Sivanathan 2006; Löwe 2008; Ptacin 2008).

Dans le cas de FtsK, l'ensemble de ces données semble montrer que les séquences

FRS/KOPS sont reconnues par le complexe en translocation exclusivement lorsque leur orientation est identique (configuration dite permissive). L'interprétation des événements observés en molécule unique serait alors que les séquences FRS/KOPS joueraient le rôle de séquences de chargement et d'orientation initiales du complexe actif sur l'ADN ; le comportement en configuration non-permissive proviendrait de la collision du complexe actif et d'un complexe chargé sur la séquence (Löwe 2008).

Nous proposons par conséquent, par marquage fluorescent direct des complexes de FtsK, d'observer le comportement en translocation du complexe actif et de déterminer s'il interagit ou non avec un autre complexe au niveau d'une séquence FRS/KOPS dans une configuration non-permissive.

10.4 Conclusion

A la lumière des analogies structurales et fonctionnelles de FtsK avec les protéines de la famille ASCE, ainsi que des données en volume ou en molécule uniques déjà connues, nous identifions quelques expériences-clé que nous estimons particulièrement adaptées au dispositif expérimental dont nous disposons (*cf.* Tab. 10.4 p. 181).

Ces expériences pourront apporter une conclusion mécanistique claire sur la nature et l'organisation structurale et fonctionnelle des complexes actifs de FtsK. Toutes ces expériences ont été réalisées à des degrés divers pendant ce travail de thèse, et leurs résultats sont explicités dans les chapitres suivants.

Expérience	Effet à observer	Conclusion mécanistique
Marquage fluorescent	Quantification de fluo	Stoechiométrie de l'UM
Marquage fluorescent	Quantification de fluo	Discrimination 1UM / 2UM
Marquage fluorescent	Obs. simultanée fluo/MT	Discrimination 2UM TT / TQ
Marquage fluorescent	Obs. localisation fluo	Nature des séquences KOPS
Mutations ponctuelles	Linéarité de l'activité	Degré de coopérativité
Hydrolyse d'ATP fluo	Localisation de la fluo	Discrimination stochastique / concerté

TAB. 10.4: Quelques expériences-clé sur FtsK que nous nous proposons de réaliser, ainsi que les conclusions mécanistiques qui pourront être obtenues à partir des résultats.

11 Article : "Separating speed and ability to displace roadblocks during DNA translocation by FtsK"

Cet article est publié à *EMBO J.* dans la version présentée dans ce manuscrit.

Separating speed and ability to displace roadblocks during DNA translocation by FtsK

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited. This license does not permit commercial exploitation without specific permission.

Estelle Crozat¹, Adrien Meglio²,
Jean-François Allemand², Claire E Chivers¹,
Mark Howarth¹, Catherine Vénien-Bryan¹,
Ian Grainge^{1,3} and David J Sherratt^{1,*}

¹Department of Biochemistry, University of Oxford, Oxford, UK
and ²Laboratoire de Physique Statistique et Département de Biologie,
Ecole Normale Supérieure, UPMC, Paris 06, Université Paris Diderot,
CNRS, Paris, France

FtsK translocates dsDNA directionally at >5 kb/s, even under strong forces. *In vivo*, the action of FtsK at the bacterial division septum is required to complete the final stages of chromosome unlinking and segregation. Despite the availability of translocase structures, the mechanism by which ATP hydrolysis is coupled to DNA translocation is not understood. Here, we use covalently linked translocase subunits to gain insight into the DNA translocation mechanism. Covalent trimers of wild-type subunits dimerized efficiently to form hexamers with high translocation activity and an ability to activate XerCD-*dif* chromosome unlinking. Covalent trimers with a catalytic mutation in the central subunit formed hexamers with two mutated subunits that had robust ATPase activity. They showed wild-type translocation velocity in single-molecule experiments, activated translocation-dependent chromosome unlinking, but had an impaired ability to displace either a triplex oligonucleotide, or streptavidin linked to biotin-DNA, during translocation along DNA. This separation of translocation velocity and ability to displace roadblocks is more consistent with a sequential escort mechanism than stochastic, hand-off, or concerted mechanisms.

The EMBO Journal advance online publication, 8 April 2010;
doi:10.1038/emboj.2010.29

Subject Categories: genome stability & dynamics

Keywords: *Escherichia coli* chromosome segregation; FtsK
DNA translocase; molecular motor

Introduction

FtsK is a highly conserved dsDNA translocase that functions in the final stages of bacterial chromosome unlinking and in coordinating this final stage of chromosome segregation with

cell division (Begg *et al*, 1995; Yu *et al*, 1998; Recchia *et al*, 1999; Aussel *et al*, 2002; Grainge *et al*, 2007). FtsK is tethered to the developing division septum by its membrane-spanning N-terminal domain and targets its activity to any dimeric, catenated or incompletely replicated chromosomes in the G2 phase of the cell cycle (Steiner *et al*, 1999; Dorazi and Dewar, 2000; Aussel *et al*, 2002).

The C-terminal ~500 amino-acid (aa) FtsK translocase is composed of three subdomains: $\alpha\beta$ constitute the active motor, whereas the γ -subdomain has regulatory functions. The translocase loads FtsK preferentially at specific DNA sequences that are oriented in the bacterial chromosome. In *Escherichia coli*, FtsK Oriented Polar Sequences (KOPS; GGGNAGGG) are the preferred loading sites from where FtsK translocates DNA at ~5 kb/s (Saleh *et al*, 2004; Pease *et al*, 2005; Bigot *et al*, 2006). Finally, the translocation by FtsK stops at XerCD-bound *dif* sites in the replication terminus region, where FtsK activates the final chromosome unlinking by XerCD recombination at *dif* (Graham *et al*, 2010). The γ -regulatory subdomain of FtsK acts in KOPS loading and in the activation of XerCD recombination at *dif*.

The FtsK translocase belongs to the RecA subgroup of the additional strand catalytic glutamate (ASCE) ATPase superfamily that also contain AAA+ (ATPases associated with various cellular activities) enzymes that have multiple biological roles, including translocating along nucleic acids in the 3'–5' direction. In contrast, translocases and helicases that belong to the RecA group (e.g. T7gp4 and DnaB), translocate in the 5'–3' direction in the cases analysed (Singleton *et al*, 2007; Thomsen and Berger, 2009). It, therefore, seems likely that during FtsK dsDNA translocation, the catalytic mechanism uses just one of the two DNA chains and that translocation is 5'–3' with respect to this chain. The nature of the ASCE folds places the ATP-binding pocket of one subunit close to γ -phosphate sensor elements in an adjacent subunit, thereby providing the opportunity for coordinated catalysis and ATP hydrolysis. A crystal structure of the $\alpha\beta$ motor of *Pseudomonas aeruginosa* FtsK bound to ADP showed a symmetrical hexamer with no obvious loops protruding into the central chain in which ds DNA is normally located (Massey *et al*, 2006). This led to the proposal of a sequential rotary mechanism for translocation, with a rotational resetting after each catalytic step, which was proposed to translocate 2 bp of DNA. Nevertheless, the structure did not provide any evidence for the asymmetry in structures and nucleotide-binding states that one would predict from such a mechanism.

To further address the FtsK translocation mechanism, we have covalently linked the minimal predicted functional translocase, identified by the crystallographic studies, into multimers using a 14 aa flexible linker. This strategy was previously used to study the hexameric ClpX protein-unfolding motor (Martin *et al*, 2005) and the recombination protein

*Corresponding author. Department of Biochemistry, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3QU, UK. Tel.: +44 1865 613 237; Fax: +44 1865 613 238; E-mail: david.sherratt@bioch.ox.ac.uk

³Present address: BG09, Biological Sciences, Faculty of Science and Information Technology, University of Newcastle, Callaghan, NSW, Australia.

Received: 18 December 2009; accepted: 12 February 2010

RecA (Chen *et al*, 2008). Intriguingly, some AAA + motors have their six AAA + domains naturally covalently linked into a single peptide (Vallee and Hook, 2006). This strategy allows us to introduce mutations into defined subunits and study the translocation properties of the mutated protein to understand how nucleotide binding and hydrolysis are coupled to translocation and the ability to do mechanical work. We demonstrate that covalent trimers dimerize to form hexamers that recognize KOPS, activate chromosome unlinking and translocate at velocities comparable to FtsK_{50C}, the previously used translocase. Furthermore, we show that trimers with a catalytically inactive subunit at the central position form hexamers that have a normal translocation velocity but which are impaired in their ability to displace 'roadblocks' on DNA.

Results

FtsK translocase multimers are active *in vivo*

Most previous research on FtsK translocation *in vitro* has used a protein, FtsK_{50C}, in which a 50 aa segment derived from the FtsK N-terminus has been added to the $\alpha\beta\gamma$ translocase domain (Aussel *et al*, 2002; Ip *et al*, 2003; Saleh *et al*, 2004; Pease *et al*, 2005; Bigot *et al*, 2006). These 50 aa facilitate hexamerization and are required for significant *in vitro* catalytic activity (Aussel *et al*, 2002). Nevertheless, FtsK_{50C} has a high propensity to aggregate, making quantitative biochemistry and mechanistic interpretation difficult. We reasoned that a minimal FtsK translocase, lacking the N-terminal 50 aa of FtsK_{50C} and derived by using the available structure (Massey *et al*, 2006), might demonstrate *in vitro* activity if the individual monomers were covalently linked. Therefore, FtsK aa 840–1329 were linked together with a 14 aa linker (GGGSEGGGSEGGSG), thus forming covalent multimers of the translocase, the first subunit being tagged with a 6-His tag and/or biotin-tagged peptide (Figure 1).

In initial experiments, we showed that the gene, encoding a 320 kDa FtsK covalent hexamer, expressed well enough to give high levels of *in vivo* translocation-dependent XerCD-*dif* recombination (data not shown). Nevertheless, the level of expression was not sufficient to enable ready purification of the protein. Therefore, we chose to work with monomers, covalent dimers and covalent trimers (hereafter described as 'trimers'), which were expressed well. This provided the opportunity to introduce specific mutations into defined individual subunits of a covalent multimer. We then tested the *in vivo* activity of these translocases.

First, we exploited the observation that the overexpression of active FtsK translocase (e.g. FtsK_{50C} when expressed from a *p_{ara}* promoter with 0.2% arabinose) is toxic and cells stop growing and die within ~15 min of induced expression. Toxicity is correlated with the ability to hydrolyse ATP (Massey *et al*, 2006). Expression of monomer, dimer and trimer of the new FtsK translocase derivatives was toxic, consistent with them having *in vivo* activity (Table I). Cells stopped growing ~45 min after induced expression of the monomer, ~30 min after dimer expression and ~15 min after trimer expression, consistent with multimerization by covalent linking enhancing specific activity, because hexamers are the active species. Second, we tested whether the proteins could support *in vivo* XerCD-*dif* recombination on a reporter plasmid containing two *dif* sites (Recchia *et al*,

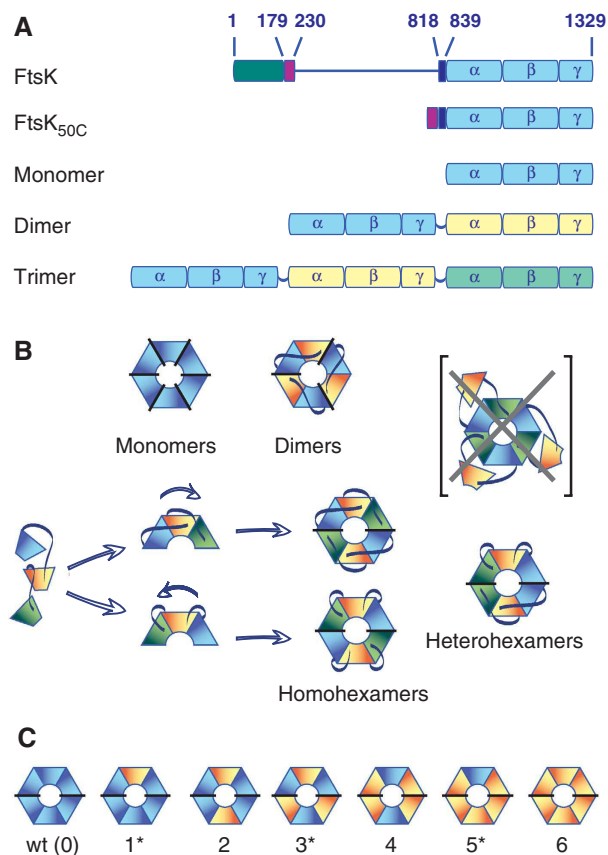


Figure 1 (A) Schematic of the FtsK proteins used. FtsK depicts the wild-type protein, with four transmembrane helices in the N-terminus region (dark green), a 639 amino-acid linker (blue line) and the C-terminus motor domain (light blue boxes) containing the three subdomains α , β and γ . FtsK_{50C} is the soluble *E. coli* FtsK derivative that has been used in previous *in vitro* studies. The pink box represents the 50 aa segment derived from the linker, which is directly linked to the C-terminal motor. The dark blue box is a segment absent in the FtsK_{50C} structure and in the derivatives used here: monomer, covalent dimers and covalent trimers. Subunits in covalent multimer derivatives are connected by a 14 aa linker, joining directly the C-terminus of the γ -subdomain to the first amino acid of the motor, L840. (B) Different potential configurations for multimer formation. The 14 aa linker is sufficiently short that we expect subunit 1 (blue) to be always adjacent to 2 (yellow), and subunit 3 (green) adjacent to 2 in the trimers. Nevertheless, it is plausible that two types of trimers can form, with the subunits folding in either a clockwise, or anticlockwise sequence. These can then potentially form mixed hexamers (heterohexamers) or unmixed hexamers (homohexamers). Because of the uncertainty of the configuration in trimers, mutations were introduced into either subunit 2 (single mutants), or subunits 1 and 3 (double mutants). In parentheses, with a cross, is shown how three covalent trimers with a centrally placed mutated subunit could conceivably form a hexamer with wild-type subunits and three looped out mutated subunits. We have no evidence that this can form. (C) Mutant hexamers. This figure depicts the mutants used in this study. Pure hexamers are obtained with a wild-type, single-mutant trimer, double-mutant trimer or triple-mutant trimer (0, 2, 4 or 6). Mixes of trimers are required to form hexamers with 1, 3 or 5 mutant subunits (marked with an asterisk). Mutated subunits are yellow and wild-type subunits are blue.

1999). The results of this assay mirrored the toxicity results; trimers were more active than covalent dimers, which were more active than monomers (Table I). These semi-quantitative assays do not take into account any differential levels of

Table 1 *In vivo* activities of FtsK multimers

Assay	Monomer	Dimer	wt Trimer	2 WA ^a	4 WA	6 WA	2 WB	4 WB	6 WB
Toxicity ^b (min)	45	30	15	25	30	—	25	35	—
Recombination ^c (%)	25	50	60	63	12	17	58	24	24

^aHexamers formed by dimerization of trimers are described by the number of mutated WA or WB subunits.

^bToxicity was assayed as the time at which cell growth in LB ceases after FtsK induction with 0.2% arabinose. '—' indicates no toxicity.

^cRecombination was measured *in vivo* on a reporter plasmid, 2 h after induction of FtsK expression by 0.02% arabinose. The values shown have the 0 min background subtracted.

these proteins in cells. Nevertheless, our extensive experience with these assays using FtsK_{50C} derivatives (Sivanathan *et al*, 2006 and data not shown) has shown them to give a good indication of *in vitro* specific activity. We conclude that covalent trimers and dimers are highly active *in vivo*.

***In vitro* activities of FtsK translocase multimers**

The recombinant FtsK monomer, covalent dimer and trimer were then purified and assayed *in vitro* for ATPase activity and for two independent assays of DNA translocation: *in vitro* FtsK-dependent XerCD-*dif* recombination and triplex displacement assays (Figure 2; Aussel *et al*, 2002; Sivanathan *et al*, 2006). ATPase activity was DNA dependent (not shown), and at a concentration of 50 nM hexamer, the trimer hydrolysed $>1.7 \times 10^3$ ATP/min/hexamer. At this protein concentration, the covalent dimers displayed ~80% of trimer specific activity, and the monomers ~1%, because of less efficient formation of active hexamers. The relatively low steady state level of ATP hydrolysis by the trimers indicates that most molecules are not translocating at any given time, presumably because they are not loaded onto DNA, have collided with other translocases, or are simply not active.

In XerCD-*dif* recombination and triplex displacement assays, the trimers were again the most active species, with covalent dimers showing ~40% of the activity of trimers. In the triplex displacement assays, optimal activity was obtained with trimers at 50 nM (hexamer), but required 80 and 150 nM for covalent dimers and monomers, respectively. These results confirm that covalent dimers and trimers are more active *in vitro* than the constituent monomers, with dimers and monomers forming hexamers at high and very high concentrations, respectively. In conclusion, trimers dimerize to form active hexamers efficiently at 50 nM, and their activity is higher than that observed for FtsK_{50C} at the same concentration (Figure 1C and data not shown). Furthermore, the trimers were still responsive to the presence of KOPS in the triplex displacement and recombination assays (data not shown).

***FtsK* translocase trimers form hexamers on DNA**

Despite the trimers being highly active in translocation, we needed to be confident that the activity was resulting from dimerization of two trimers into a hexamer, rather than the activity residing in higher-order structures (Figure 1B, right panel), which could compromise interpretation of data once defined mutations had been introduced into the linked multimers. FtsK subunits were rendered non-functional by mutation in the highly conserved ATP-binding pocket. We used two mutations that have been shown to be catalytically defective in an extensive range of studies of RecA-fold proteins (ClpB: Watanabe *et al*, 2002; Dynein: Reck-Peterson and Vale, 2004; Rad51: Wiese *et al*, 2006 and archeal MCM:

Moreau *et al*, 2007). A K997A substitution in the Walker A box (WA) should prevent ATP binding, whereas a D1121A substitution in the Walker B box (WB) may allow ATP binding, but should be defective in ATP hydrolysis. Binding of trimers, containing 0 to 3 WA mutated subunits, to short KOPS-containing DNA was analysed by gel electrophoresis. Two shifted bands were observed in the presence of 200 nM protein, consistent with binding of one and two trimers on DNA (data not shown). Protein–DNA complexes containing wild-type, or three mutated WA subunits, were also observed by electron microscopy using negative staining. On a 2.7 kb DNA, particles whose shape and size were consistent with 'side-view' FtsK hexamers were the majority species (Figure 2E; Massey *et al*, 2006). The trapezium shape particles had diameters of 120–130 Å (large side) and 60–70 Å (small side). Aggregates or higher-order structures comprised <2% of particles. On a short DNA (44 bp), when 'end-on' view (top view) particles are expected, rounded particles of diameter ~130 Å were observed (Figure 2E), the size expected for a hexamer obtained by dimerization of trimers. However, we did not observe any lack of density corresponding to the central hole, or any six-fold symmetry (Massey *et al*, 2006). This may be because the γ -subdomains are attached to the $\alpha\beta$ motor by a flexible linker, and therefore may occlude the central hole, as well as mask the symmetry of the protein complexes.

We then analysed whether the trimers could adopt alternative configurations when they dimerize into hexamers. The 14 aa linker may be long enough that it does not restrict the assembly into only a single configuration, although we expect the linker length to restrict the arrangement of subunits such that subunit 1 is never adjacent to subunit 3 (Figure 1B). The existence of alternative subunit configurations potentially complicates the interpretation of experiments using mutant subunits. To address this issue, we labelled His-tagged covalent trimers, pre-loaded onto short DNA to give preferential end-views, with 2 nm Ni-NTA-bound gold beads and assessed the relative locations of the beads within the hexamers by electron microscopy, followed by image classification (Figure 2G). The 1702 particles analysed were classified into 10, 50 or 100 groups on the basis of protein shape and gold position. Classes with two adjacent golds and with the two golds *in trans* were observed for each group, indicating that trimers can dimerize in both head–tail and head–head configurations (Figures 1B and 2G). However, some classes were ambiguous, with a very low signal–noise ratio, thereby precluding quantitative estimates of the two configurations. Given the likelihood that both configurations can form, we chose symmetrical configurations of mutations to avoid any ambiguity in the configurations of the subunits in the assembled hexamers. We focused most of our experiments on trimers containing a mutated subunit in the central

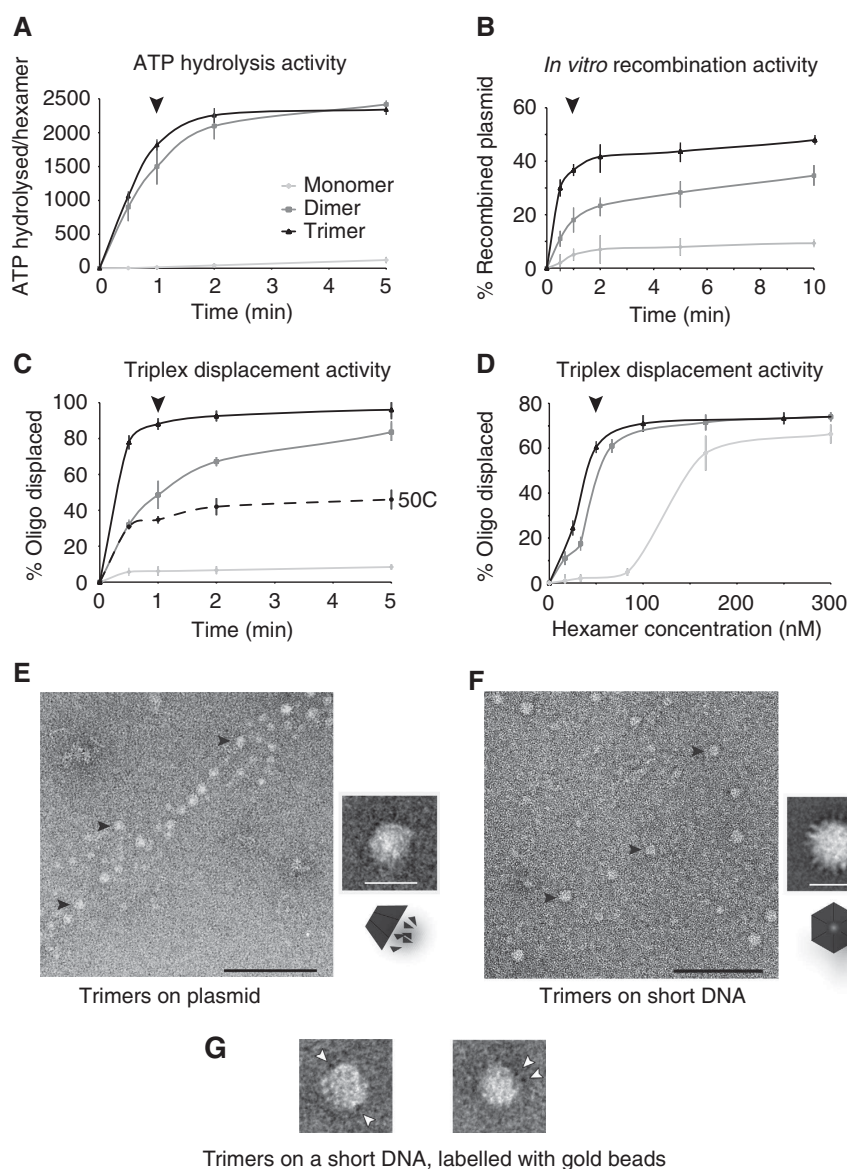


Figure 2 *In vitro* activity of FtsK multimers. **(A)** ATP hydrolysis over time is shown for monomer, covalent dimer and trimer, at a concentration of 50 nM hexamer equivalent. The black arrow indicates the 1 min time point, which was used in later experiments (Figure 3). The mean data from three independent experiments, with standard deviations, are shown in panels **(A–D)**. **(B)** FtsK-dependent XerCD-*dif* recombination. Recombination was followed over time on a dimeric plasmid containing two *dif* sites lacking consensus KOPS-loading sites. Proteins (50 nM hexamer equivalent) were incubated with ATP and pre-bound XerCD, and the 1 min time point data (arrow) were used to generate the data in Figure 3. **(C)** Triplex displacement as a function of time; protein concentration was 50 nM (hexamer equivalent); the dotted line shows FtsK_{50C} activity as a comparison. **(D)** Triplex displacement as a function of protein concentration; 1 min reactions were used to compare translocation activity of monomer, dimers and trimers over a range of 0–350 nM (hexamer equivalent). The activity does not increase with higher concentrations of protein (data not shown). **(E–G)** Electron microscopy of covalent trimers of FtsK on DNA. **(E)** A 2.7 kb, linearized plasmid, was used to study DNA binding by the trimers. A representative field using wild-type trimer is shown, as well as an averaged image of the protein seen from the side (162 particles), showing that the particles have the overall size expected for a hexamer composed of two trimers. Similar results were obtained with double and triple WA mutant trimers (data not shown). The black bar represents 100 nm, and the white bar 13 nm. Arrows point at examples of particles and a schematic of the side-on view is drawn under the averaged reconstructed image (inset). **(F)** Wild-type trimers were incubated with a 44 bp DNA-containing KOPS, thereby leading to preferential top–bottom views, giving an averaged reconstruction of particles of ~13 nm diameter (2600 particles selected) (inset). Similar results were obtained with double and triple WA mutant trimers (data not shown). Scale bars are the same as **(E)**. The schematic indicates the orientation of the particle on the grid. **(G)** Examples of gold labelling. Two classes averaged from a 100 group classification are shown, with beads on opposite sides of the particle (left) or side-by-side (right).

position, so that hexamers should carry two mutated subunits each separated by two wild-type subunits. Taken together, these results give us confidence that most biological activities assayed were the result of dimerization of trimers on DNA.

Activities of translocases with mutated subunits

To study coordination between FtsK subunits during DNA translocation, we compared the activities of presumptive hexamers derived from trimers with unmutated and/or mutated subunits. The mutations were introduced separately

into a given subunit of the trimers; in the central position to get a single mutant; in the first and the last subunits to get a double mutant and in all three subunits to get a triple mutant.

The mutated trimers were first tested *in vivo* using the toxicity and XerCD-*dif* recombination assays (Table I). In the toxicity assay, cells expressing the wild-type trimer showed a loss of exponential growth 15 min after induction of expression. Trimers containing three WA or three WB mutated subunits showed no toxicity and continued to grow. Trimers containing single WA or WB mutations were more toxic than trimers carrying two WA or WB mutations, with the trimer with two mutated WA subunits appearing slightly less toxic than its WB counterpart. The *in vivo* FtsK XerCD-*dif* recombination assays broadly mirrored the toxicity results, although in these assays, trimers with a single WA or WB mutant showed similar activity to wild-type trimers, whereas trimers with two WA or WB mutations appeared as trimers with three mutations. The residual level of recombination from the trimers with three mutated subunits may result from translocation-independent stimulation of recombination by the γ -subunits present on the trimers (Grainge I and Sherratt DJ, unpublished data).

Wild-type trimers were more active than wild-type covalent dimers in both of these assays, whereas wild-type monomers showed little if any activity. This result reassured us that any monomers or covalent dimers with one wild-type subunit and one mutated subunit, derived from proteolysis of trimers *in vitro* or *in vivo*, are unlikely to have significant activity that could confound the interpretation of the above experiments. These results gave us the confidence to purify the mutated trimers, giving the single, double and triple mutants in the WA and WB motifs, respectively (Figure 1).

The FtsK translocation mechanism is neither stochastic nor strictly concerted

FtsK-dependent XerCD-*dif* site-specific recombination and displacement of a triplex-forming oligonucleotide were used to assay DNA translocation by the trimer variants and their combinations (Figure 3). For trimer mutants with 0, 1, 2 or 3 mutated subunits, we followed the decrease of recombination as a function of the number of mutant subunits. Assuming that the only potentially active species are hexamers formed by trimer dimerization, this gives data for hexamers with 0, 2, 4, or 6 mutated subunits. To obtain results for hexamers containing 1, 3 or 5 mutant subunits, different trimer mutants were mixed in equimolar amounts (Figure 1). For example, to obtain a hexamer population with only one mutated subunit, equal amounts of wild-type trimer and single-mutant trimer were mixed. In this mixture, it is predicted that 25% of hexamers are wild type; 50% carry a single mutated subunit; and 25% carry two mutated subunits. As the activity of each homohexamer is known, we were able to deduce the activity of the heterohexamer.

For the *in vitro* recombination assays that are dependent on DNA translocation by FtsK for activation of recombination, hexamers in which all of the subunits carry WA or WB mutations showed no activity, as expected, and gave us confidence that the mutations abrogate DNA translocation. By comparison, the wild-type subunits showed ~30% recombinant product in a 1 min reaction (Figure 2B; normalized to 100% in Figure 3).

Hexamers with two WA or WB mutations showed substantial recombination activity (~65% of wild type in 1 min reactions), whereas the mixed subunit population that gives hexamers with a single mutation (50%) showed at least wild-type activities after correction for the wild-type (25%) and double-mutated (25%) population. Some residual

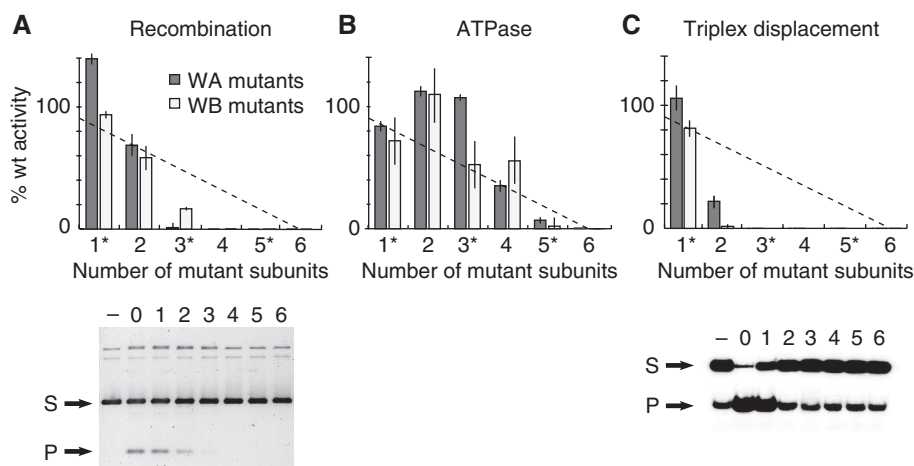


Figure 3 *In vitro* activity of covalently linked mutated hexamers. (A) XerCD-*dif* recombination as a function of the number of mutated subunits. Recombination reactions were performed for 1 min on a dimeric plasmid containing two *dif* sites. In all, 50 nM hexamers were used on 27 nM 5.6 kb plasmid. % recombination is normalized to the activity of the wild-type (wt) hexamer, which gave ~30% recombination in 1 min (Figure 2). The dotted line shows the levels if there were a linear activity decrease as a function of increasing number of mutated subunits (A–C). The panel below shows an example of a recombination gel (0.8% agarose, 1 × TAE) for hexamers containing 0–6 WB mutated subunits (S) denotes recombination substrate; (P) denotes product; (–) denotes no FtsK. Error bars indicate standard deviation in three independent experiments, and asterisks indicate the combinations made by mixing appropriate trimers as in Figure 1C (A–C). (B) ATPase activity measured on a fraction of the recombination reaction shown in (A). Activity is normalized to that of the wild-type hexamer. (C) Triplex displacement. Triplex-displacement assays were carried out as in Figure 2. After subtracting background, activity was normalized to that of the wild-type hexamer. The panel below shows an example of a triplex reaction gel (4% acrylamide, 1 × TAM) for hexamers containing 0–6 WB mutants.

recombination activity (<20%) was observed in the assays in which 50% of the population should contain hexamers with three mutated subunits. No activity was observed with four mutated subunits. These observations are inconsistent with a stochastic firing model, in which a linear decrease in activity as a function of increasing mutated subunit number would be expected (Moreau *et al*, 2007). Similarly, obligate sequential rotary models, in which each subunit must be catalytically active in turn, can be ruled out, because a single-mutated subunit would block translocation. In parallel, ATPase activity was assayed in each of the recombination reactions, giving an estimate of the number of ATP consumed as a function of the level of recombination for each mutant hexamer (Figure 3B). Note that the absolute level of ATPase activity in the recombination assays cannot be compared directly with ATPase activity measured in the absence of recombinases, because the ATPase activity is downregulated when FtsK encounters XerCD bound to *dif* (Graham *et al*, 2010). ATPase activity decreased less sharply, with the four mutated subunit population retaining >40% of wild-type activity. This observation is consistent with an uncoupling of ATPase and translocation. Indeed by independent assays of ATPase activity under optimal conditions, with DNA in excess, there was an approximately linear decrease in ATPase activity as a function of the number of mutated subunits (data not shown). These results contrast to those from experiments in which wild-type *P. aeruginosa* FtsK (PAK4) hexamers were doped with increasing amounts of a WA mutant subunit and the ATPase activity measured (Massey *et al*, 2006). In that paper, there was a rapid, greater than linear reduction in ATPase activity as a function of mutated subunit concentration, leading to the conclusion of a rigorous sequential (or concerted) mechanism. However, we note that the absolute levels of ATPase activity were low, perhaps because a 16bp dsDNA was used, which would not have supported significant DNA translocation. Furthermore, it is possible that the mutated subunits formed homohexamers and mixed hexamers more avidly than the wild-type protein on the 16bp substrate, leading to an over-representation of hexamers containing ≥ 3 mutant subunits for a given input ratio.

In triplex-displacement assays, which provide an independent measure of translocation, hexamers with three or more mutant subunits all failed to show significant displacement activity in assays that required 60bp of translocation after loading at KOPS, before encountering the triplex (Figure 3C). Hexamers with two WA or two WB mutated subunits showed $\leq 20\%$ of wild-type activity, a marked contrast to their higher activity when activating Xer recombination. ATPase activities measured in the same reactions gave results similar to those in Figure 3B (data not shown). These data suggest a quantitative difference in 'readout' as compared with the recombination assays, perhaps because hexamers with mutated subunits are less able to displace a triplex when they have translocated up to it, as compared with being able to activate recombination after translocation up to the XerCD-*dif* complex. It is unlikely that the difference between assays reflects reduced processivity of translocation with mutated subunits, given that FtsK has to translocate only 60bp in the triplex assay, whereas most random loadings of FtsK onto DNA in the recombination assay will leave >60bp of translocation needed to encounter XerCD-*dif*. To test this directly, we

assayed translocation by wild-type and mutated trimers in a single-molecule assay.

Translocases with two catalytically inactive subunits show wild-type translocation velocity

FtsK and its ortholog, SpoIIIE, have been shown to translocate along DNA at ~ 5 kb/s and against forces of up to 60 pN, using single-molecule studies with both optical traps and magnetic tweezers (Saleh *et al*, 2004; Pease *et al*, 2005; Ptacin *et al*, 2008).

We used magnetic tweezers with a DNA molecule (17 kb, 5.7 μ m) tethered between the surface and a magnetic bead. The DNA was maintained in an extended conformation by magnets applying a constant force (Strick *et al*, 1996), to study translocation by hexamers derived from wild-type and mutated trimers. The FtsK variant and ATP were then added and the position of the bead was observed. Looping during translocation, probably arising when the translocase attaches to either the bead or the surface, causes the bead to move towards the surface during translocation. Either release of the loop or a reverse in translocation direction causes the bead to move away from the surface (Figure 4). These events can be distinguished by the rate of reversal of the bead. Between 360 and 930 events per protein were recorded, and the distributions of burst speeds were determined. Translocases derived from the wild-type trimer were first compared with FtsK_{50C}. Both proteins showed the same translocation velocity (data not shown), with translocation events of several microns being common.

Translocases derived from trimers containing a mutated (WA or WB) central subunit were analysed in the same way and the average burst speed was deduced. Surprisingly, they translocated along DNA at rates similar to the wild-type covalent trimer against forces of 1–35 pN. The data shown were obtained at 5 pN and reveal a translocation velocity of ~ 3.3 kb/s. We are confident that these events arise from the translocation of hexamers formed by dimerization of the mutated trimers, because our EM and gel-shift analysis provided no evidence for significant numbers of higher form multimers that could assemble six wild-type subunits into a hexamer (Figures 1 and 2). Also note that monomers and covalent dimers were not active at this concentration. Furthermore, the observation of substantial translocation activity by the covalent trimers with a single-mutated subunit in the XerCD-*dif* recombination reaction, where specific activity can be estimated, reinforces our conclusion that hexamers with mutated subunits in the 2 and 5 positions exhibit wild-type translocation rates. This led us to wonder whether the low activity in the triplex-displacement assays results from a failure to displace the triplex efficiently rather than an impaired ability to translocate up to the triplex. This could mean that the covalent trimer with a central mutant subunit would have an impaired ability to generate the mechanical work required to displace the triplex, despite a normal translocation velocity.

Magnetic tweezers are not a good tool to measure and compare FtsK stall forces as both processivity and events rate dramatically decrease at high force (Saleh *et al*, 2004; Pease *et al*, 2005), while modification of DNA structure at high forces may affect the results. This led us to use another strategy.

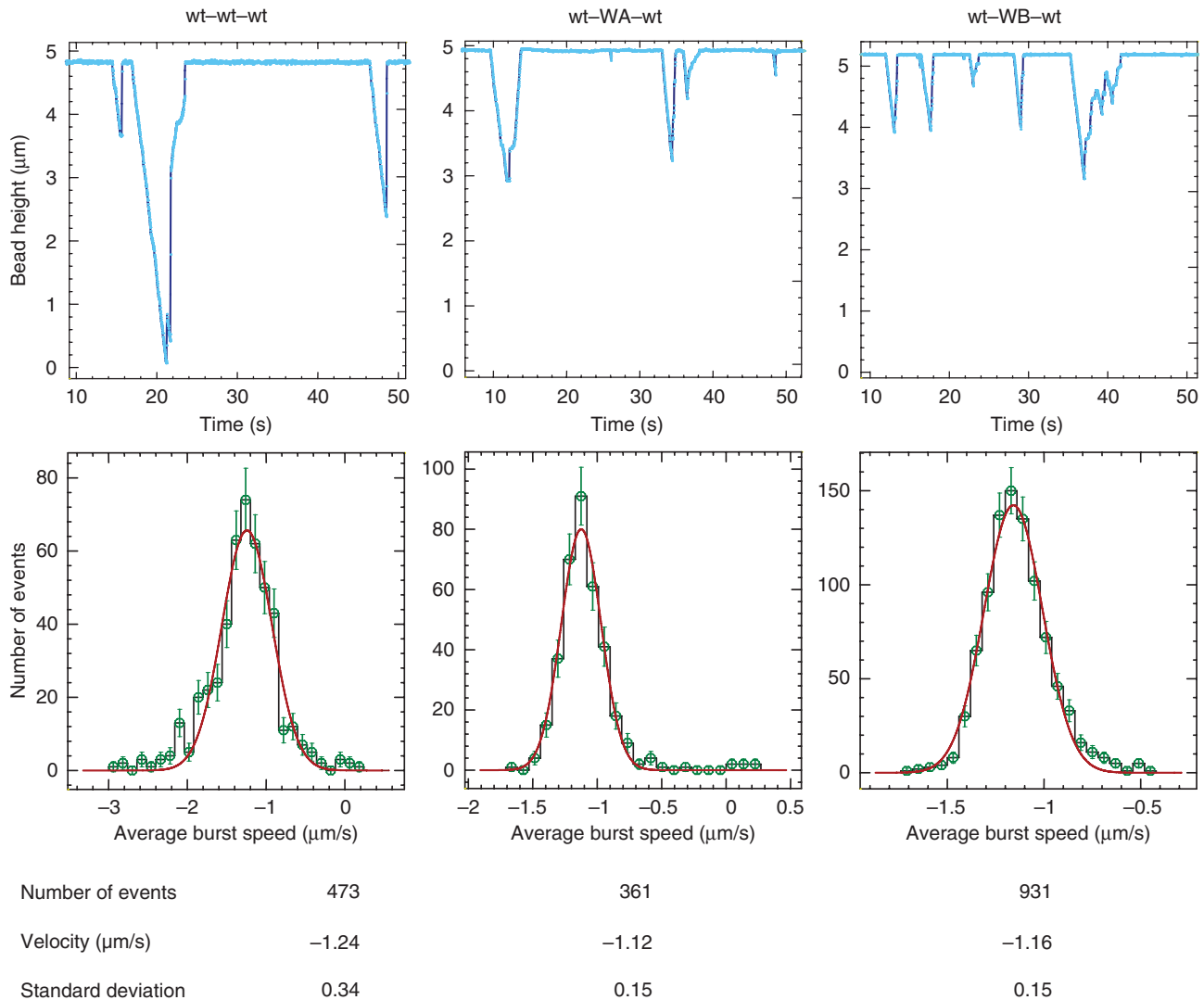


Figure 4 Single-molecule analysis of covalent multimer translocation. Magnetic tweezers were used to study translocation of wild-type and double mutant hexamers, containing WA or WB in the central subunit of the trimers. Upper panels show examples of events obtained for each protein. There is no statistical significance to the relative lengths of the events shown. Light blue, data points; dark blue, fit to the data points. Lower panels show the distribution of average burst speed. The number of events, the average burst speed and its distribution are plotted under each panel. Green, data points, with s.d. (bars); red, Gaussian fits to the data. Note that the WA derivative shown here is biotin tagged and will, therefore, associate with the bead. A His-tagged derivative showed similar velocities. The data shown were obtained at a force of 5 pN and 2 mM ATP.

Trimers with a single catalytic mutation give translocases impaired in displacing a DNA roadblock

To calibrate the relative ability of molecular motors to strip proteins from DNA, we have generated a panel of mutated streptavidins with a wide range of off-rates from biotin (Chivers *et al*, 2010). The streptavidin–biotin interaction is one of the strongest non-covalent interactions characterized, with a K_D of $\sim 4 \times 10^{-14}$ M (Green, 1990). Here, we focused on one stronger mutant and one weaker mutant of streptavidin. The stronger streptavidin mutant had a 10-fold lower off-rate from biotin ($< 2\%$ spontaneous dissociation from biotin-4-fluorescein in 12 h) than wild-type streptavidin (12% spontaneous dissociation in 12 h). The weaker mutant had accelerated dissociation from biotin conjugates (Supplementary Figure S1), but binding was still strong enough to survive gel electrophoresis.

Therefore, to examine the ability of FtsK to do mechanical work to displace roadblocks on DNA during translocation, we

compared the ability of wild-type and mutated trimers to displace wild-type and mutated streptavidins from biotinylated DNA. A 597 bp DNA fragment biotinylated at one end and with two KOPS sites positioned 230 bp upstream was bound by streptavidin and used in FtsK translocation assays. After 2 min reactions with translocase and ATP, agarose gel electrophoresis was used to analyse the fraction of DNA molecules where streptavidin had been displaced. Excess free biotin was used as a ‘sink’ to prevent rebinding of displaced streptavidin and 0.1% SDS was used to stop translocation, conditions that do not denature streptavidin (Figure 5). Wild-type hexamers displaced $> 70\%$ of streptavidin in 2 min, whereas translocases with two WA or WB mutations displaced $< 45\%$ of streptavidin. In all, 30% of the tight-binding streptavidin was displaced in 2 min by the wild-type trimer, whereas $\leq 10\%$ was displaced by the singly mutated trimers. In contrast, the weaker streptavidin was displaced to comparable levels ($\geq 82\%$) by all three proteins,

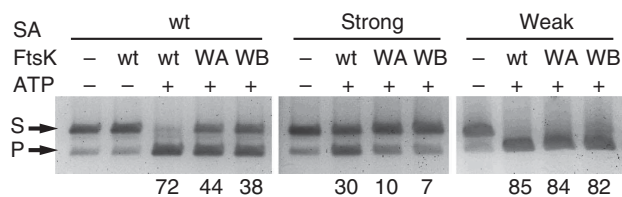


Figure 5 Displacement of the streptavidin ‘roadblock’ during translocation. Streptavidin displacement activity was followed on a 597 bp biotinylated DNA. Excess streptavidin (wt, strong, or weak binding derivatives) was bound for 30 min and then excess free biotin was added. The indicated trimers (WA and WB contained mutations in the central subunit; 250 nM hexamer) were added, followed by ATP, and the reactions were stopped after 2 min. % displacement (determined by gel electrophoresis; 1.5% agarose/TBE; background subtracted) is indicated. Independent repetitions (≥ 2) gave comparable results. (S) substrate; (P) product.

showing that they have comparable abilities to translocate up to, and displace, a weak roadblock. Taken together, these data show that trimers with one catalytically inactive subunit form translocases as rapid as those formed by wild-type trimers, but which are impaired in displacing strong roadblocks that include triplex DNA and streptavidin bound to biotin.

Discussion

The construction of functional FtsK covalent multimers has provided robust new dsDNA translocases that still recognize KOPS-loading sites on DNA and activate XerCD recombination at *dif*. The use of covalent multimers has revealed new insight into the catalytic mechanism of FtsK and has demonstrated that translocation velocity can be uncoupled from the ability to actively remove roadblocks on DNA. Covalent trimers dimerize efficiently to form biologically active hexamers. We found little formation of higher-order multimers that would complicate the interpretation of the data. Covalent trimers containing catalytic mutations in the central position formed translocases with normal translocation velocities at forces at least up to 10 pN, and were able to translocate over 1 or 2 μm in a single processive event. Nevertheless, these mutated translocases were compromised in their ability to displace streptavidin from biotinylated DNA or a triplex oligonucleotide. The ability to separate translocation velocity from force generation in displacing a potential ‘roadblock’ has mechanistic implications and substantiates our belief that we are not forming a wild-type hexamer within a higher-order structure that has catalytically inactive subunits positioned outside of the functional hexamer (Figure 1B). This is the first study that we are aware of that uses covalently linked multimers to study a hexameric DNA translocase, although mechanistic and structural studies of the hexameric ClpX protein-unfolding machine and of RecA have used covalently linked subunits (Martin *et al*, 2005; Chen *et al*, 2008; Glynn *et al*, 2009).

The FtsK translocation mechanism

Historically, three types of mechanism have been considered for the translocation of ring-shaped translocases and helicases (Singleton *et al*, 2007; Thomsen and Berger, 2009). Stochastic mechanisms require that subunits in a ring ‘fire’ randomly, and such a mechanism has been proposed to operate during protein unfolding by ClpX (Martin *et al*,

2005). A concerted mechanism, in its most rigorous form, requires that all potentially active subunits fire simultaneously. Although a concerted mechanism has been proposed for the translocase action of SV40 T antigen (Gai *et al*, 2004), there is no compelling evidence to believe that such a mechanism operates widely. In contrast, sequential, ‘binding change’ models for translocation receive extensive support. In these, an asymmetry in the ring, as a consequence of different nucleotide-binding states, is propagated around the ring as DNA or RNA is translocated through the ring. The F1 ATPase provides the paradigm for such a rotary motor, although in this case only three of the six subunits in the ring are catalytically active (Zhou and Boyer, 1993); experimental data derived from studies of a number of helicases and translocases lend support to such a mechanism (reviewed in Singleton *et al*, 2007; Enemark and Joshua-Tor, 2008). Structures of the T7 gp4 helicase in the absence of DNA revealed asymmetric nucleotide-binding states within the ring and led to a ‘hand-off’ model in which each subunit changes its nucleotide contacts with each catalytic step (Singleton *et al*, 2000; Figure 6A). Subsequent studies of the same protein led to the conclusion that the catalytic mechanism required that all six subunits be catalytically active for translocation to occur, as doping of wild-type protein with a catalytic mutant had an immediate and dramatic effect on DNA-dependent nucleotide hydrolysis; nevertheless, unscheduled ATP hydrolysis in the absence of DNA continued with stochastic firing of catalytically competent subunits (Crampton *et al*, 2006).

Subsequently, a rotary hand-off translocation mechanism for FtsK was proposed on the basis of structural studies, with the suggestion that 2 bp are translocated per catalytic step, with a rotational resetting after each step to accommodate the difference between the normal 10.5 bp per helical turn of B DNA and the 12 bp proposed to be translocated in a complete hexamer catalytic cycle (Massey *et al*, 2006). This resetting can explain the modest level of (+) DNA supercoiling that accumulates ahead of the translocase (Saleh *et al*, 2005). If this mechanism operates during FtsK translocation, the observation that hexamers with two catalytic mutations show normal velocity suggests that the mechanism can accommodate a now substantial rotational (or translational) resetting to locate the next active subunit. Such a major resetting without influence on translocation velocity seems unlikely and is inconsistent with a strict hand-off sequential mechanism. It would also imply that nucleotide binding or release rather than the chemical steps would be rate limiting in such semi-sequential translocation.

More recently, structural studies of E1 papillomavirus helicase (Enemark and Joshua-Tor, 2006) and RNA translocase Rho (Thomsen and Berger, 2009) revealed more incisive mechanistic insight into the translocation process, because the structures showed the asymmetry and different nucleotide-binding states required for a sequential-binding site change mechanism. In each of these cases, a spiral staircase of loops protrudes into the central channel, with each loop grasping the phosphodiester backbone, in a way that can help propel the nucleic acid with respect to the protein. Both of these structures support an ‘escorted translocation’ mechanism, rather than a hand-off mechanism (Figure 6). In the Rho mechanism, six nucleotides of ssRNA occupy the channel, with each nucleotide potentially being bound by a loop

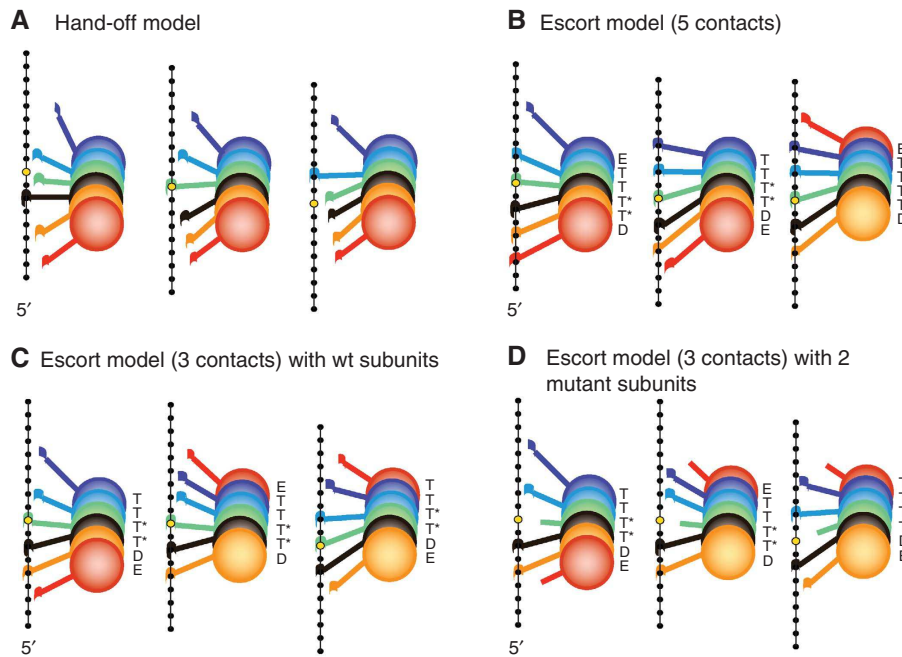


Figure 6 Translocation models. Scheme of FtsK translocation on DNA. The six subunits are drawn as spheres with a paddle representing the loop(s) in the α and/or β domains interacting with DNA nucleotides (black dots). One nucleotide is taken as a reference to show relative movement (yellow dot). Subunits inactivated by WA or WB catalytic mutations are indicated by a shorter paddle without the hook. Note that to simplify the drawing, subunits are represented linearly, but in reality would form a ring around DNA. **(A)** A sequential hand-off mechanism as applied to FtsK. In this model, all protein subunits change their local association with a given DNA segment, whether it be through specific contacts or not, during each chemical step (Massey *et al*, 2006; Enemark and Joshua-Tor, 2008). Each catalytic step leads to 2 bp dsDNA translocated. **(B)** Sequential escort model, as applied to FtsK. In this class of model, only one of the subunits changes its DNA contacts at each catalytic step and flexibility in the subunits and their loops allows movement of one subunit from the bottom to the top of the staircase during each catalytic step (Enemark and Joshua-Tor, 2008; Thomsen and Berger, 2009). In this panel, five of the six subunits are contacting every other nucleotide to avoid the substantial overwinding required to contact adjacent nucleotides. This model would require $>30 \text{ \AA}$ movement of a subunit, as it moves from the bottom to the top of the staircase. The indicated nucleotide states of the subunits are; T, ATP bound; T*, ATP transition state; D, ADP bound; E, 'exchange' (nucleotide free) (Thomsen and Berger, 2009). **(C)** Escort model with three subunit–nucleotide interactions, each occurring every other nucleotide. In this case, the movement of subunits and their loops during transition from the bottom to the top of the staircase would be similar to that for Rho/E1 ($\sim 15 \text{ \AA}$). **(D)** Escort model in a hexamer containing two mutated subunits. At least two protein–DNA contacts are still feasible in this situation, allowing velocity to remain the same, but reducing the work available to displace roadblocks.

derived from each subunit of the hexamer. After ATP hydrolysis, phosphate is eventually released to give a subunit that loses its strong association with nucleic acid. On ADP release or ATP binding, a subunit loop switches position from the bottom to the top of the staircase, grabbing the 3' nt immediately ahead of the protein and only releasing the nucleotide six catalytic steps (i.e. one complete catalytic cycle) later; this requires a $\sim 15 \text{ \AA}$ movement of the loop. In the Rho structure, which has the nucleotide mimic ADP-BeF₃ bound to each subunit, there are two 'ATP-bound' states (T), two 'ATP-bound' transition states (T*), an 'ADP state' (D) and an exchange (E; nucleotide-free) state, organized in an anti-clockwise manner as one views from the 5' end of the RNA; intersubunit interactions are strongest in the transition state interface and weakest surrounding the exchanging subunit (Thomsen and Berger, 2009). Such a scheme can be applied to FtsK, although the substantial overwinding of duplex DNA in the FtsK hexameric channel, required if there were to be one set of nucleotide contacts per FtsK subunit, seems unlikely. An alternative would be to have one FtsK subunit per two nucleotides, with five contacts at any one time, giving 2 bp translocated per catalytic step and close to normal (or somewhat underwound) B DNA in the channel (Figure 6B). If this were the case, movements in the loop-contacting DNA

in the protein subunit that switches position in a given step would need to span $>30 \text{ \AA}$ of DNA, twice as large as in Rho or E1. However, if only a subset of subunits (Figure 6C) make a DNA contact at any time, then the catalytic cycle could be accommodated with movements similar to those observed for Rho/E1.

An escort model for FtsK translocation can accommodate our observation of normal velocity yet reduced ability to displace roadblocks when two catalytically inactive subunits are introduced into a hexamer. This is because coordinated cooperative interactions within the hexamer and with DNA potentially allow a subunit interface to bypass the active configuration without hydrolysing ATP (Figure 6D). Normal velocity is possible because the chemical steps are not rate limiting and/or because a 'Brownian ratchet' allows the bypass without a diminution in velocity. Nevertheless, a hexamer with two ATP non-hydrolysing subunits would be expected to be able to do less work in displacing a roadblock than a hexamer in which all subunits are catalytically competent, consistent with our observations. It is noteworthy that several hexameric rotary motors have evolved to have a mixture of inactive and active subunits, notably F1 ATPase and dynein. We note that the phage $\phi 12$ P4 hexameric pump, which belongs to the RecA-family, also

seems to use an escort mechanism for ssRNA translocation into the capsid, although in this case it appears that three consecutive nucleotide-bound subunits contact RNA and cooperate in catalysis (Mancini *et al*, 2004; Kainov *et al*, 2008).

Further understanding of the FtsK mechanism will require the combination of structural, biochemical, genetic and single-molecule studies. As yet, we have failed to obtain high-resolution structures of FtsK with DNA, which may reveal the predicted asymmetry in structure and nucleotide-binding state for a sequential-binding change model. Although single-molecule studies have been invaluable in analysing translocation speeds, processivities and directionality of translocation, the rapid speed of translocation has precluded obtaining data on individual catalytic step sizes. Similarly, our attempts to measure the amount of ATP consumed per bp of DNA translocated have had insufficient resolving power, given the speed of translocation (Graham JE and Sherratt DJ, unpublished data).

Finally, the types of study reported here need to be extrapolated to the *in vivo* temporal and spatial behaviour of FtsK in the final stages of chromosome segregation. *In vivo*, FtsK translocation must not be hindered by potential roadblocks on DNA, as FtsK needs to translocate from wherever it loads to XerCD-bound *dif* sites, where translocation stops and the final chromosome unlinking is activated. The ability of FtsK to efficiently displace streptavidin from biotin-DNA suggests that it is an efficient remover of roadblocks *in vivo*. The observation that FtsK hexamers with two mutated subunits can translocate with normal velocity yet are compromised in displacing roadblocks on DNA, also raises the possibility that *in vivo* FtsK translocation can occur in a mode that allows fast translocation without all subunits firing in each complete catalytic cycle, with the full catalytic potential only realized when roadblocks need to be removed during translocation.

Materials and methods

Strains and plasmids

E. coli DS9041 (FtsK_C) was used to express alleles of *ftsK* in *in vivo* recombination experiments (Recchia *et al*, 1999). *E. coli* BL21 was used to overexpress FtsK derivatives. All *ftsK* alleles were cloned into plasmid pBAD24, under an arabinose-inducible promoter and with an N-terminal 6His-tag (Guzman *et al*, 1995). Plasmid pFX142 is a pSC101 derivative containing two *dif* sites (Aussel *et al*, 2002). Kanamycin (50 µg/ml), ampicillin (100 µg/ml) and spectinomycin (25 µg/ml) were used when required. The C-terminus motor of FtsK was cloned from nucleotide 2518 to 3987, or 3990 when the stop codon was required. The monomer was cloned into pBAD24 between *EcoRI* and *HindIII* sites. The dimer contained the first subunit cloned between *EcoRI* and *XbaI* restriction sites, and the second between *XbaI* and *HindIII* sites. The two repeats were joined together by the sequence coding for the 14 amino-acid linker (GGGSEGGGSEGGG): 5'-GCGGCGTTCCGAGGGCGGTGGTTCAG AAGGCGTTCCGGT-3', followed by the *XbaI* restriction site. Trimers were designed the same way with three fragments cloned between *EcoRI*, *XbaI*, *KpnI* and *HindIII* sites, the last one containing the stop codon before the *HindIII* site.

Toxicity and *in vivo* recombination

Plasmids containing *ftsK* alleles were transformed into DS9041 and cells were grown in LB-glucose to avoid expression from *p_{ara}*. Overnight cultures were diluted 1/100 in LB, and FtsK expression was induced at A₆₀₀ 0.5 by 0.2% arabinose (3 h; 37°C).

Recombination was assayed as in Sivanathan *et al* (2006).

Protein purification

FtsK derivatives were purified as in Massey *et al* (2006), with purification through Talon resin, heparin and Q-HP columns (GE Healthcare). XerC and XerD were purified as in Subramanya *et al* (1997). Streptavidin variants were purified as in Howarth and Ting, 2008.

ATPase, *in vitro* recombination and triplex-displacement assays

These were as described in Massey *et al* (2006) and Sivanathan *et al* (2006), respectively. Reaction buffer (RB) was 25 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl₂; ATPase assays were carried out on a supercoiled, 9 kb plasmid and *in vitro* recombination on a dimeric plasmid derived from pMin33, which contains a *dif* site.

Electron microscopy and image processing

Protein samples and DNA were mixed at a ratio of 1 hexamer per 66 bp, or 1 per 54 bp for the short DNA and plasmid, respectively, in binding buffer (BB: 25 mM Tris pH 7.5, 30 mM NaCl and 5 mM MgCl₂). The protein-DNA samples were then applied to electron microscope hydrophilic grids coated with carbon film and stained with 2% uranyl acetate. The preparations were examined using a Philips CM120 electron microscope equipped with a LaB₆ filament, with an acceleration voltage of 120 kV. Electron micrographs were taken at a magnification of ×45 000 at low dose. Selected images were digitized with a step size of 12.5 mm on a Super Coolscan 9000 Nikon. The WEB and SPIDER software package (Frank *et al*, 1996) was used for all image processing. In all, 162 particles on plasmid and 2600 on short DNA were windowed, centred and aligned using the reference-free alignment procedure. For the gold labelling, 3 µl FtsK-DNA complex were applied on glow discharged carbon-coated grids. The grid was washed after 1 min with BB and incubated with Ni-NTA Nanogold (Nanoprobes) solution (5 µM Ni-NTA Nanogold in BB) for 4 min at 25°C. The grid was rinsed twice on drops of BB and stained with 2% uranyl acetate. In all, 1702 particles were windowed and subjected to reference-free alignment and sorted into 10, 50 or 100 classes using K-means clustering (Frank, 1990). A control was made using the same protocol as above but BB was used instead during the labelling step, and no significant difference was observed as for the shape and size of the particles.

Magnetic tweezer assays

Single-molecule experiments were performed with magnetic tweezers (Strick *et al*, 1996). Permanent magnets provided a constant force that varied from 1 to 10 pN in most experiments, although a few experiments were carried out at 35 pN. DNA (pFX355, 17 kb, gift from FX Barre) and surfaces were prepared as described in Lionnet *et al* (2008). Experiments were performed in a buffer containing 2 mM ATP, 10 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl and 10 mM MgCl₂. FtsK was added until translocation events were observed (typically 50 nM). For each translocation event, speed was obtained from a linear fit to the DNA extension versus time data. For each DNA molecule on a given condition, the individual translocation events were pooled and a histogram of the translocation speed was built, then fitted to a Gaussian function.

Streptavidin-displacement assays

DNA fragments (597 bp) were generated by PCR, using a 5' biotinylated oligonucleotide primer on a plasmid template containing two non-overlapping KOPS pointing towards the biotinylated end. This was first incubated with 0.5 µM streptavidin analogues in RB for 20 min, then 0.1 mM biotin was added as a sink before FtsK (250 nM hexamer). After 2 min incubation, 2 mM ATP was added. Reactions were run at 25°C for 2 min, stopped with 0.1% SDS, 20 mM EDTA pH 8 and loaded on a 1.5% agarose gel in TBE 1 ×. Gels were run at 4°C, 100 V for 90 min and visualized and quantitated as above.

Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online (<http://www.embojournal.org>).

Acknowledgements

The work in Oxford was supported by the Wellcome Trust (EC, IG, CV-B, MH and DJS) and the BBSRC (CEC). In Paris, the work was

supported by the Wellcome Trust (EC), ANR, IUF and an EU grant, Bionanoswitch (AM and J-FA). We thank many of our mechanistic biochemistry colleagues for invaluable discussions.

References

- Aussel L, Barre FX, Aroyo M, Stasiak A, Stasiak AZ, Sherratt D (2002) FtsK is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell* **108**: 195–205
- Begg KJ, Dewar SJ, Donachie WD (1995) A new *Escherichia coli* cell division gene, *ftsK*. *J Bacteriol* **177**: 6211–6222
- Bigot S, Saleh O, Cornet F, Allemand J, Barre F (2006) Oriented loading of FtsK on KOPS. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 1026–1028
- Chen Z, Yang H, Pavletich NP (2008) Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures. *Nature* **453**: 489–494
- Chivers CE, Crozat E, Chu C, Moy VT, Sherratt DJ, Howarth M (2010) A streptavidin variant with slower biotin dissociation and increased mechanostability. *Nat Methods* (in press; doi:10.1038/nmeth.1450)
- Crampton D, Mukherjee S, Richardson C (2006) DNA-induced switch from independent to sequential dTTP hydrolysis in the bacteriophage T7 DNA helicase. *Mol Cell* **21**: 165–174
- Dorazi R, Dewar SJ (2000) Membrane topology of the N-terminus of the *Escherichia coli* FtsK division protein. *FEBS Lett* **478**: 13–18
- Enemark EJ, Joshua-Tor L (2006) Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase. *Nature* **442**: 270–275
- Enemark EJ, Joshua-Tor L (2008) On helicases and other motor proteins. *Curr Opin Struct Biol* **18**: 243–257
- Frank J (1990) Classification of macromolecular assemblies studied as ‘single particles’. *Q Rev Biophys* **23**: 281–329
- Frank J, Radermacher M, Penczek P, Zhu J, Li Y, Ladjadj M, Leith A (1996) SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J Struct Biol* **116**: 190–199
- Gai D, Zhao R, Li D, Finkielstein CV, Chen XS (2004) Mechanisms of conformational change for a replicative hexameric helicase of SV40 large tumor antigen. *Cell* **119**: 47–60
- Glynn SE, Martin A, Nager AR, Baker TA, Sauer RT (2009) Structures of asymmetric ClpX hexamers reveal nucleotide-dependent motions in a AAA+ protein-unfolding machine. *Cell* **139**: 744–756
- Graham JE, Sivanathan V, Sherratt DJ, Arciszewska LK (2010) FtsK translocation on DNA stops at XerCD-*dif*. *Nucleic Acids Res* **38**: 72–81
- Grainge I, Bregu M, Vazquez M, Sivanathan V, Ip SC, Sherratt DJ (2007) Unlinking chromosome catenanes *in vivo* by site-specific recombination. *EMBO J* **26**: 4228–4238
- Green NM (1990) Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol* **184**: 51–67
- Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose p_{BAD} promoter. *J Bact* **177**: 4121–4130
- Howarth M, Ting AY (2008) Imaging proteins in live mammalian cells with biotin ligase and monovalent streptavidin. *Nat Protoc* **3**: 534–545
- Ip SC, Bregu M, Barre FX, Sherratt DJ (2003) Decatenation of DNA circles by FtsK-dependent Xer site-specific recombination. *EMBO J* **22**: 6399–6407
- Kainov DE, Mancini EJ, Telenius J, Lisal J, Grimes JM, Bamford DH, Stuart DI, Tuma R (2008) Structural basis of mechanochemical coupling in a hexameric molecular motor. *J Biol Chem* **283**: 3607–3617
- Lionnet T, Allemand JF, Revyakin A, Strick TR, Saleh OA, Bensimon D, Croquette V (2008) Single-molecule studies using magnetic traps. In *Single-Molecule Techniques: a Laboratory Manual*, Selvin PR, Ha T (eds). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Mancini EJ, Kainov DE, Grimes JM, Tuma R, Bamford DH, Stuart DI (2004) Atomic snapshots of an RNA packaging motor reveal conformational changes linking ATP hydrolysis to RNA translocation. *Cell* **118**: 743–755
- Martin A, Baker T, Sauer R (2005) Rebuilt AAA+ motors reveal operating principles for ATP-fuelled machines. *Nature* **437**: 1115–1120
- Massey T, Mercogliano C, Yates J, Sherratt D, Lowe J (2006) Double-stranded DNA translocation: structure and mechanism of hexameric FtsK. *Mol Cell* **23**: 457–469
- Moreau M, McGeoch A, Lowe A, Itzhaki L, Bell S (2007) ATPase site architecture and helicase mechanism of an archaeal MCM. *Mol Cell* **28**: 304–314
- Pease PJ, Levy O, Cost GJ, Gore J, Ptacin JL, Sherratt D, Bustamante C, Cozzarelli NR (2005) Sequence-directed DNA translocation by purified FtsK. *Science* **307**: 586–590
- Ptacin J, Nollmann M, Becker E, Cozzarelli NR, Pogliano K, Bustamante C (2008) Sequence-directed DNA export guides chromosome translocation during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 485–493
- Recchia GD, Aroyo M, Wolf D, Blakely G, Sherratt DJ (1999) FtsK-dependent and -independent pathways of Xer site-specific recombination. *EMBO J* **18**: 5724–5734
- Reck-Peterson SL, Vale RD (2004) Molecular dissection of the roles of nucleotide binding and hydrolysis in dynein’s AAA domains in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 1491–1495
- Saleh O, Bigot S, Barre F, Allemand J (2005) Analysis of DNA supercoil induction by FtsK indicates translocation without groove-tracking. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 436–440
- Saleh O, Pérals C, Barre F, Allemand J (2004) Fast, DNA-sequence independent translocation by FtsK in a single-molecule experiment. *EMBO J* **23**: 2430–2439
- Singleton MR, Dillingham MS, Wigley DB (2007) Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu Rev Biochem* **76**: 23–50
- Singleton MR, Sawaya MR, Ellenberger T, Wigley DB (2000) Crystal structure of T7 gene 4 ring helicase indicates a mechanism for sequential hydrolysis of nucleotides. *Cell* **101**: 589–600
- Sivanathan V, Allen M, De Bekker C, Baker R, Arciszewska L, Freund S, Bycroft M, Löwe J, Sherratt D (2006) The FtsK γ domain directs oriented DNA translocation by interacting with KOPS. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 965–972
- Steiner W, Liu G, Donachie WD, Kuempel P (1999) The cytoplasmic domain of FtsK protein is required for resolution of chromosome dimers. *Mol Microbiol* **31**: 579–583
- Strick TR, Allemand JF, Bensimon D, Bensimon A, Croquette V (1996) The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science* **271**: 1835–1837
- Subramanya HS, Arciszewska LK, Baker RA, Bird LE, Sherratt DJ, Wigley DB (1997) Crystal structure of the site-specific recombinase, XerD. *EMBO J* **16**: 5178–5187
- Thomsen ND, Berger JM (2009) Running in reverse: the structural basis for translocation polarity in hexameric helicases. *Cell* **139**: 523–534
- Vallee RB, Hook P (2006) Autoinhibitory and other autoregulatory elements within the dynein motor domain. *J Struct Biol* **156**: 175–181
- Watanabe YH, Motohashi K, Yoshida M (2002) Roles of the two ATP binding sites of ClpB from *Thermus thermophilus*. *J Biol Chem* **277**: 5804–5809
- Wiese C, Hinz JM, Tebbs RS, Nham PB, Urbin SS, Collins DW, Thompson LH, Schild D (2006) Disparate requirements for the Walker A and B ATPase motifs of human RAD51D in homologous recombination. *Nucleic Acids Res* **34**: 2833–2843
- Yu XC, Weihe EK, Margolin W (1998) Role of the C terminus of FtsK in *Escherichia coli* chromosome segregation. *J Bacteriol* **180**: 6424–6428
- Zhou JM, Boyer PD (1993) Evidence that energization of the chloroplast ATP synthase favors ATP formation at the tight binding catalytic site and increases the affinity for ADP at another catalytic site. *J Biol Chem* **268**: 1531–1538



The EMBO Journal is published by Nature Publishing Group on behalf of European Molecular Biology Organization. This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-Share Alike 3.0 Licence. [<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>]

12 Autres éléments sur l'étude de FtsK en molécule unique

L'union fait la force.
Oui, mais la force de qui?

(Alain, *Propos*)

Introduction

Dans ce chapitre, nous allons détailler les résultats que nous avons obtenus en molécules uniques sur l'activité ADN translocase de mutants de FtsK (Crozat 2010). Nous allons d'abord préciser les conditions dans lesquelles les données présentées dans le chapitre précédent ont été acquises (12.1 à 12.2). Nous présenterons ensuite (12.3 à 12.6) des données originales sur les trimères de FtsK comportant une mutation, et éventuellement un marquage biotine.

12.1 Mutants de l'unité moteur du complexe de FtsK

Trois mutations classiques dans l'étude des ATPases (pour une revue voir (Iyer 2004b; Erzberger 2006)), précédemment appliquées à des systèmes aussi variés que ClpB (Watanabe 2002), ClpX (Martin 2005), Rad51 (Wiese 2006) ou le complexe de réplication chez les *archaeae* (Moreau 2007), ont été réalisées dans les domaines d'interaction à l'ATP de FtsK :

1. la substitution K997A dans la *Walker A Box* (WA) doit empêcher l'interaction de l'ATP avec FtsK
2. la substitution D1121A dans la *Walker B Box* (WB) doit permettre l'interaction de l'ATP avec FtsK, mais empêcher son hydrolyse
3. la substitution R1146A dans le *Arginine Finger* (RF) pourrait modifier le couplage en *trans* de l'hydrolyse de l'ATP à la translocation sur l'ADN (Massey 2006)

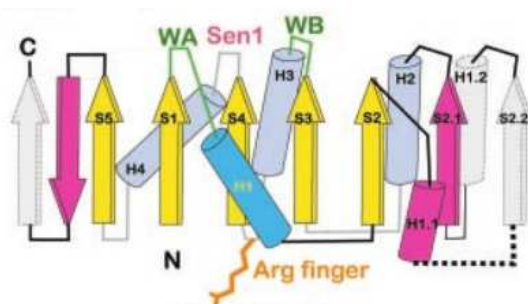


FIG. 12.1: Représentation schématique des domaines de FtsK. Reproduit de (Iyer 2004b) Fig. 1.

Les mutants ont été obtenus par Estelle CROZAT (équipe de David SHERRATT, Oxford, UK). Ils ont été réalisés dans le gène codant pour la partie FtsK_C de *Escherichia coli*, surexprimé dans une souche de *Escherichia coli* ΔFtsK_C (cf. Fig 12.2 p. 196). La

caractérisation de l'activité *in vitro* en volume a été réalisée par l'équipe d'Oxford, et nous avons réalisé avec Estelle CROZAT la caractérisation en molécules uniques sur mon montage, ainsi que l'analyse des données et leur interprétation. Cette collaboration a fait l'objet d'une publication (acceptée à *EMBO J.*) dont le texte est joint (p. 183).

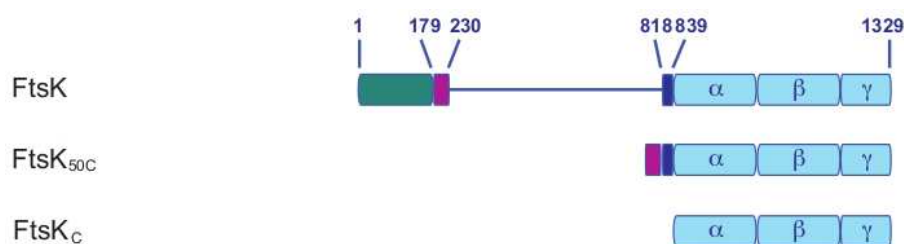


FIG. 12.2: Représentation schématique de *FtsK*, de la forme *FtsK*_{50C} utilisée jusqu'à présent dans les expériences de molécule unique, ainsi que de la forme *FtsK*_C utilisée dans cette étude. Reproduit de (Crozat 2010).

En plus des monomères recombinants, des protéines di-, tri-, tetra- et hexamériques ont été également préparées par Estelle CROZAT, par duplication du gène et insertion d'un *linker* de 14 acides aminés entre les monomères. Enfin, indépendamment du degré de multimérisation, certaines protéines recombinantes ont été préparées avec leur extrémité C-terminale portant une biotine ou un *His-tag*.

Pour des raisons pratiques, nous avons utilisé des trimères symétriques *wt - X - wt*, qui sont les multimères compatibles avec la formation d'un complexe hexamérique, pour lesquels la proportion de complexes de haut poids moléculaire avec l'ADN est la plus importante. *X* peut désigner selon les cas étudiés un monomère *wt* ou comportant une seule des mutations *WA, WB, RF*.

12.2 Activité ADN translocase de mutants en molécules uniques

12.2.1 Introduction

La mesure en volume de l'activité de déplacement de *triplex* et d'activation des recombinases XerCD montre qu'elles sont au moins partiellement découplées de l'activité ATPase.

Or ces expériences en volume sont potentiellement complexes à interpréter. L'activité globale mesurée est en fait la combinaison de plusieurs phénomènes :

1. l'initiation de l'expérience nécessite la formation d'un complexe actif à partir de trimères ;
2. le complexe actif doit être chargé sur l'ADN, probablement sur les sites KOPS présents, et dans le bon sens ;
3. le complexe chargé doit se déplacer sur l'ADN jusqu'au site de la réaction (*triplex* ou *dif*) ;
4. le complexe doit interagir avec le substrat de la réaction : déplacer le *triplex* en générant une force, ou interagir avec XerD.

La présence de mutants privés d'activité ATPase est susceptible d'influencer chacun de ces phénomènes de manière différente. Dans la mesure où la constitution du complexe hexamérique nécessite l'hydrolyse de l'ATP (Massey 2006), il aurait été possible

que la présence de mutants WA/WB aux extrémités du trimère empêche la formation du complexe et donc toute activité. Cependant, l'activité ATPase n'est pas possible sans formation de l'hexamère (Aussel 2002). Comme l'activité ATPase n'est pas nulle même quand les deux extrémités de chacun des trimères sont de type WA ou WB, nous interprétons ce résultat comme une preuve que l'hexamère se forme toujours (au moins jusqu'à 5 mutants par unité moteur).

L'écart à la linéarité de l'activité de déplacement de *triplex* et d'activation des recombinases signifie donc *qu'au moins un* des deux phénomènes restants (ADN translocase et interaction avec le substrat) est potentiellement découplé de l'activité ATPase et se fait de manière coordonnée. Les expériences réalisées à ce stade ne permettent pas de trancher lequel.

Nous avons donc réalisé des expériences de mesure de l'activité ADN translocase en molécules uniques sur des complexes de FtsK formés de trimères, comprenant ou non des monomères mutants WA/WB/RF.

12.2.2 Description

Nous avons évalué l'activité ADN translocase en molécules uniques par mesure du raccourcissement d'un ADN en pinces magnétiques. Pour des raisons discutées dans le chapitre 10 (p. 167), les complexes de FtsK s'assemblent en une ou plusieurs unités moteur sur l'ADN. Lorsque l'activité ADN translocase d'une de ces unités moteur est déclenchée dans des conditions favorables, la translocation du complexe à la vitesse v s'accompagne de la diminution, par formation d'une boucle d'ADN, de la longueur bout-à-bout de l'ADN à la même vitesse v . La mesure de celle-là est donc une observation directe de celle-ci.

La configuration que nous avons utilisée est un fragment d'ADN double brin linéaire, d'environ 17 kbp (de longueur cristallographique $5.8 \mu\text{m}$). Par les procédures habituelles (protocole 26 p.263), cet ADN est attaché spécifiquement à la surface de verre de l'échantillon et à une bille magnétique de $1 \mu\text{m}$ de diamètre. Par l'intermédiaire d'un couple d'aimants permanents, une force de tension variable mais connue est appliquée à l'ADN. Dans ces expériences, nous avons évalué le comportement de complexes de FtsK entre 2 et 20 pN.

L'activité a été évaluée, sauf indication contraire, en présence de $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATP et à une concentration de $10\text{-}50 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ en trimères.

12.2.3 Comparaison avec les données connues

Translocation

Le comportement de FtsK_{50C} a été décrit extensivement en expériences en molécules uniques de pinces magnétiques (Saleh 2004; Saleh 2005; Bigot 2005; Ptacin 2006; Bigot 2006) et optiques (Pease 2005; Levy 2005; Ptacin 2006). Nous avons observé dans les mêmes conditions la translocation de FtsK_{50C}; les complexes présentent une forte activité de formation de boucle, qui se traduit par une diminution de la longueur bout-à-bout de l'ADN presque linéaire en fonction du temps (*cf.* Fig 12.3 p. 198).

Par un système d'analyse automatique, les événements de translocation sur l'ADN sont détectés puis analysés. Nous avons utilisé un logiciel développé par O. SALEH (Saleh 2004) et V. CROQUETTE à partir d'un algorithme (Chung 1991) de filtrage de la dérivée de la position de la bille au cours du temps.

Les événements correspondant à une gamme de vitesse déterminée sont extraits de manière automatique des données. Pour chacun d'entre eux, nous pouvons calculer un

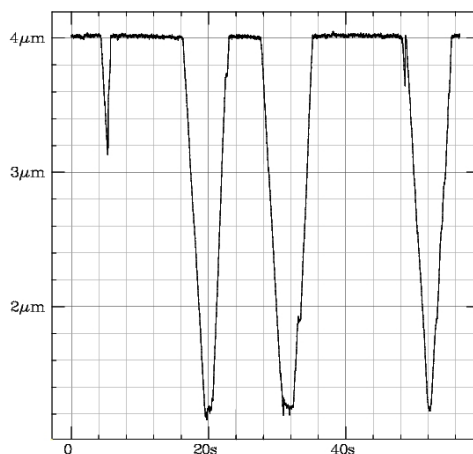


FIG. 12.3: Exemple d'événements de translocation de $FtsK_{50C}$ le long de l'ADN. $[ATP] = 2$ mM. Dans cette expérience, la force de traction est de l'ordre de 1-4 pN.

certain nombre de paramètres : vitesse moyenne, processivité, *on-time*, position de début et de fin sur l'ADN, etc.

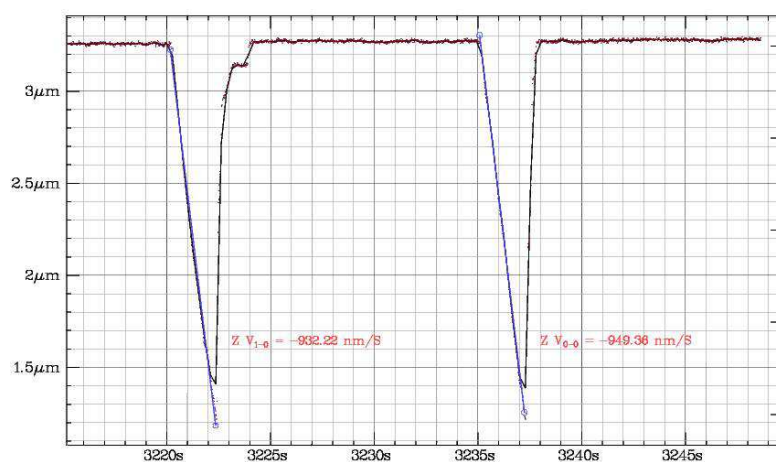


FIG. 12.4: Détection automatique d'événements de translocation d'un complexe de $FtsK_{50C}$. $[ATP] = 5$ mM.

Vitesse de translocation

La translocation peut être interrompue par des pauses ou des diminutions transitoires de la vitesse. Ces interruptions, d'une durée généralement inférieure à 100 ms, sont significatives puisqu'elles sont observées sur une plage temporelle couverte par 2 à 6 trames d'acquisition. Lors de l'analyse des données, elles sont automatiquement omises. La vitesse de translocation est mesurée par ajustement linéaire des segments de translocation continue.

Pour une molécule d'ADN donnée, l'histogramme des vitesses de diminution de la longueur bout-à-bout est construit à partir de ces ajustements linéaires (*cf.* Fig 12.5 p. 199). Pour chaque condition de force, il est établi à partir de plusieurs centaines ($N = 300 - 2000$) de mesures de vitesse.

La largeur relative de la distribution (15% - 25%) est nettement plus importante que

l'incertitude relative de la mesure sur le nombre N fini de points ($1/\sqrt{N} \approx 3\%-5\%$). Nous attribuons cette largeur à la variabilité intrinsèque de l'activité de formation de boucle des complexes de FtsK au cours de l'expérience. Nous montrerons qu'il est parfois possible de préciser si cette variabilité provient des différences d'activité de complexe à complexe, ou si elle provient de la différence d'activité d'un même complexe au cours du temps.

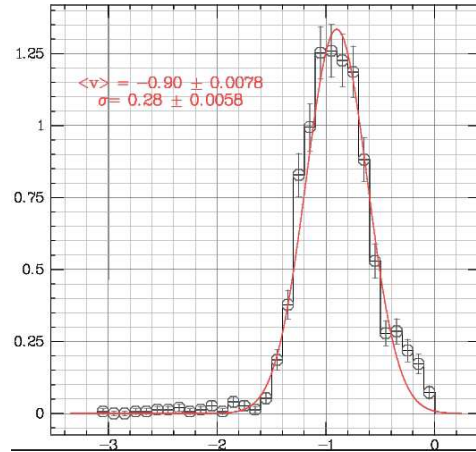


FIG. 12.5: Exemple d'historgramme de vitesse de diminution de la longueur bout-à-bout de l'ADN (en $\mu\text{m/s}$) par l'action de FtsK_{50C}. [ATP] = 2 mM ; N=1509 évènements. Dans cette expérience, la force de traction est de l'ordre de 1-4 pN.

Processivité

La diminution presque continue de la longueur de l'ADN peut être également interrompue par un allongement subit. Cet allongement peut être extrêmement rapide (de l'ordre de grandeur de la longueur totale de l'ADN le temps d'une trame d'acquisition), interprété classiquement comme la résorption de la boucle d'ADN créée par le complexe. Il peut également avoir lieu à une vitesse de l'ordre de la vitesse de translocation, interprété cette fois comme la consommation de la boucle par une autre unité moteur du complexe de FtsK. Dans chacun des cas, des pauses peuvent avoir lieu avant le retour de l'ADN à son extension maximale ; quoique de temps caractéristique comparable, la position de ces pauses ne semble pas corrélée à celles observées dans la formation de la boucle.

Deux types de processivité peuvent être définies dans le système : la première est la longueur moyenne des segments de translocation continue avant les pauses. Elle est liée à la probabilité linéique pour une unité moteur active de passer en mode inactif. La seconde est la longueur moyenne des évènements de translocation avant allongement ; elle est liée à la probabilité linéique pour une unité moteur active de se décrocher.

En effet, pour une probabilité élémentaire $P\Delta z$ de pause ou de décrochement au cours d'un pas Δz , la probabilité pour le complexe de parcourir une distance z avant de faire une pause ou de se décrocher vaut $P(z) = (1 - P\Delta z)^{z/\Delta z - 1} \cdot (P\Delta z)$. La limite $P\Delta z \ll 1$ vaut

$$P(z) = P\Delta z \cdot e^{-Pz} \quad (12.1)$$

Cette distribution est donc exponentielle (*cf.* Fig 12.6 p. 200). La valeur moyenne de cette distribution est par définition la processivité et vaut $\langle z \rangle = 1/P$.

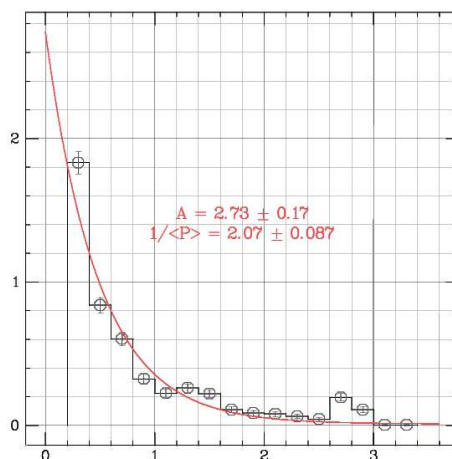


FIG. 12.6: Distribution de la processivité de diminution de la longueur bout-à-bout de l'ADN (en μm) par l'action de FtsK_{50C}. [ATP] = 2 mM ; N=1509 évènements. L'ajustement paramétrique donne $\langle P \rangle = 0.5 \mu\text{m}$.

Conclusion

Les évènements observés avec des monomères de FtsK_{50C} sont qualitativement similaires à ceux décrits précédemment dans la littérature.

De plus, la valeur de la vitesse de translocation des complexes de FtsK mesurée dans ces conditions ($1.1 \pm 0.2 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) est comparable, bien que plus faible, avec celle décrite précédemment (Saleh 2004), probablement à cause de la différence de concentration en ATP (2 mM dans nos expériences, 5 mM pour la littérature).

Enfin, les processivités de translocation avant pause et avant résorption de la boucle ont été mesurées ; leur distribution suit une loi exponentielle de même longueur caractéristique, ce qui suggère que le même mécanisme est en oeuvre dans ces deux types de changement d'activité du complexe de FtsK.

12.2.4 Activité de FtsK_C

Dans cette partie, nous présentons les premières expériences réalisées en molécule unique, à notre connaissance, sur FtsK_C. Au contraire de FtsK_{50C}, elle ne possède pas de domaine de multimérisation placé artificiellement à proximité de la sous-unité α . Son activité devrait donc être plus proche de celle du complexe *in vivo*.

Dans les expériences suivantes, des complexes de trimères *wt - wt - wt* ont été utilisés.

Translocation

Sur le même substrat d'ADN, dans les mêmes conditions de force de tension sur l'ADN et de concentration en ATP, le comportement qualitatif de $3 \times \text{FtsK}_C$ est indistinguable de celui de FtsK_{50C}. Des évènements isolés, correspondant à la translocation d'un complexe suivi d'un relâchement brusque plus ou moins rapide, avec une processivité avant relâchement plus ou moins grande, sont observés (*cf.* Fig 12.7 p. 201)

Vitesse de translocation

Par le même processus de détection automatique des évènements, avec les mêmes valeurs de paramètres, l'histogramme des vitesses de translocation pour chaque molécule

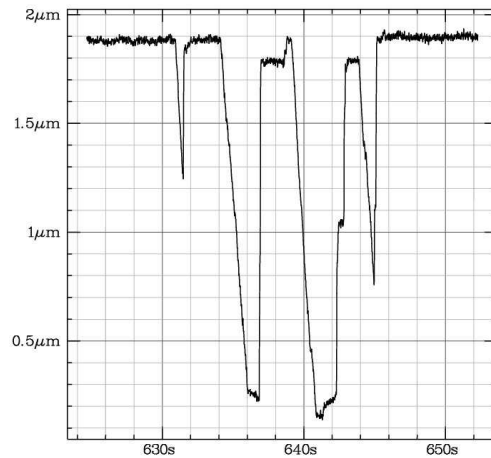


FIG. 12.7: Exemple d'évènements de translocation de $FtsK_C$ le long de l'ADN. $[ATP] = 2 \text{ mM}$; $F = 4 \text{ pN}$.

d'ADN est établi à partir de plusieurs centaines d'évènements (*cf.* Fig 12.8 p. 201). Dans les mêmes conditions, ni l'allure de la distribution, ni la vitesse moyenne, ni la largeur relative de la distribution ne distinguent significativement $3 \times FtsK_C$ de $FtsK_{50C}$.

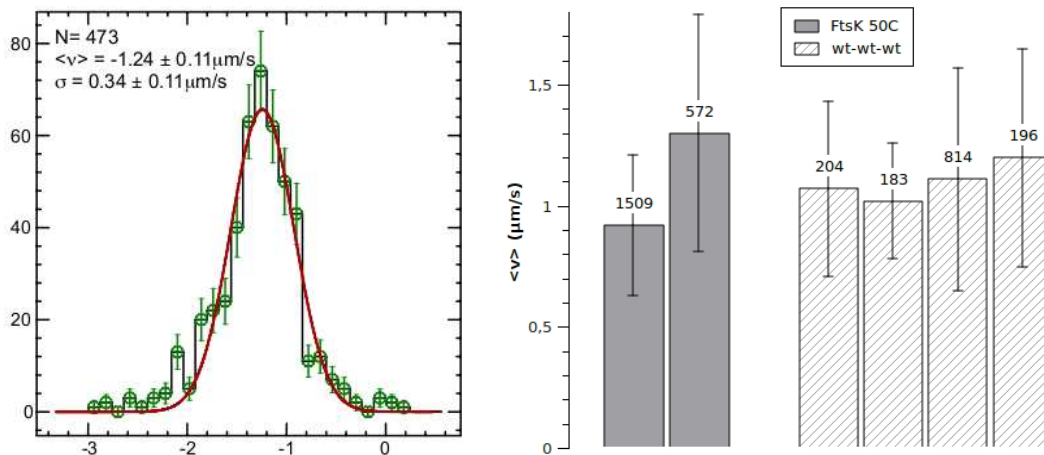


FIG. 12.8: [G] Exemple d'histogramme de vitesse de diminution de la longueur bout-à-bout de l'ADN par l'action de $3 \times FtsK_C$. $[ATP] = 2 \text{ mM}$. $F = 1-4 \text{ pN}$. [D] Comparaison des vitesses moyennes relevées sur différentes molécules d'ADN pour $FtsK_{50C}$ (gris plein) et $wt - wt - wt$ (gris tireté). Le nombre d'évènements est indiqué au-dessus de chaque situation.

Processivité

La distribution des distances parcourues par le complexe de FtsK avant une pause ou relâchement est établie comme précédemment. En pratique, particulièrement dans les études de mutants ou à basse concentration en ATP, plusieurs difficultés apparaissent.

La première difficulté est que la processivité diminue qualitativement très fortement lorsque la concentration en ATP diminue, jusqu'à des valeurs de l'ordre de 200 nm pour $[ATP] = 250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (*cf.* Fig 12.19 p. 212). Dans ce cas, la mesure efficace de la distribution aux petites valeurs de processivité est rendue difficile par le bruit de la mesure.

Cela engendre une incertitude importante sur la mesure de la processivité moyenne.

Par ailleurs, les évènements de translocation observés sont généralement plus compliqués que ceux présentés Fig. 12.7. Dans un certain nombre de cas, le relâchement de la boucle se fait lors de la collision de la bille avec la surface (*cf.* Fig 12.19 p. 212), la processivité mesurée n'est donc pas dépendante de la probabilité de décrochement dans les conditions «libres».

Enfin, à la suite d'un relâchement de la boucle, la remontée de la bille peut ne pas se faire jusqu'à sa position maximale, mais être interrompue par un nouvel évènement (*cf.* Fig 12.9 p. 202). La probabilité de rattachement pourrait ainsi être déduite de la mesure de la processivité.

Les études de processivité que nous avons menées sur ces différents aspects sont encore en cours de traitement et ne sont donc pas présentées plus en détail dans ce manuscrit.

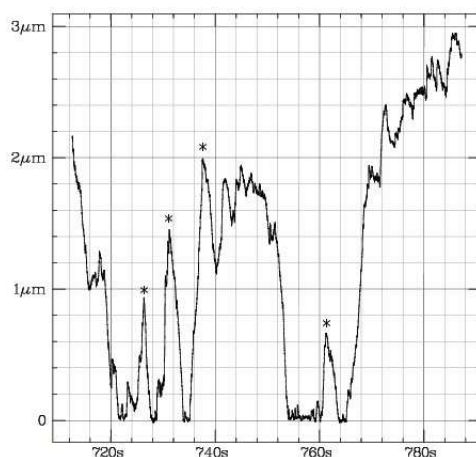


FIG. 12.9: Réinitiation de l'activité translocase avant le terme de la remontée de la bille magnétique, dans le cas de $3 \times \text{FtsK}_C$. $[\text{ATP}] = 200 \mu\text{M}$. L'extension maximale de la molécule d'ADN est d'environ $3.5 \mu\text{m}$. Les astérisques (*) signalent les évènements de réinitiation les plus significatifs.

Conclusion

A de légères variations d'activité près, le comportement qualitatif et quantitatif de FtsK_{50C} et $3 \times \text{FtsK}_C$ en translocation est donc identique. L'analyse des résultats en volume a pourtant montré que l'activité des complexes de *FtsK* dépendait beaucoup de la nature de leurs constituants : monomères, dimères, trimères. En dépit de leurs différences structurales dans la partie N-terminale, FtsK_{50C} et FtsK_C ne possèdent pas de différence notable dans leurs domaines responsables de l'activité de formation de boucle et d'interaction avec l'ADN.

Nous interprétons donc le fait que les activités de formation de boucle de FtsK_{50C} et $3 \times \text{FtsK}_C$ soient identiques, comme une preuve qu'ils forment des complexes de *FtsK* de structure comparable. Dans les conditions de concentration de *FtsK* utilisées, ces complexes se forment avec la même efficacité.

Par conséquent, FtsK_{50C} et $3 \times \text{FtsK}_C$ sont des modèles interchangeables de l'activité des complexes de *FtsK wt*. Les données en molécules uniques ou en volume obtenues sur chacun des deux devraient donc être directement comparables.

12.2.5 Activité des mutants WA, WB et RF

Dans les mêmes conditions que précédemment, les mutants $wt-WB-wt$ et $wt-WA-wt$ présentent une activité de formation de boucle en molécule unique qualitativement identique à $wt-wt-wt$.

Vitesse de translocation

L'analyse de l'activité de formation de boucle montre une densité d'évènements comparable au cas wt . La vitesse moyenne de ces évènements (WA : $1.12 \mu\text{m/s}$; WB : $1.16 \mu\text{m/s}$; wt : $1.24 \mu\text{m/s}$) est comparable (*cf.* Fig 12.10 p. 203) à la largeur de la distribution près. En revanche, les trimères $wt-RF-wt$ sont incapables de la moindre activité de formation de boucle dans ces conditions.

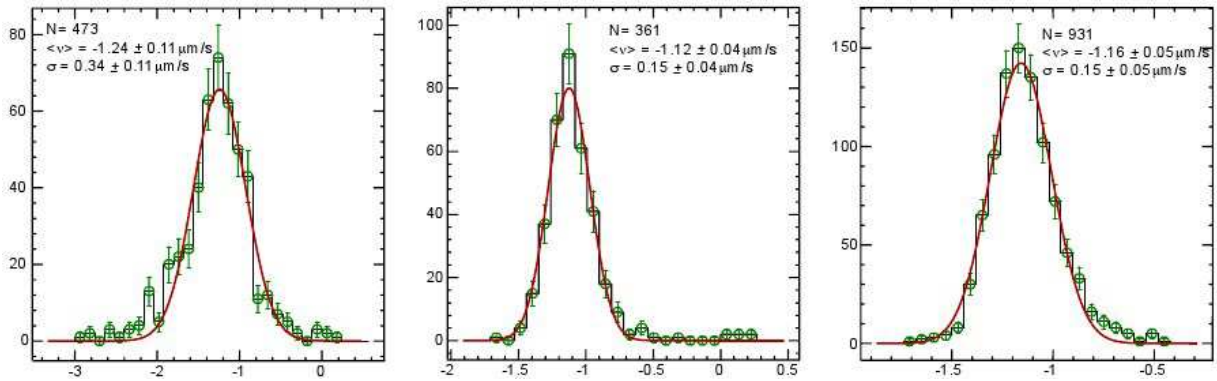


FIG. 12.10: Exemple d'histogramme de vitesse de diminution de la longueur bout-à-bout de l'ADN par l'action de [G] $wt-wt-wt$ [C] $wt-WA-wt$ [D] $wt-WB-wt$. [ATP] = 2 mM. F = 20 pN.

Ces données d'activité de formation de boucle contrastent fortement avec les activités de déplacement de *triplex* et d'activation des recombinaisons XerCD obtenues en volume (*cf.* Fig 12.11 p. 204). L'activité ADN translocase mesurée en molécule unique ne semble pas notablement affectée (<10%) par la présence de deux mutants WA, WB ou RF, alors qu'elle diminue fortement (entre 30% et 98%) dans les autres cas.

Cas du mutant RF

Effectivement, nous disposons d'un argument fort en faveur d'une séparation des activités de formation de boucle et ADN translocase : en présence d'une biotine C-terminale, le complexe $biot-wt-RF-wt$ est capable d'une activité de formation de boucle presque normale en molécule unique (*cf.* Fig 12.12 p. 204).

Même si la vitesse moyenne de formation de boucle est nettement plus faible pour $biot-wt-RF-wt$ ($0.71 \pm 0.30 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) que pour $biot-wt-WA-wt$ ($1.42 \pm 0.36 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), le fait d'être fixé sur la bille magnétique, probablement dans une configuration préférentielle, favorise notablement l'activité du complexe. Pour chaque couple ADN/FtsK, plusieurs centaines d'évènements ont été observés, ce qui signifie qu'une fois chargé sur l'ADN, l'activité du complexe se déroule normalement.

Conclusions mécanistiques

Ces résultats permettent de formuler plusieurs conclusions de nature mécanistique sur les complexes de FtsK.

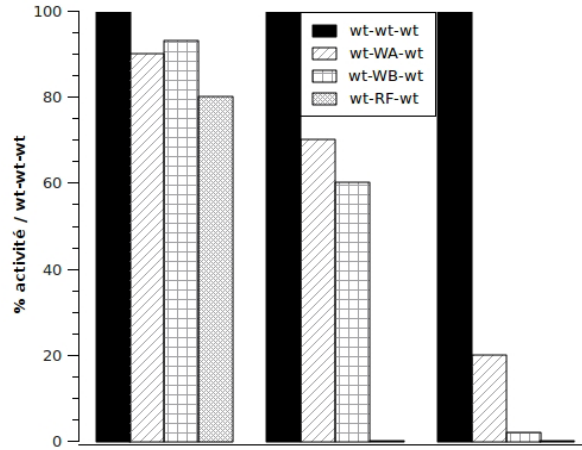


FIG. 12.11: Comparaison de l'activité des complexes de *wt-wt-wt* (normalisé à 100%), *biot-wt-WA-wt*, *wt-WB-wt* et *biot-wt-RF-wt* dans des expériences de [G] ADN translocase [C] Déplacement de *triplex* [D] Activation des recombinases XerCD.

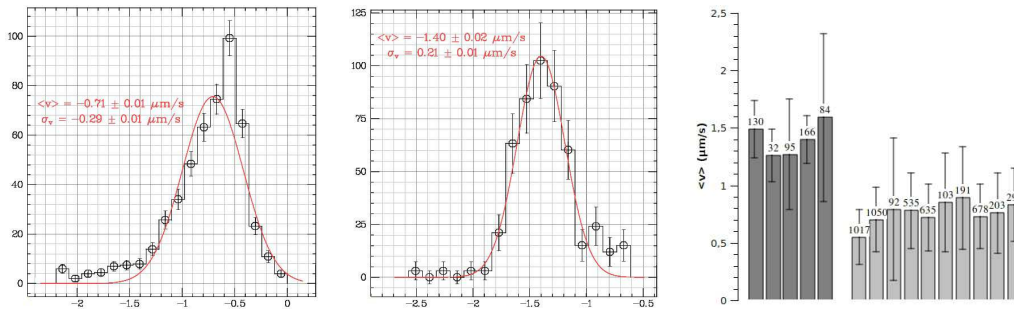


FIG. 12.12: [G] Histogramme représentatif de la vitesse de translocation de *biot-wt-RF-wt*. $N = 1050$ évènements. [C] Histogramme représentatif de la vitesse de translocation de *biot-wt-WA-wt*. $N = 166$ évènements. [D] Comparaison des distributions de vitesse observées sur une série de complexes fixés individuels. Les complexes *biot-wt-WA-wt* sont indiqués en gris foncé et les complexes *biot-wt-RF-wt* en gris clair. Pour chaque complexe est indiqué le nombre d'évènements analysés. [ATP] = 5 mM.

La première est que les activités de formation de boucle et ADN translocase sont bien séparées. Dans le cas de l'activité ADN translocase, l'introduction de deux mutations *WA, WB* ne modifie pas la vitesse par rapport aux complexes de trimères *wt*. Cela nous permet d'éliminer à la fois un modèle de coordination purement concerté (deux mutations aboliraient totalement l'activité) et un modèle purement stochastique (l'activité de l'hexamère comportant deux mutations devant être 33% inférieure à celle de l'hexamère *wt*).

Dans le cas de l'activité de formation de boucle, l'inactivité complète des complexes comportant deux mutants *RF* nous permet de montrer qu'il existe un certain degré de coordination. De la même manière, l'identité des vitesses de trimères *wt* ou avec une mutation *WA, WB* étant identique, nous pouvons également éliminer un mécanisme purement concerté.

Par ailleurs, l'absence de différence entre l'activité des trimères *wt-wt-wt*, *wt-WA-wt* et *wt-WB-wt* aurait pu laisser soupçonner qu'en réalité les trimères s'organisaient

de manière à éjecter du complexe actif les monomères mutants, de façon à reconstituer un complexe entièrement *wt* (cf. Fig 12.13 p. 205).

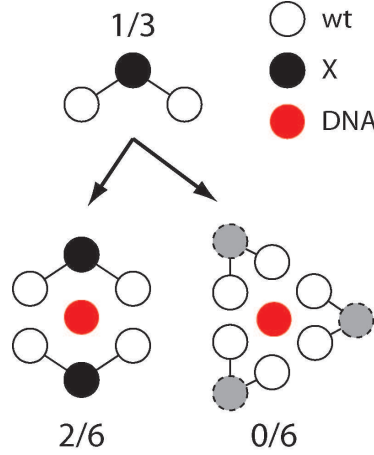


FIG. 12.13: Possibilités alternatives de structure du complexe actif de FtsK, formé par des trimères de type *wt* – *X* – *wt*. [G] Configuration attendue. [D] Configuration possible.

Les données sur *wt* – *RF* – *wt* ne sont pas compatibles avec le modèle d'éjection du monomère mutant; nous ne pouvons donc expliquer l'identité des activités de formation de boucle pour $X = wt, WA, WB$ que par un mécanisme de coopérativité entre monomères non-stochastique.

Ces données restent également cohérentes avec l'hypothèse émise lors de l'analyse des expériences en volume : l'activité ADN translocase est relativement indépendante de la capacité des complexes de FtsK à activer XerD ou déplacer des *triplex* (ainsi que la liaison biotine-streptavidine comme nous le montrerons plus loin); le premier phénomène est tolérant vis-à-vis de l'incapacité de deux monomères à hydrolyser l'ATP, alors que les deux autres dépendent crucialement de l'activité ATPase de tous les monomères (sans certitude de savoir pour l'instant si c'est un mécanisme concerté).

Lien entre activité ATPase et translocation

Considérons pour l'exemple un mécanisme où un monomère accomplit indépendamment des autres une action : ATPase et translocation pour un monomère *wt*; rien pour un monomère WA/WB/RF. En notant N_X le nombre de monomères de type *X* activés, Δt_X le temps attendu avant l'activation d'un autre monomère et Δz_X le pas effectif d'un monomère, la distance parcourue par le complexe est $\Delta z = N_{wt} \cdot \Delta z_{wt}$, la quantité d'ATP hydrolysée $\Delta ATP = N_{wt} \cdot \Delta ATP_{wt}$ et le temps écoulé $\Delta t = N_{mut} \cdot \Delta t_{mut} + N_{wt} \cdot \Delta t_{wt}$.

Par conséquent, la vitesse moyenne de translocation s'écrit

$$\langle v \rangle = \frac{\Delta z}{\Delta t} = \frac{\Delta z_{wt}}{\Delta t_{wt}} \cdot \frac{1}{1 + \frac{N_{mut}}{N_{wt}} \cdot \frac{\Delta t_{mut}}{\Delta t_{wt}}} \quad (12.2)$$

La comparaison de cette vitesse de translocation avec celle du cas purement *wt* donne

$$\frac{\langle v \rangle_{wt} - \langle v \rangle}{\langle v \rangle} = \frac{N_{mut}}{N_{wt}} \cdot \frac{\Delta t_{mut}}{\Delta t_{wt}} \quad (12.3)$$

Expérimentalement, puisque nous mesurons une faible différence entre la vitesse de translocation de *wt* et des mutants, le temps total passé dans les monomères mutants

est petit devant celui passé dans les monomères *wt*. Le complexe ne perd en quelque sorte pas de temps à «attendre» les monomères mutants et les monomères *wt* redémarrent très vite. Essentiellement, les Δt_X sont déterminés par la somme des temps d'arrivée de l'ATP et d'hydrolyse : $\Delta t_X = \Delta_{bind}t_X + \Delta_{hydr}t_X$.

Les données sur WA ne sont pas très significatives puisque WA est censé ne pouvoir ni complexer ni hydrolyser l'ATP : le temps passé à attendre le redémarrage d'un autre monomère est donc logiquement faible. De la même manière, le temps d'attente pour l'hydrolyse de l'ATP dans WB est supposé être négligeable. En revanche, le temps d'attente de l'ATP doit y être comparable à celui de *wt*. Le rapport des vitesses se réduit donc dans ce cas à

$$\frac{\langle v \rangle_{wt} - \langle v \rangle}{\langle v \rangle} = \frac{N_{WB}}{N_{wt}} \cdot \frac{\Delta t}{\Delta t_{wt}} = \frac{N_{WB}}{N_{wt}} \cdot \frac{1}{1 + \frac{\Delta_{hydr}t}{\Delta_{bind}t}} \quad (12.4)$$

Statistiquement, $N_{WB}/N_{wt} \approx 1/3$. Ce modèle explique donc la faible différence d'activité ADN translocase observée, par la propriété $\Delta_{hydr}t/\Delta_{bind}t \gg 1$. Il prédit donc que :

- l'hydrolyse de l'ATP est l'étape limitante de la translocation sur l'ADN
- le temps passé par le complexe de FtsK à attendre les monomères mutants est faible

Cette conclusion s'applique également au cas des mutants WB. Ces prédictions sont à l'opposé des observations réalisées sur le moteur du phage $\phi 29$ (Aathavan 2009) qui montre que dans ce cas c'est le temps d'attente de l'ATP qui fixe la vitesse de translocation.

12.2.6 Influence de la force de tension

Retour sur les expériences en volume

Les données obtenues en volume sur le déplacement des *triplex* peuvent être complètement interprétées : les complexes de FtsK contenant des monomères mutants, bien que se déplaçant de manière comparable aux complexes *wt*, sont incapables d'effectuer le déplacement de l'oligonucléotide. Cette action requiert une processivité de 21 nt en générant une force de tension de l'ordre de $5k_B T / (0.34 \text{ nm}) \approx 60 \text{ pN}$.

Les données sur le comportement de FtsK à très haute force sont parcellaires mais semblent indiquer qu'au moins la vitesse de translocation diminue au-delà de 40 pN (Saleh 2004). Il est donc possible que l'introduction de quelques mutations dans le complexe de FtsK ne modifie pas suffisamment l'activité ADN translocase, mais suffisamment cependant pour que la force maximale générée diminue en-dessous du seuil nécessaire pour déplacer le *triplex*.

Estelle CROZAT a donc réalisé une expérience en volume sur trois variants de la streptavidine : le *wt*, un à liaison plus forte à la biotine et l'autre à liaison moins forte. La capacité de complexes de FtsK, chargés sur les séquences KOPS d'un court ADN (600 bp), à déplacer la liaison streptavidine-biotine située à 230 bp des KOPS a été évaluée par un protocole de *gel shift*.

Les résultats (*cf.* Fig 12.14 p. 207) montrent que, en présence de $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATP et $1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ d'équivalents de monomères, les complexes formés des trimères *wt-WA-wt* et *wt-WB-wt* ont la même capacité à déplacer la streptavidine «faible» que les complexes *wt*. Cela signifie qu'ils possèdent encore une activité ADN translocase suffisante pour parvenir à la liaison streptavidine-biotine.

En revanche, cette activité de déplacement de la liaison streptavidine-biotine diminue vis-à-vis de la streptavidine *wt* alors que les complexes de FtsK *wt* conservent leur ac-

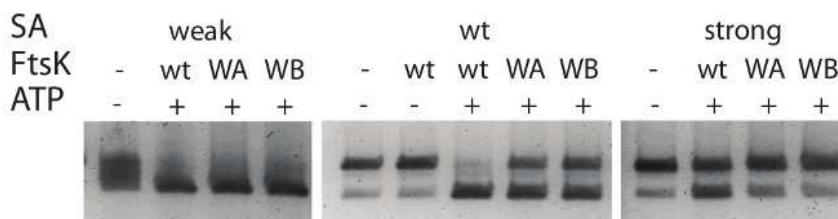


FIG. 12.14:

tivité. Elle devient négligeable pour les complexes mutants vis-à-vis de la streptavidine «forte» alors qu'elle existe encore partiellement pour les complexes de FtsK *wt*.

Nous interprétons ces données comme la dépendance forte vis à vis de la présence de mutants de l'activité de génération de force des complexes de FtsK.

Expériences en molécule unique

La transposition en molécule unique de cette expérience est conceptuellement facile à réaliser, puisque les dispositifs de pinces magnétiques permettent intrinsèquement de générer et mesurer une force de tension dans l'ADN. Lors de la translocation, les complexes de FtsK doivent lutter contre elle pour effectuer le raccourcissement de la longueur bout-à-bout de l'ADN, de la même manière qu'ils devraient générer une force pour déplacer la liaison streptavidine-biotine ou l'oligonucléotide d'un *triplex*.

Nous avons ainsi étudié l'activité ADN translocase de complexes de trimères de FtsK_C ou de monomères de FtsK_{50C} dans une large gamme de forces (2-20 pN) à concentration saturante en ATP (5 mmol·L⁻¹). Dans chaque cas, la distribution des vitesses de translocation a été mesurée (*cf.* Fig 12.15 p. 207).

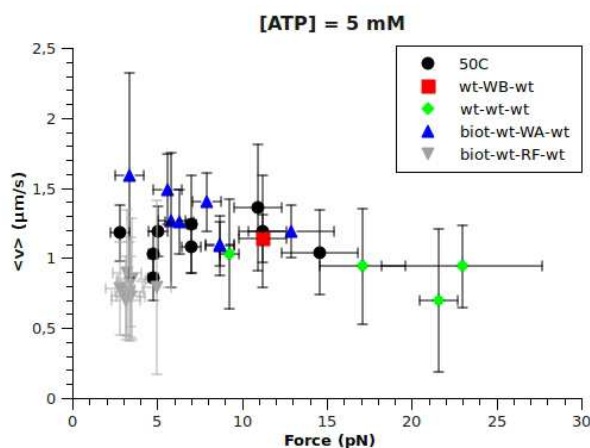


FIG. 12.15: Variation de la vitesse moyenne de translocation pour différents complexes (*biot - wt - WA - wt*, *wt - WB - wt*, *wt - wt - wt*, *biot - wt - RF - wt* et *wt*_{50C}) en fonction de la force. L'ADN utilisé est pLB50 et [ATP] = 5 mM. Des expériences ont également été menées jusqu'à $F = 25$ pN sur *biot - wt - WA - wt* (données non présentées) sans diminution notable d'activité.

Dans la gamme de forces considérées, la vitesse de l'ensemble des complexes de FtsK est globalement indépendante de la force et de la nature des monomères. Ce résultat, quoique cohérent avec les observations réalisées sur des expériences en volume (Croizat 2010), est

étonnant. En effet, nous pensions que les mutations introduites dans la partie ATPase du moteur modifieraient son comportement mécanique, par exemple sa force d'arrêt.

En conditions saturantes en ATP, à force plus faible que la force de décrochement (Saleh 2005), sur des hexamères comportant au plus deux monomères mutés, ces modifications ne semblent pas affecter le comportement mécanique. Nous pourrions encore prolonger ces expériences à plus haute force, tel que cela a été fait sur FtsK_{50C} jusqu'à 40 pN en pinces magnétiques (Saleh 2004) ou jusqu'à 45 pN en pinces optiques (Pease 2005). Cette dernière configuration est d'ailleurs plus propice, puisque dans le cas de pinces à position constante, l'initiation de formation des boucles (limitée par la force) se fait à basse force, ce qui augmente notablement la probabilité d'observation d'évènements. Par ailleurs, nous pourrions également mener des expériences sur les mutants *WB* et *RF* à plus haute force que celles qui ont été réalisées jusqu'à présent.

En réalité, nous avons cherché à nous placer dans des conditions plus restrictives, pour trouver des points de fonctionnement du moteur plus sensibles à ces mutations, en modifiant d'autres paramètres que la force de traction.

12.3 Complexes fixés

12.3.1 Introduction

Au vu des connaissances actuelles accumulées sur FtsK, et afin de tester des modèles de l'activité de la protéine, nous avons proposé précédemment un certain nombre d'expériences. Elles font pour la plupart appel au marquage spécifique de FtsK par un rapporteur fluorescent.

Les questionnements encore d'actualité sur la structure du complexe ne nous auraient pas permis d'utiliser de façon concluante une protéine de fusion avec une XFP ou un marquage immunologique. Par ailleurs, le marquage direct par un fluorophore unique (du type de ceux réalisés sur la kinésine (Yildiz 2004)) est délicat sans réaliser une ingénierie préalable de la protéine.

La solution la plus simple à mettre en oeuvre et la plus polyvalente a été d'introduire une biotine à l'extrémité C-terminale de FtsK, de façon à ne pas interagir avec les sous-unités α, β, γ . Cela a permis à la fois d'obtenir très simplement des variants (multimères covalents, mutants) marqués de manière comparable, et de pouvoir réaliser un marquage secondaire, *via* la streptavidine, à une large gamme de fluorophores : Cy et BOPDIPY directement conjugués à la streptavidine, *Quantum Dots*, *FluoSpheres*, *etc.*

Dans les expériences en molécule unique que nous avons réalisées, nous avons plus particulièrement utilisé les trimères covalents *biot - wt - wt - wt*, *biot - wt - WA - wt* et *biot - wt - RF - wt* préparés par Estelle CROZAT. En préparation de l'utilisation de ces complexes biotinylés dans des expériences de fluorescence, des tests en simples pinces magnétiques ont été réalisés pour comparer le comportement des versions biotinylées ou non. Dans le cas du trimère *wt - wt - wt*, la vitesse de translocation à 5 mmol.L⁻¹ ATP ne dépend pas de la présence^[1] ou de l'absence de la biotine (*cf.* Fig 12.16 p. 209).

12.3.2 Comportement observé

Lorsque la cellule est correctement préparée, la solidité des liaisons de l'ADN avec les surfaces de la lamelle de verre et de la bille est suffisante pour que nous puissions effectuer une série d'expériences dans des conditions différentes (concentration d'ATP, de sels, nature de la protéine, *etc.*) sur le *même* ADN.

¹Se référer au paragraphe 12.3.3 p. 210 pour une interprétation complète.

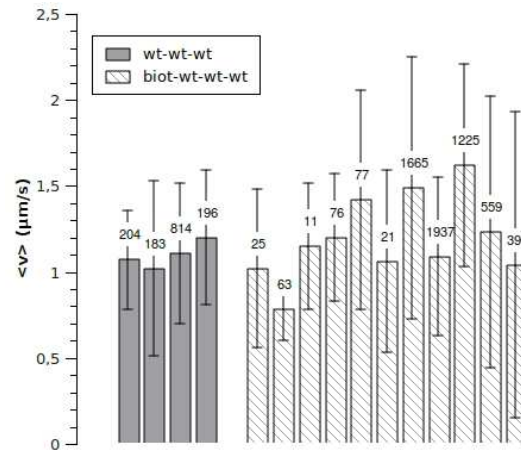


FIG. 12.16: Comparaison des vitesses de translocation des trimères covalents $wt-wt-wt$ et $biot-wt-wt-wt$ en présence de $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATP.

Une fois une expérience réalisée et suffisamment de données acquises, nous rinçons alors la cellule par environ 20 fois son volume de tampon frais dépourvu de protéines et de nucléotides. De cette façon, la cellule ne comporte plus de manière observable de molécules libres, comme confirmé par observation d'un traceur fluorescent (*cf.* Fig 12.17 p. 209) et l'absence totale d'activité de FtsK.

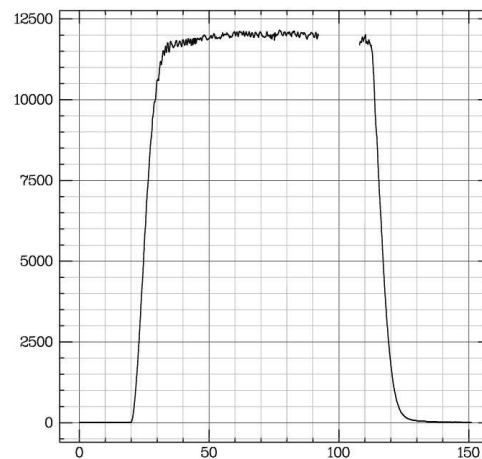


FIG. 12.17: Variation de l'intensité de fluorescence (u.a.) au cours du temps (s) dans une cellule lors de son remplissage par $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de ATP:Alexa 647 (employé comme traceur fluorescent) puis son rinçage par du tampon ne contenant pas de nucléotide. $\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$, excitation en ondes évanescentes, $T = 80 \text{ ms}$. Le temps caractéristique de variation des concentrations est de l'ordre de 15 secondes dans les deux cas.

A l'issue de ce rinçage, les ADN fixés à la bille et la surface de la lamelle de verre sont toujours présents; nous introduisons alors une nouvelle solution contenant nucléotides, sels, tampon et protéine. La concentration des protéines étant très faible ($1-10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), un temps de latence largement distribué (1-60 minutes) est nécessaire, le temps pour FtsK de diffuser jusqu'à l'ADN et d'y initier l'activité ADN translocase.

Cependant, lorsque la solution précédente contenait des trimères $biot-wt-wt-wt$, une partie notable des ADN «actifs» le redeviennent presque immédiatement (en quelques secondes) après introduction de la nouvelle solution (données non présentées).

Ce comportement suggère que le temps de latence n'est plus limité par la diffusion de FtsK.

Effectivement, en conduisant une nouvelle expérience avec une solution de *biot - wt - wt - wt*, puis après rinçage une nouvelle solution contenant de l'ATP mais totalement dépourvue de FtsK, nous avons continué à observer une activité ADN translocase immédiate et soutenue. Nous avons pu répéter ces cycles de changement de conditions sur un même couple ADN-FtsK jusqu'à une dizaine de fois sur 3 jours, et à une occasion jusqu'à 10 jours.

12.3.3 Interprétation

Puisque le rinçage permet d'éliminer presque complètement les molécules libres, nous en concluons que des complexes de FtsK sont restés accrochés d'une manière ou d'une autre à l'ADN. Comme nous n'observons pas ce comportement dans le cas de *wt - wt - wt* (ni d'autres formes de FtsK), nous en concluons que ce comportement est spécifique de la présence de la biotine.

Il se pourrait donc que le trimère interagisse avec une des surfaces. L'interaction non spécifique, bien que possible, ne nous semble pas un effet dominant étant donné le comportement de *wt - wt - wt*. En revanche, la surface de la bille magnétique étant recouverte de streptavidine, la biotine libre du complexe *biot - wt - wt - wt* peut interagir avec elle et s'y fixer.

Même s'il est plus petit que le chiffre de 50 000 obtenu par un raisonnement géométrique simple, le nombre de sites de fixation présents à la surface de la bille magnétique est important. Dans la situation où un trimère *biot - wt - wt - wt* se fixe à un d'entre eux suffisamment proche de l'ADN, il est alors «pré-chargé» dans une configuration favorable à l'activité ADN translocase. N'étant pas éliminé par rinçage, la reprise de son activité ne dépend que de la diffusion de l'ATP, présent à des concentrations ($0.2-5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) nettement plus importantes que FtsK.

Nous avons donc profité de ce comportement de complexes «fixés» à la surface de la bille magnétique pour pousser l'étude de FtsK dans des régions de l'espace des paramètres difficilement accessibles par les méthodes classiques. Ces expériences sont décrites dans les sections 12.4.1 et 12.4.2.

12.3.4 Perspectives

Les expériences en volume procèdent par un moyennage sur l'ensemble des protéines ; par contraste, les expériences en molécule unique s'appuient sur un petit nombre de molécules suivies au cours du temps. A la condition d'être certain d'observer une molécule unique, on peut donc reconstruire des distributions individuelles d'activité pour une condition donnée : concentration d'ATP, de sels, *etc.*

Ces distributions nécessitent d'acquérir un grand nombre ($N \geq 100$) d'évènements par complexe. Les évènements sont généralement regroupés sous forme de trains séparés par des pauses (*cf.* Fig 12.19 p. 212) ; pour garantir qu'une unique molécule est à l'origine de tous ces évènements, des arguments de dilution sont évoqués : la concentration de protéines libres est suffisamment faible (quelques molécules par micron-cube) et le temps d'initiation après injection suffisamment grand pour que deux évènements consécutifs ne puissent pas résulter de deux protéines différentes.

Dans le cas des complexes fixés, après rinçage, plus aucune protéine libre n'est présente : les évènements observés sur un ADN sont donc attribuables à un unique (ensemble de)

complexe(s) ^[2]. De plus, ce complexe fixé forme une paire protéine-substrat bien définie, qui peut être étudiée au cours du temps dans une variété de conditions.

Nous avons ainsi mesuré l'activité d'un unique complexe de FtsK en fonction de la concentration en ATP et mesuré sa constante de MICHAELIS (section 12.4.2). Nous avons également commencé à étudier le vieillissement d'un complexe de FtsK et son effet sur son activité (section.12.4.3).

12.4 Résultats sur les complexes fixés

12.4.1 Stimulation de l'activité de formation de boucle

Nous avons présenté p. 204 la différence d'activité entre trimères $wt - RF - wt$ et $biot - wt - RF - wt$, avec formation de boucles d'ADN uniquement dans le second cas. Nous estimons que le complexe fixé à la surface de bille par son extrémité biotine peut, par simple activité ADN translocase, engendrer la formation d'une boucle et donc d'un évènement en pinces magnétiques, sans nécessité de former la boucle d'ADN habituelle (cf. Fig 12.18 p. 211).

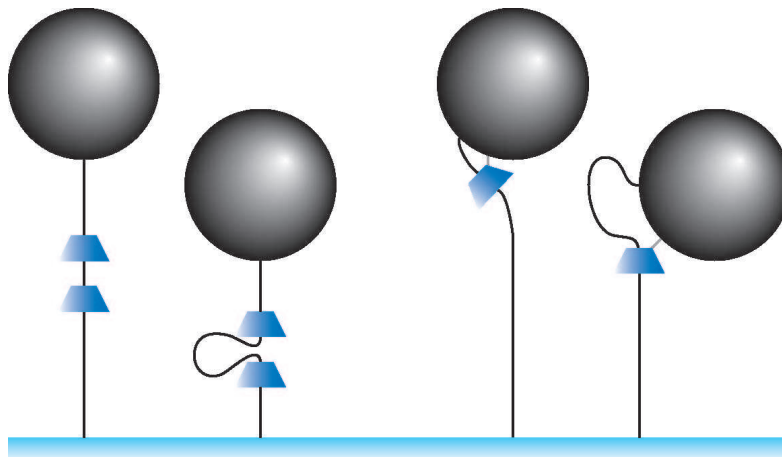


FIG. 12.18:

12.4.2 Etude à basse concentration en ATP

La présence et l'hydrolyse de l'ATP sont nécessaires à l'assemblage du complexe de FtsK sur l'ADN. En dessous d'une certaine concentration, l'activité ADN translocase peut être difficile à observer en raison de la faible probabilité d'accrochage et de la faible processivité (cf. Fig 12.19 p. 212). Or l'observation directe par marquage fluorescent de l'activité ADN translocase de FtsK est d'autant plus facile que le déplacement du complexe est lent, ce qui correspond à des concentrations en ATP faibles.

En utilisant des complexes fixés, nous avons pu observer très facilement le comportement de FtsK à basse concentration en ATP en injectant d'abord une solution de trimères $biot - wt - wt - wt$ à haute concentration en ATP ($2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), puis après rinçage en

²La question demeure de connaître la taille de cet ensemble; par manque de temps, nous n'avons pas mené d'expériences permettant de le mesurer. Bien que des arguments de dilution puissent également être utilisés pour justifier que ce nombre est très réduit, nous estimons qu'une démonstration par marquage fluorescent de l'unicité du complexe fixé sur une bille donnée permettrait de libérer les expériences en molécule unique de ce questionnement.

passant à une solution plus diluée (jusqu'à $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Sur un certain nombre d'ADN, une activité ADN tranlocase est immédiatement observée (cf. Fig 12.19 p. 212).

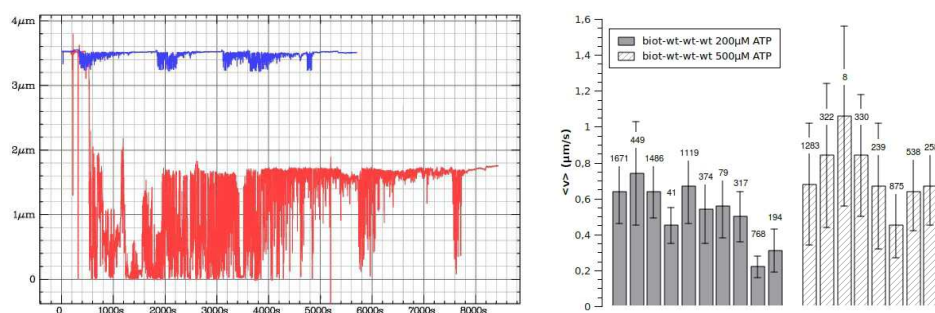


FIG. 12.19: [G] Superposition de trains d'événements de translocation de trimères *biot-wt-wt-wt*, représentatifs du comportement de *FtsK* à $[\text{ATP}] = 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (bleu) et $[\text{ATP}] = 500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (rouge). On remarquera en particulier la processivité beaucoup plus faible à basse concentration en ATP (cf. Fig 12.20 p. 212). [D] Comparaison des distributions de vitesse observées sur une série de complexes fixés individuels. Les complexes à $[\text{ATP}] = 200 \mu\text{M}$ sont indiqués en gris plein et les complexes à $[\text{ATP}] = 500 \mu\text{M}$ en gris tireté. Pour chaque complexe est indiqué le nombre d'événements analysés.

Bien que qualitativement comparables aux événements observés à plus haute concentration en ATP, ceux-ci se distinguent d'une part par une vitesse plus faible (cf. Fig 12.22 p. 215) et également par une processivité très diminuée : presque aucun événement ne dépasse 300 nm (cf. Fig 12.20 p. 212). La densité d'événements n'est, au moins qualitativement, pas affectée.

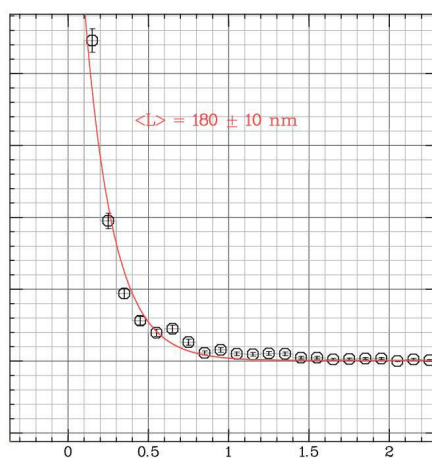


FIG. 12.20: Distribution de la processivité des événements de translocation des trimères *biot-wt-wt-wt* à $[\text{ATP}] = 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. L'ajustement à un modèle poissonnien du premier ordre donne $\langle L \rangle = 180 \pm 10 \text{ nm}$.

12.4.3 Etude du vieillissement protéique

Vieillesse rapide

Au cours d'une expérience (quelques dizaines de minutes), la vitesse et la processivité des événements semblent globalement diminuer (cf. Fig 12.21 p. 213), d'environ 50% sur 30 min.

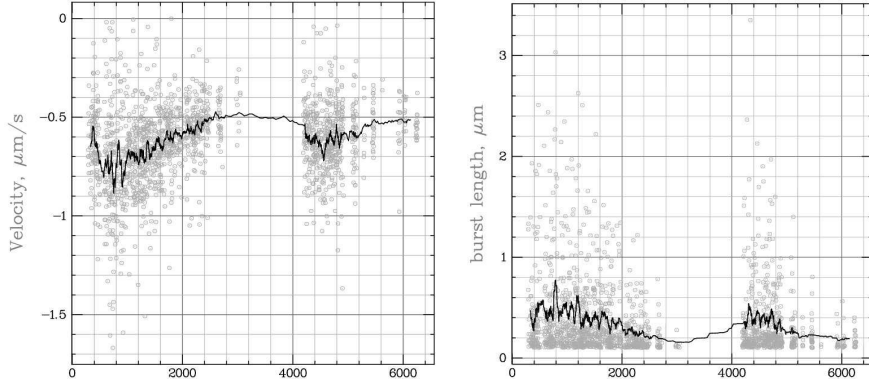


FIG. 12.21: Vieillesse rapide d'un complexe *biot - wt - wt - wt* en présence de $[ATP] = 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Les deux séries d'évènements sont séparés par une période de rinçage. [G] Ensemble des vitesses de translocation (en $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) mesurées au cours du temps (en s) sur les traces individuelles (gris) et moyenne glissante sur 32 points (noir). [D] Ensemble des processivités (en μm) mesurées au cours du temps (en s) sur les traces individuelles (gris) et moyenne glissante sur 32 points (noir).

Pour un complexe protéique fixé, une espèce de coefficient de diffusion D consommée avec un débit $\partial_t n$ et présente en concentration globale c_∞ , diffuse vers le puits avec une distance caractéristique

$$R^* = \frac{\partial_t n}{D \cdot c_\infty} \quad (12.5)$$

Dans les conditions de l'expérience, $D_{ATP} \sim 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, $c_\infty \sim 10^0 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ et le nombre de moles d'ATP consommées par seconde est de l'ordre de $\partial_t n_{ATP} \sim (2000\text{bp/s})/(2\text{bp/ATP})/\mathcal{N}_A \approx 10^{-21} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$. Par conséquent $R^* \sim 10^{-11} \text{ m}$.

De, plus le temps caractéristique associé au retour à l'état stationnaire est de l'ordre de $\tau^* \sim R^{*2}/D = 10^{-12} \text{ s}$. A l'échelle de temps de la variation d'activité observée, ce n'est donc pas un effet de concentration limitante en ATP qui peut expliquer cette évolution.

Par ailleurs, en faisant passer un flux de tampon réactionnel depuis le réservoir extérieur à travers la chambre, nous retrouvons un niveau d'activité normal, qui a son tour diminue au cours du temps. En présence de faibles concentrations d'ATP (données non présentées), on n'observe généralement que quelques (5-20) évènements de translocation après injection et nous devons réinjecter du milieu réactionnel depuis le réservoir pour initier à nouveau l'activité.

Explications

Nous pouvons avancer plusieurs hypothèses (non exclusives) pour expliquer ce phénomène de diminution de l'activité puis de reprise lors du rinçage. La première est le vieillissement progressive du milieu réactionnel par pollution par un sous-produit de la réaction comme l'ADP, PP_i ou des produits de réactions parallèles. Pour cela, nous avons étudié systématiquement l'effet de l'ADP sur l'activité ADN translocase (p.215).

La seconde est la consommation d'un réactif dont la concentration règle la vitesse d'une étape limitante, comme par exemple l'ATP ou les ions Mg^{2+} . Ces derniers étant présents en quantité importante ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), il est peu probable que leur concentration apparente varie dans le temps de l'expérience. Dans le cas de l'ATP, pour une concentration de $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ comme dans les données présentées, et à raison de l'hydrolyse de 1000 ATP/s, il faudrait une concentration en complexes **actifs** de l'ordre de $0.1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$

pour faire diminuer la concentration locale en ATP de 50% en 1000 s. Cela suppose que le contenu en ATP de la chambre expérimentale n'est pas rechargé par diffusion depuis le réservoir extérieur, ce qui est raisonnable à une distance de quelques dizaines de millimètres de celui-ci. Nous ne pouvons donc pas exclure que cette contribution ait un impact mesurable, bien que la concentration en complexes actifs est probablement plus faible.

La troisième est que, indépendamment de la raison de la diminution de l'activité, les contraintes mécaniques de tension créées par l'injection de milieu réactionnel depuis le réservoir «réactif» le complexe. En effet, lors de ce processus, l'ADN est fortement étiré latéralement par le gradient de vitesse du fluide et les accélérations dues au *stick-slip* dans la seringue qui aspire le milieu. En cours d'expérience, nous tentons parfois de reproduire ces conditions pour réactiver un complexe en appliquant transitoirement une force magnétique plus élevée. Nous n'avons pas mené d'expérience systématique pour vérifier l'influence réelle de ces contraintes de torsion sur l'activité du complexe.

Vieillessement à long terme

Les complexes fixés peuvent donc être activés et désactivés à volonté par changement de la solution. En l'absence de nucléotides, le couple ADN-FtsK est très stable et peut être conservé pendant quelques jours. En plus de l'intérêt pratique, évoqué plus haut, pour étudier le même complexe dans différentes conditions, cette configuration pourrait nous permettre d'observer l'évolution de l'activité d'une même protéine dans des conditions identiques, mais au cours du temps sur une échelle de quelques jours.

Expérimentalement, nous sommes capables de réactiver des complexes fixés jusqu'à quelques jours (3-4) après leur préparation, sans modification apparente de leur réactivité (données non présentées). Nous souhaitons réaliser des expériences quantitatives à cette échelle de temps pour savoir si ces complexes «vieillissent», c'est à dire que leur activité est modifiée au cours du temps et, si oui, si ce vieillissement est dû à la pollution par un milieu réactionnel vieillissant (formation de radicaux libres par exemple), ou si c'est une dynamique intrinsèque du complexe.

Comme nous pouvons contrôler à volonté le milieu réactionnel (présence d'antioxydants ou, au contraire, de radicaux libres, etc.), nous devrions pouvoir réaliser une étude raisonnablement facilement avec ce système.

12.5 Modulation de l'activité ADN translocase

12.5.1 Effet de la concentration en ATP

Le comportement de FtsK_{50C}, un variant de FtsK formant facilement des multimères, a été décrit précédemment *in vitro* en volume et en molécules uniques (Saleh 2004). Il suit une loi de MICHAËLIS-MENTEN avec $v_{\infty} = 6.7 \text{ kbp}\cdot\text{s}^{-1}$ et $K_M \approx 300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Dans ces conditions, la vitesse de translocation de FtsK_{50C} à la plus faible concentration en ATP testée ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) était d'environ $2.8 \text{ kbp}\cdot\text{s}^{-1}$, ce qui reste très élevé.

Des mesures effectuées sur notre appareil de l'activité de FtsK_{50C} sont en accord avec les observations précédentes rapportées dans la littérature. En tirant partie de la facilité d'opérer des changements de concentration en nucléotides sur des complexes fixés, nous avons également mesuré la dépendance en [ATP] de l'activité ADN translocase des trimères *biot - wt - wt - wt* et *biot - wt - WA - wt*.

Nous avons comparé ces données avec celles obtenues précédemment sur FtsK_{50C} (Saleh 2004). Dans le cas des trimères *biot - wt - wt - wt*, la vitesse limite ($1,4 \mu\text{m}/\text{s}$)

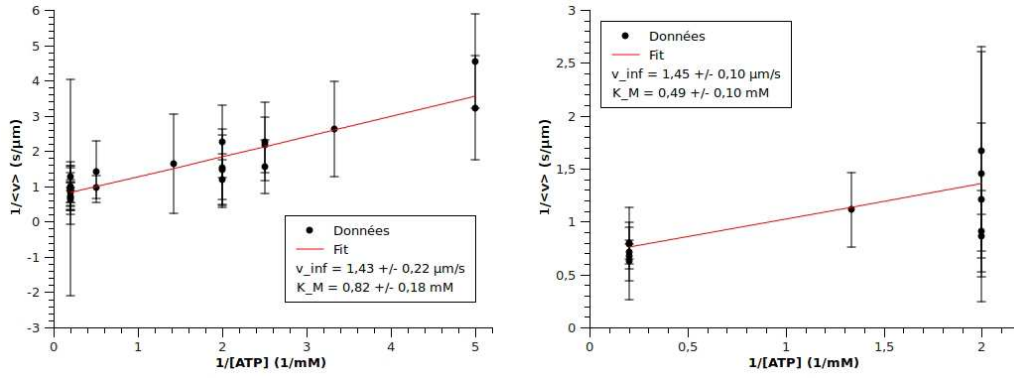


FIG. 12.22: Variation de l'activité ADN translocase de FtsK en fonction de [ATP]. [G] Données pour *biot – wt – wt – wt*; l'ajustement à un modèle de MICHAËLIS-MENTEN donne $v_{\infty} = 1,43 \pm 0,22 \mu\text{m/s}$ et $K_M = 0,82 \pm 0,18 \text{mM}$. [GD] Données pour *biot – wt – WA – wt*; l'ajustement à un modèle de MICHAËLIS-MENTEN donne $v_{\infty} = 1,45 \pm 0,10 \mu\text{m/s}$ et $K_M = 0,49 \pm 0,10 \text{mM}$.

est plus faible que pour FtsK_{50C} ($2,3 \mu\text{m/s}$). Comme un certain nombre de paramètres extérieurs peut influencer cette valeur, nous ne nous attardons pas plus avant sur la comparaison avec FtsK_{50C}. Dans des conditions strictement identiques, la vitesse limite des trimères *wt* ou contenant un mutant *WA* est en revanche identique.

A contrario, nous estimons que la valeur du K_M est un paramètre intrinsèque plus facilement comparable. Il est d'environ $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dans le cas de FtsK_{50C}. Nous le mesurons respectivement à $800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pour le trimère *wt* et $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pour le trimère contenant un mutant *WA*.

Ces résultats sont particulièrement surprenants : dans la mesure où il est considéré comme ayant les interactions entre sous-unités les plus stables, nous supposons que le trimère *biot – wt – wt – wt* posséderait la plus grande affinité pour l'ATP, et donc la valeur de K_M la plus faible.

En revanche, le mutant *WA* étant supposé posséder une faible interaction avec l'ATP, nous supposons que son K_M serait plus élevé que pour une forme *wt*. Cependant, comme la processivité de ce mutant diminue dramatiquement à basse concentration en ATP, nous n'avons pas réellement pu sonder des concentrations $[\text{ATP}] \ll K_M$. Nous espérons pouvoir reproduire l'expérience sur une plus grande gamme de [ATP] et également avec le mutant *biot – wt – WB – wt* afin de proposer une conclusion claire sur le lien entre mutations dans les domaines WA/WB et activité ADN translocase.

12.5.2 Effet de la concentration en ADP

Dérochage du complexe

A basse concentration en ATP, la processivité des événements de translocation de FtsK est clairement diminuée (*cf.* Fig 12.20 p. 212). Comme la distribution est en accord avec un modèle poissonnien du premier ordre, la situation peut être modélisée ainsi : à chaque pas, le complexe de FtsK possède une probabilité P_{off} de se décrocher de l'ADN, et $1 - P_{off}$ d'effectuer un autre pas. Dans la limite d'un grand nombre de pas, la probabilité de se décrocher exactement au N -ème pas vaut

$$P(N) = \frac{1}{P_{off}} e^{-N \cdot P_{off}} \quad (12.6)$$

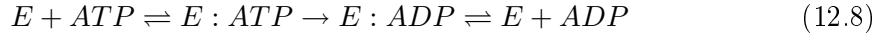
Par conséquent, le nombre moyen de pas au moment du décrochement du complexe vaut $\langle N \rangle = 1/P_{off}$. En supposant que chaque pas correspond à un déplacement Δz du complexe, la processivité vaut

$$\langle P \rangle = \frac{\Delta z}{P_{off}} \quad (12.7)$$

Selon toute vraisemblance, le pas Δz est une donnée structurale, donc indépendante de la concentration d'ATP. En revanche, P_{off} représente l'arbitrage entre le relarguage de l'ADP de l'unité moteur active suivi du décrochement du complexe, et le relarguage de l'ADP de l'unité moteur active suivie de l'incorporation et/ou de son hydrolyse dans une autre unité moteur. La balance des concentrations en ATP et ADP est donc susceptible de modifier cet équilibre.

Modélisation

La traduction du schéma de catalyse enzymatique présenté Fig.1.1 (p. 9) dans le cas de FtsK est le suivant



E représente le complexe de FtsK sur l'ADN ; les constantes cinétiques associées sont respectivement k_{\pm}^T , k et k_{\pm}^D . La convention + désigne le sens de réaction $ATP \rightarrow ADP$. Nous appellons $K_M^T = (k + k_{-}^T)/k_{+}^T$ et $K_d^D = k_{+}^D/k_{-}^D$.

En plus de ce schéma, le complexe E peut se décrocher pour former un état inactif E^{\dagger} selon une loi $E \xrightarrow{k_{off}} E^{\dagger}$. La probabilité de décrochage $P_{off} \propto k_{off} \cdot [E] \cdot \Delta t$ dépend donc essentiellement de la concentration $[E]$ de complexe «libre»

$$\frac{[E]}{[E]_{tot}} = \frac{1}{1 + \frac{[ATP]}{K_M^T} \left(1 + \frac{k}{k_{+}^T}\right) + \frac{[ADP]}{k_d^D}} \quad (12.9)$$

Ce modèle prédit donc que l'adjonction d'ADP va augmenter la processivité de FtsK. Cependant, en stabilisant le complexe $E : ADP$, elle diminue la vitesse de translocation du complexe

$$v = \frac{v_{\infty}}{1 + \frac{K_M([ADP]=0)}{[ATP]} \left(1 + \frac{[ADP]}{K_d^D}\right)} \quad (12.10)$$

Du point de vue de la cinétique macroscopique, ce modèle prédit que tout se passe comme si l'ADP agissait comme un inhibiteur compétitif de l'ATP.

Résultats

Nous avons mesuré la vitesse de translocation sur l'ADN de FtsK *biot - wt - wt - wt* en présence d'ATP ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) et d'une quantité variable d'ADP. Dans ces conditions, la vitesse de translocation diminue bien avec une concentration croissante d'ADP (*cf.* Fig 12.23 p. 217). L'ajustement paramétrique à un comportement d'inhibiteur compétitif conduit à mesurer $K_d^D = 2,4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Le second paramètre libre, la vitesse de translocation en l'absence d'ADP, est mesuré à $0,61 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$. Cette valeur est en accord avec la valeur théorique déterminée à partir des paramètres mesurés sur les données de la figure 12.22 ($0,54 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$).

Nous avons donc confirmé que la présence d'ADP dans le milieu conduit à une diminution de la vitesse de translocation, probablement par stabilisation de l'état $E : ADP$. En revanche, nous n'avons pas pu obtenir une mesure satisfaisante de la processivité des

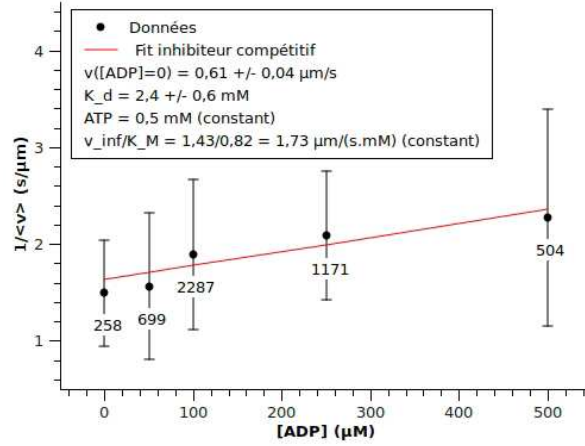


FIG. 12.23: Inhibition de la translocation de FtsK *biot-wt-wt-wt* sur l'ADN en présence d'ADP. [ATP] = 0,5 mM. F = 5-6 pN. Au-dessus des points expérimentaux (en noir) sont indiqués le nombre d'événements utilisés pour déterminer la vitesse moyenne dans une condition donnée. L'ajustement paramétrique (en rouge) est obtenu en fixant les paramètres indépendants de [ADP] à leur valeur mesurée sur les données de la figure 12.22. On obtient alors $K_d^D = 2,4$ mM et la vitesse limite en l'absence d'ADP $v([ADP] = 0) = 0,61 \mu m \cdot s^{-1}$ en accord avec la valeur théorique ($0,54 \mu m \cdot s^{-1}$).

complexes en présence d'ADP, qui aurait pu nous permettre de faire la différence entre un simple effet d'inhibition compétitive et un effet structural éventuel lié au relargage de l'ADP à la fin du cycle catalytique.

En revanche, la valeur élevée du K_d^D montre qu'il est peu probable que l'ADP produit par la réaction d'hydrolyse de l'ATP puisse contribuer significativement à la diminution de vitesse observée à court terme (1000 s) dans nos expériences (*cf.* p. 212).

12.6 Activité ATPase non processive

Nous présentons ici une rapide interprétation possible de la différence entre les constantes de couplage translocation-torsion théorique (prédites à partir de la structure) et expérimentale (Saleh 2005). Cette analyse quantifie l'effet d'événements de translocation non-processifs sur cette constante.

Si l'hydrolyse de l'ATP dans le monomère m^* n'est pas efficace, nous faisons l'hypothèse que c'est l'hydrolyse de l'ATP dans le monomère $m^{*'} = m^* + 1$ qui va secourir le complexe. La base de l'ADN la plus proche est celle pour laquelle la quantité $2\pi m^{*'} / N_F - 2\pi k^{*'} / N_A$ est positive et minimale, soit

$$k^{*'} = E \left(\frac{N_A}{N_F} m^{*'} \right) + 1 = E \left[\frac{N_A}{N_F} \cdot E \left(\frac{N_F \cdot \Delta_{ATPz}}{p_A - p_F} \right) + \frac{2N_A}{N_F} \right] + 1 \quad (12.11)$$

En supposant que les événements non-processifs ont une probabilité P de survenir, la constante de couplage translocation-torsion apparente vaut (en unités de tours par paire de base parcourue)

$$\frac{\Delta\theta}{\Delta z} = \frac{1}{N_A} - \frac{1}{N_F} \left((1 - P) \cdot \frac{m^*}{k^*} + P \cdot \frac{m^{*'}}{k^{*'}} \right) \quad (12.12)$$

La probabilité s'exprime donc à partir des valeurs mesurées

$$P = \frac{N_F \left(\frac{1}{N_A} - \frac{\Delta\theta}{\Delta z} \right) - \frac{m^*}{k^*}}{\frac{m^{*'}}{k^{*'}} - \frac{m^*}{k^*}} \quad (12.13)$$

Dans le cas $N_F = 6, p_F = 0$ cela conduit à $m^* = 1, k^* = 2, m^{*' } = 2$ et $k^{*' } = 2$. La compatibilité avec la constante de couplage expérimentale impose donc $P = 6.3\%$.

Les données de (Saleh 2005) pourraient donc être expliquées par un découplage ATPase-translocation dans 6% des cas, suivi par l'accrochage sur l'ADN du monomère suivant à la place du monomère défectif, correspondant à une translocation de 2 paires de bases. Bien que ce modèle ne fournisse pas d'explication pourquoi un évènement défectif doit avoir lieu une fois sur quinze, il montre cependant qu'une fraction modeste d'évènements de ce type devrait avoir des conséquences notables sur la génération de torsion par le complexe.

Nous estimons par conséquent qu'il sera très important de reproduire les expériences précédentes sur des molécules d'ADN surenroulables, afin d'obtenir une lecture en parallèle de l'activité mécanique en translocation et en torsion.

12.7 Conclusion

L'obtention de multimères covalents de FtsK a été un élément déterminant pour l'étude mécanistique : les trimères s'associent beaucoup plus facilement avec l'ADN en conditions de molécules uniques, et initient l'ensemble des activités actuellement connues de FtsK.

Par ailleurs, la production «a volonté» de mutants de FtsK nous a permis non seulement d'analyser l'impact de ces mutations sur des différentes activités mécaniques, mais également de tester le mode de coopérativité entre monomères, dans des expériences en volume comme en molécule unique.

Pour accéder à ces informations en molécules uniques, nous avons en particulier mis à profit la capacité de trimères biotinylés à se placer à la surface de la bille magnétique dans une configuration favorable. Nous avons montré que dans ces conditions, nous pouvions observer un unique couple ADN-protéine pendant un temps assez important. Nous avons ainsi obtenu une caractérisation de MICHAËLIS-MENTEN complète d'une molécule unique.

Nous avons également utilisé ce système pour sonder des états plus fragiles comme à basse concentration en ATP, ou en présence d'ADP, et ainsi révélé comment certains mutants différaient du monomère *wt* du point de vue de l'activité mécanique. L'interprétation du comportement des différents mutants s'est par contre avérée non triviale, et nous envisageons à présent une étude systématique des mutants en utilisant les techniques développées durant ce travail.

Enfin, en cherchant à comprendre comment l'activité d'une protéine évoluait au cours d'une expérience, nous avons présenté comment des aspects de vieillissement protéique à plus long terme (quelques jours) pouvaient être étudiés en molécule unique avec ce système.

Conclusions générales

Rappel des résultats

Durant ce travail, nous avons souhaité adjoindre aux capacités de micro-manipulation de molécules uniques en pinces magnétiques, que notre groupe maîtrisait préalablement, la possibilité de visualiser en temps réel la position de protéines uniques. A cet effet, nous avons choisi d'utiliser la microscopie de fluorescence en ondes évanescentes. Nous avons conçu et produit un dispositif expérimental qui combine ces deux capacités. Les tests et démonstrations de principe que nous avons effectués montrent que cet appareil possède les caractéristiques adaptées à notre objectif initial.

Nous avons ainsi entrepris d'étudier le mécanisme de fonctionnement de deux protéines : l'ARN Polymérase de T7 et FtsK de *Escherichia coli*. Pour chacune d'entre elles, nous avons construit des substrats d'ADN compatibles à la fois avec les exigences de micro-manipulation et de fluorescence en ondes évanescentes. Nous avons à cette occasion, et au fil des difficultés rencontrées, proposé et mis en oeuvre des stratégies innovantes de préparation de substrats d'ADN.

Pour obtenir des protéines marquées, nous avons obtenu par collaboration le gène (ARN Polymérase de T7) ou la protéine (FtsK) possédant une extrémité biotine. En tentant d'obtenir un complexe entre la protéine biotinylée et une molécule de streptavidine fluorescente (*Quantum Dot*, fluorophore organique), nous avons rencontré beaucoup de difficultés. Nous avons attribué ces problèmes à une mauvaise connaissance de l'état exact de chacun des partenaires du complexe (présence de biotine ou de streptavidine libre, états oligomériques de la streptavidine). Nous avons par conséquent conçu une série de protocoles de purification pour remédier à ces différentes imprécisions.

Par ailleurs, nous avons effectué des études de faisabilité en micro-manipulation afin de préparer les futures expériences en microscopie de fluorescence. Nous avons par exemple étudié la possibilité de réaliser un marquage direct de l'ARN transcrit par l'ARN Polymérase de T7, défini des procédures de synchronisation de la polymérase lors de l'élongation, ou encore étudié le comportement de mutants de FtsK et commencé à observer leur vieillissement.

Perspectives

Nous sommes, au moment de la conclusion de ce travail, en train de finaliser les procédures de purification des complexes protéiques fluorescents. Une fois ceux-ci correctement préparés et caractérisés, nous souhaitons effectuer les expériences préparatoires précédemment citées dans des conditions de pinces magnétiques couplées à l'observation en microscopie de fluorescence.

Dans le cas de l'ARN Polymérase de T7, nous espérons par exemple pouvoir observer plus finement l'interaction de la protéine avec son promoteur, ainsi que son comportement (comme la rotation de la polymérase autour de l'ADN) au cours de l'élongation. Pour FtsK, le marquage fluorescent devrait nous permettre de compter le nombre de monomères présents dans une unité moteur, et de déterminer ainsi la structure du complexe *in vitro*.

Conclusions générales

En plus de ces expériences, et de celles que nous avons proposées sur ces deux protéines dans ce manuscrit, la conjugaison de la micro-manipulation (en force et torsion) et de l'observation directe en ondes évanescentes offre des perspectives très intéressantes sur de nombreuses protéines interagissant avec l'ADN. En effet, cet appareil nous permettra d'observer le couplage entre la position de ces protéines (ou leur déplacement) et l'action mécanique qu'elles exercent : génération de force, de torsion, *etc.*

Nous espérons de cette manière avoir contribué à accroître les possibilités d'observation des pinces magnétiques, en particulier dans le cas de protéines dont l'action mécanique ne se traduit pas par un changement d'extension de l'ADN (comme l'ARN polymérase en élongation). Du point de vue de la microscopie de fluorescence de molécules uniques, cet appareil permettra également de proposer de nouveaux types d'expériences, en permettant de préparer des substrats d'ADN d'état bien caractérisé (position, tension, torsion) pour des protéines dont on souhaite étudier l'activité et élucider le mécanisme.

Quatrième partie

Annexes

13 Remerciements

A person who knows how to
laugh at himself will never cease
to be amused.

(Shirley MacLaine)

13.1 Collaborations

Même si nous en avons présenté ici une vision essentiellement instrumentale, le travail que nous avons mené s'inscrit dans l'activité de notre groupe de recherche qui est très interdisciplinaire. Nous avons ici voulu proposer une contribution de physiciens aux moyens d'analyse biochimique à l'échelle de la molécule unique.

Cela n'est pas envisageable sans profiter de l'expérience acquise du point de vue de l'instrumentation dans notre groupe et d'autres groupes amis, ainsi que des connaissances et des échanges avec des groupes de recherche en biologie.

Nous souhaitons ici les remercier de l'énergie et du temps qu'ils ont consacré à développer avec nous une collaboration fructueuse, et des discussions dont nous avons beaucoup profité.

Nous avons profité de la grande expérience de notre propre groupe dans la construction et le développement de logiciels d'analyse d'appareils de pinces magnétiques, particulièrement de la part de Vincent CROQUETTE. Nous avons pu également profiter de l'infrastructure informatique XVi pour interfacer entièrement nos instruments.

Pour les expériences de biologie moléculaire, nous avons reçu les conseils expérimentés de Pierre NEVEU (maintenant à UCSB, USA) et Bertrand DUCOS (ENS Physique, Paris). Pour une partie des purifications de l'ARN Polymérase de T7 biotinyllée, nous avons utilisé l'équipement mis en place par David STROEBEL (ENS Biologie, Paris)

Nous avons bénéficié de l'expérience de Pascal LOPEZ (ENS Biologie, Paris) dans l'expression de l'ARN Polymérase de T7 biotinyllée. Nous avons reçu de sa part le plasmide d'expression construit en collaboration avec Philippe THOMEN (ENS Physique, Paris) ; nous avons réalisé les premières expressions de la protéine sous sa direction et dans ses installations. Nous avons également profité de sa connaissance de l'ARN polymérase et de celle de Marc DREYFUS (ENS Biologie, Paris) lors de discussions sur nos expériences.

Nous avons obtenu de Xavier DARZACQ (ENS Biologie, Paris) le plasmide contenant la séquence codant pour la répétition de motifs reconnus par la protéine MS2. La protéine MS2 fluorescente nous a été fournie par Timothée LIONNET (A. Einstein College of Medicine, NYC, USA).

Nous avons également bénéficié de discussions avec David BENSIMON (ENS Physique, Paris) et Shimon WEISS (UCLA, USA) sur l'ARN Polymérase de *Escherichia coli*. Nous avons obtenu des échantillons de l'ARN Polymérase de *Escherichia coli* biotinyllée par Yuval EBENSTEIN et Younggyu KIM (UCLA, USA).

Nous avons largement discuté des problématiques de molécules uniques en général et de l'ARN polymérase en particulier avec Terence STRICK (UP7, Paris) ; nous avons également effectué quelques tests dans son équipe sur le montage de Kévin HO WAN.

Nous avons depuis longtemps développé une collaboration avec le groupe de François-Xavier BARRE (CGM, CNRS, Gif-sur-Yvette) pour l'étude de FtsK. Nous avons obtenu

de sa part de nombreux substrats d'ADN ainsi que des variants de FtsK préparés par Laetitia BONNÉ.

Nous avons également une fructueuse collaboration avec le groupe de David SHERRATT (Oxford, UK) avec qui nous avons échangé à de nombreuses reprises, et en particulier avec Estelle CROZAT qui nous a fourni un grand nombre de variants de FtsK et avec qui nous avons effectué une partie des expériences sur notre montage.

Concernant le marquage fluorescent par les *Quantum Dots*, nous avons obtenu des protocoles de la part de Pierre DESBIOLLES et Maxime DAHAN (ENS Physique, Paris).

13.2 Financements

Pendant la durée de ce travail, nous avons bénéficié d'une bourse de monitorat Ministère de la Recherche / UP6 et d'un financement sur le contrat européen BioNanoSwitch. Nous avons également reçu le soutien de l'ANR.

Les expériences ont été effectuées dans les infrastructures du Laboratoire de Physique Statistique de l'ENS et du Département de Biologie de l'ENS, avec le soutien de la plate-forme transcriptome et de la plate-forme d'expression.

14 Protocoles

Tout en buvant un des Yquem
que recelaient les caves des
Guermantes, je savourais des
ortolans accomodés selon les
différentes recettes que le duc
élaborait et modifia prudemment.

(Proust, Le Côté de Guermantes)

Protocole XIV.1

Antibiotiques — Préparation de solutions-mère

Sauf contre-indication, ces protocoles s'entendent pour des solutions «1000×». Les concentrations finales classiques sont :

- ampiciline : $100 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$
- kanamycine : $50 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$
- chloramphénicol : $10 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$

i. Ampiciline

Pour 20 mL de solution $100 \text{ mg}\mu\text{L}^{-1}$, procéder comme suit

- peser 2,38 g d'ampiciline dans un tube Falcon 50 mL
- ajouter 10 mL ddH₂O et mélanger
- ajouter 1M NaOH par unités de 500 μL jusqu'à dissolution
- compléter le volume par ddH₂O jusqu'à 20 mL et mélanger
- filtrer à 0,2 μm
- aliquoter par unités de 1 mL dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL
- stocker à -20°C

ii. Kanamycine

Pour 20 mL de solution $50 \text{ mg}\mu\text{L}^{-1}$, procéder comme suit

- peser 1,27 g de kanamycine dans un tube Falcon 50 mL
- ajouter 10 mL ddH₂O et mélanger jusqu'à dissolution complète
- compléter à 20 mL par ddH₂O et mélanger
- filtrer à 0,2 μm
- aliquoter par unités de 1 mL dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL
- stocker à -20°C

iii. Chloramphénicol

Pour 20 mL de solution $10 \text{ mg}\mu\text{L}^{-1}$, procéder comme suit

- peser 0,20 g de chloramphenicol dans un tube Falcon 50 mL
- ajouter 10 mL EtOH et mélanger
- compléter le volume par EtOH jusqu'à 20 mL et mélanger
- filtrer rapidement à 0,2 μm
- aliquoter par unités de 1 mL dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL
- stocker à -20°C

iv. Résolution de problèmes

Les solutions d'ampiciline sont réputées être instables. Il est conseillé, pour travailler avec des milieux contenant de l'ampiciline, d'utiliser des préparations les plus fraîches possibles, en général pas plus vieilles qu'un mois. Néanmoins, les quantités d'ampiciline

introduites dans les milieux excèdent généralement très largement les quantités requises pour une sélection efficace.

Les antibiotiques en général sont sensibles à la chaleur. Ils ne doivent jamais être autoclavés mais toujours rajoutés stérilement à une solution refroidie en dessous de 50°C.

Protocole XIV.2

Milieux LB – Préparation

i. Résolution de problèmes

En manipulant stérilement, il est parfaitement possible de conserver du milieu, même sans antibiotique, à l'échelle de 500 mL à un litre. Un utilisateur frileux pourra préparer ses milieux en petites bouteilles de 100 mL.

Stockées trop longtemps, les plaques se dessèchent et les antibiotiques sont susceptibles de se dégrader (p. 226). Il est conseillé de préparer un minimum de plaques pour toujours en disposer de fraîches, avec une marge de sécurité. Un dizaine de plaques, utilisables pendant 2 mois, sont un bon compromis.

ii. LB liquide

Procéder comme suit

- sélectionner une bouteille autoclavable de volume 20% supérieur au volume de milieu final
 - introduire 1 tablette de LB par 50 mL de milieu final
 - compléter par ddH₂O
 - coller un témoin de stérilisation sur la bouteille et autoclaver 15 à 30 minutes à 121°C
 - si des antibiotiques sont nécessaires, refroidir le milieu en le plongeant dans un bain à 50°C
 - ajouter stérilement les antibiotiques sous forme de stock «1000×» (p. 226)
 - marquer la bouteille avec le contenu et la date de préparation
 - stocker à température ambiante
-

iii. LB en plaques

Pour 10 boîtes de Petri, procéder comme suit

- dans un bécher de 600 mL, introduire 5 tablettes de LB : 1 pour 50 mL de milieu final
- peser et introduire 3,75 g d'agar (attention à ne pas confondre avec *l'agarose*)
- compléter à 250 mL par ddH₂O
- recouvrir d'un film d'aluminium, coller un témoin de stérilisation sur le bécher et autoclaver de 15 à 30 minutes à 121°C
- pendant ce temps, disposer sur une surface propre 10 boîtes de Petri à 3 compartiments et les marquer *sur le fond* avec les initiales de l'utilisateur, la composition et la date de préparation
- si des antibiotiques sont nécessaires, refroidir le milieu en le plongeant dans un bain à 50°C
- ajouter stérilement les antibiotiques sous forme de stock «1000×» (p. 226)
- ajouter stérilement avec une pipette 3×8 mL de milieu dans chaque boîte
- laisser refroidir à température ambiante et stocker à 4°C

Protocole XIV.3

Microbiologie — Préparation de cellules compétentes

Les cellules bactériennes destinées à être transformées nécessitent un certain nombre de caractères phénotypiques ; les souches s'obtiennent généralement commercialement et peuvent être ensuite répliquées à partir d'un stock-mère.

L'objet de ce protocole est de décrire comment rendre compétente (c'est à dire perméable) n'importe quelle souche de bactérie d'*Escherichia coli*.

i. Cellules chimiquement compétentes

Pour préparer des bactéries compétentes chimiquement, procéder comme suit

- préparer 4 tubes de culture contenant respectivement : $2 \times 2,5$ mL de LB ; $2 \times 2,5$ mL de LB + $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$ (le contre-ion n'a pas d'importance)
- ensemencer stérilement un tube de chaque type à une dilution environ 1:50 par la solution de clones bactériens
- cultiver sur la nuit à 37°C sous agitation (200 rpm)
- stériliser un flacon de culture de 250 mL
- contrôler que les deux tubes sans bactérie sont clairs et les deux autres troubles
- introduire stérilement 100 mL de LB supplémenté par $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$ (le contre-ion n'a pas d'importance) dans le flacon de culture
- transférer stérilement dans ce flacon les 2,5 mL du tube de culture contenant bactéries et Mg^{2+}
- cultiver à 37°C sous agitation (200 rpm) jusqu'à densité optique à 600 nm 0,45-0,55
- refroidir 5 minutes sur glace
- préalablement refroidir une ultracentrifugeuse à 4°C
- répartir en 2 tubes Falcon 50 mL
- centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à $3500\times g$
- éliminer le surnageant
- laisser sécher tube retourné pendant 1 minute
- resuspendre avec précaution (sans vortexer) chaque culot dans 20 mL de TfbIA (p. 281)
- laisser reposer sur glace : 60 à 90 minutes pour les souches *RecA* (-) (DH1 à DH5 par exemple) ; 5 à 10 minutes pour les souches *RecA* (+)
- centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à $3500\times g$
- resuspendre avec précaution (sans vortexer) chaque culot dans 2 mL de TfbIIA (p. 281)
- laisser reposer 15 minutes sur glace
- disposer 80 cryotubes sur glace carbonique
- répartir les bactéries resuspendues en aliquots de $50 \mu\text{L}$
- stocker à -80°C

Protocole XIV.4

Microbiologie — Transformation de cellules compétentes

i. Transformation de cellules compétentes

Pour transformer des cellules compétentes avec un plasmide **surenroulé**, procéder comme suit

- récupérer la souche bactérienne compétente (ex. AVB101, DH5 α , XL1-Blue, TopTen), généralement stockée à -80°C, et la placer sur glace
- récupérer la solution de plasmides, généralement stockée à -20°C, et la placer sur glace
- laisser décongeler sur glace de 5 à 10 minutes
- introduire de 1 à 25 ng d'ADN par μL de bactérie. Généralement, pour des aliquots de 50 μL de bactéries et pour des concentrations d'ADN standard de 100 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ cela nécessite au moins 0,5 μL de solution de plasmide
- mélanger doucement (l'ADN est fragile) à l'aide d'une pointe de pipette
- laisser reposer sur glace pendant 30 minutes et préparer un bain chaud à la température d'induction, généralement 42°C (cette température doit être précise)
- faire subir un choc thermique au mélange bactéries et ADN pendant précisément 90 secondes
- placer immédiatement sur glace pendant environ 2 minutes
- dans un tube Eppendorf de 2 mL introduire stérilement 16 volumes de milieu (p. 228) **dépourvu d'antibiotique de sélection**^[1]
- cultiver à 37°C sous agitation (200 rpm) pendant de 45 à 60 minutes
- stocker temporairement à 4° ou procéder à la sélection des transformants (p. 231)
-

¹Attention : certaines souches, comme AVB101 avec le chloramphénicol, requièrent *en toute circonstance* un antibiotique pour maintenir un génotype particulier, en plus de l'antibiotique permettant de sélectionner la souche parmi toutes les bactéries parasites. On prendra bien soin de ne pas oublier de l'introduire.

Protocole XIV.5

Sélection de colonies bactériennes

Le but de ce protocole est de sélectionner dans un stock bactérien un nombre restreint de clones présentant un phénotype particulier, par exemple la possibilité de croître sur antibiotiques ou de cataboliser X-gal. Il est généralement utilisé pour vérifier qu'un plasmide contenant un fragment d'ADN particulier a bien transformé une bactérie.

i. Sélection des colonies

Pour sélectionner et préparer un stock de clones, procéder comme suit

- récupérer une solution diluée de bactéries, idéalement une inoculation dans 20 volumes de milieu non sélectif suivie de 1h de culture à 37°C
- préparer éventuellement une dilution (dans du milieu non sélectif) d'un facteur 10 de cette solution si la concentration du stock est mal connue
- déposer et étaler avec une anse $\sim 50 \mu\text{L}$ de solution dans deux compartiments d'une boîte de pétri préparée avec du milieu sélectif; laisser un compartiment vide pour contrôle
- cultiver, généralement à 37 °C, dans un incubateur non-agitateur pendant la nuit jusqu'à apparition de colonies bien isolées (le temps dépend de la souche et du plasmide et peut aller jusqu'à 36 heures)
- vérifier que le contrôle ne présente pas de colonies; si les colonies sont trop nombreuses (resp. trop peu nombreuses), reprendre la culture avec des solutions plus diluées ou sur un temps plus court (resp. avec un temps de culture plus long)
- sélectionner n=5-10 colonies positives (présentes dans le cas de sélection par antibiotique, bleues dans le cas d'une sélection par X-gal, *etc.*) et préparer stérilement n+1 tubes de culture contenant 5 mL de milieu sélectif
- introduire stérilement une colonie par tube (en utilisant une pointe de pipette – avec la colonie – qui est éjectée dans le tube)
- introduire une section du compartiment de contrôle dans le tube de contrôle
- vortexer quelques secondes
- cultiver sur la nuit à 37°C sous agitation (200 rpm)
- contrôler que le tube de contrôle n'est pas trouble
- introduire stérilement 1 volume de culture dans 1 volume de solution de stockage au glycérol (p. 281), typiquement 750 μL dans un tube aliquoté de 750 μL de solution-stock
- conserver à -20°C

ii. Résolution de problèmes

En cas de problèmes : des bactéries, bien que ne possédant pas le plasmide à sélectionner ou ne l'exprimant pas, peuvent néanmoins donner des colonies sur plaque, mais ne pas être cultivables en milieu liquide ou bien ne pas donner de plasmide après extraction de l'ADN. Cela peut être dû à divers facteurs :

- persistance antibiotique
- taux de division élevé comparé à la vitesse de diffusion de l'agent sélectif (ex. antibiotique) à travers la membrane

- colonies satellites : des bactéries non-résistantes peuvent co-croître au voisinage de bactéries résistantes qui catabolisent un antibiotique ou anabolisent un métabolite essentiel

Par conséquent, après culture sur plaque, certaines colonies peuvent être contaminées par des faux-positifs. Ceux-ci ne croîtront en milieu liquide et/ou ne donneront pas de plasmide.

iii. **Ecartement des faux-positifs**

Dans ce cas, procéder comme suit

- récupérer des colonies positives sur plaques
- inoculer stérilement ces colonies dans 1 à 2 mL de milieu *sélectif*
- cultiver 1h à 37°C
- inoculer à nouveau sur plaque (p. 231)
- refaire un cycle si nécessaire
- reprendre le protocole de sélection

Dans ce cas, seuls les vrais-positifs devraient être sélectionnés.

Protocole XIV.6

Extraction d'ADN (sur colonne)

i. A l'échelle de 20 μg

Pour préparer en parallèle n échantillons d'ADN, procéder comme suit

- préparer stérilement $n + 1$ tubes de culture contenant 5 mL de milieu sélectif
- ensemencer à une dilution environ 1:50 par une solution de clones bactériens (ou à défaut par une colonie issue de culture sur boîte de pétri, p. 231)
- vortexer quelques secondes
- cultiver sur la nuit à 37°C sous agitation (200 rpm)
- contrôler que le tube de contrôle n'est pas trouble
- procéder à l'extraction d'ADN sur 4 mL de culture

L'extraction d'ADN est réalisée en utilisant des protocoles commerciaux (Sigma, *GenE-lute Plasmid Miniprep* n°PLN70). Le rendement est de 200 μL de solution d'ADN à environ 0.1-1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ pour 4 mL de culture.

ii. A l'échelle de 100 μg

Pour préparer en parallèle n échantillons d'ADN, procéder comme suit

- stériliser $n + 1$ erlenmeyers de culture
- préparer stérilement n tubes Eppendorf 2mL contenant 1 mL de milieu sélectif
- ensemencer à une dilution environ 1:50 par une solution de clones bactériens (ou à défaut par une colonie issue de culture sur boîte de pétri, p. 231)
- vortexer quelques secondes
- cultiver 1 heure à 37°C
- introduire stérilement 50 mL de milieu sélectif dans chacun des erlenmeyers
- ensemencer stérilement par la culture fraîche de clones bactériens chaque erlenmeyer
- vortexer quelques secondes
- cultiver sur la nuit à 37°C sous agitation (200 rpm)
- contrôler que le tube de contrôle n'est pas trouble
- procéder à l'extraction d'ADN sur 50 mL de culture

Protocole XIV.7

Extraction d'ADN (Phénol-Chloroforme)

Le protocole peut être interrompu temporairement, et les solutions stockées à 4°C, à n'importe quelle étape postérieure à la première précipitation à l'éthanol.

i. Extraction de l'ADN

Pour extraire l'ADN du mélange, procéder comme suit

- transférer au plus 200 μL de la solution contenant l'ADN dans un tube Eppendorf de 1,5 mL
- compléter éventuellement par ddH₂O à un volume total de 200 μL
- introduire 200 μL du mélange phénol-chloroforme équimolaire conservé à 4°C
- agiter doucement
- centrifuger à vitesse maximum pendant 15 secondes pour séparer les phases
- transférer la phase aqueuse (supérieure) dans un tube Eppendorf de 1,5 mL neuf
- introduire 200 μL du mélange phénol-chloroforme équimolaire conservé à 4°C
- agiter doucement
- centrifuger à vitesse maximum pendant 15 secondes pour séparer les phases
- transférer la phase aqueuse (supérieure) dans un tube Eppendorf de 1,5 mL neuf

ii. Précipitation de l'ADN

Pour précipiter l'ADN extrait, procéder comme suit

- introduire du tampon sodium/ammonium-acétate en quantité suffisante pour une concentration finale 2 à 2,5 mol·L⁻¹
- introduire 30 μg de solution de glycogène, généralement 3 μL d'un aliquot à 10 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$
- introduire deux volumes d'éthanol absolu
- vortexer
- refroidir environ 30 minutes à -20°C ; un précipité blanchâtre devrait apparaître

iii. Purification de l'ADN

Pour purifier l'ADN précipité, procéder comme suit

- préalablement refroidir une ultracentrifugeuse à 4°C
- préparer et refroidir sur glace 3 mL par échantillon d'ADN d'une solution à 70% en volume d'éthanol
- centrifuger à 4°C pendant 30 minutes le tube Eppendorf issu de l'étape de précipitation à $\geq 12000\times g$
- après centrifugation, conserver l'ultracentrifugeuse à 4°C
- éliminer le surnageant
- introduire 1 mL de la solution d'éthanol à 70% refroidie
- rincer le culot
- centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à $\geq 12000\times g$
- après centrifugation, conserver l'ultracentrifugeuse à 4°C

- éliminer le surnageant
- introduire 1 mL de la solution d'éthanol à 70% refroidie
- rincer le culot
- centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à $\geq 12000 \times g$
- après centrifugation, conserver l'ultracentrifugeuse à 4°C
- éliminer le surnageant
- sécher le culot à l'air
- resuspendre le culot dans la quantité désirée de ddH₂O ou de tampon au choix de l'utilisateur
- stocker à -20°C pendant au plus 6 mois

Protocole XIV.8

Purification d'ADN (isopropanol/acétate)

i. Purification d'ADN

Pour purifier une solution d'ADN, procéder comme suit

- préalablement refroidir une ultracentrifugeuse à 4°C
- préparer et refroidir sur glace 2 mL par échantillon d'ADN d'une solution à 70% en volume d'éthanol
- préparer un tube Eppendorf 1,5 mL
- introduire jusqu'à 500 μL d'une solution d'ADN issue de midiprep (p. 233)
- introduire 0,1 volume de tampon sodium acétate 3 mol·L⁻¹ pH 5,2
- introduire 0,7 volumes d'isopropanol
- centrifuger à 4°C pendant 30 minutes le tube Eppendorf à $\geq 15000\times g$
- après centrifugation, conserver l'ultracentrifugeuse à 4°C
- éliminer le surnageant
- introduire 1,5 mL de la solution d'éthanol à 70% refroidie
- rincer le culot
- centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à $\geq 12000\times g$
- éliminer le surnageant
- sécher le culot à l'air
- resuspendre le culot dans la quantité désirée de ddH₂O ou de tampon au choix de l'utilisateur
- stocker à -20°C pendant au plus 6 mois

Protocole XIV.9

Purification d'ADN (gel d'agarose)

Ce protocole permet d'utiliser le pouvoir résolutif de l'électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose pour en faire une technique préparative.

i. Purification d'ADN

Pour purifier une solution d'ADN, procéder comme suit

- préparer environ 200 mL de TAE «1×» (p. 281)
- peser et ajouter 1% en masse par volume de tampon de *Low-Melt agarose*
- couler le gel avec environ 0,5 μL EtBr
- introduire dans un puits du gel une échelle moléculaire d'ADN adaptée, 100 ng
- introduire dans les autres puits du gel le mélange d'ADN à purifier (maximum 1 mg) et le tampon de charge «10×»
- faire migrer le gel à 7V/cm pendant environ 10 minutes/cm
- sous irradiation UV, repérer *rapidement* les bandes d'intérêt
- extraire au scalpel un bloc de gel, le plus petit possible, contenant la bande
- placer chaque bloc de gel dans un tube Eppendorf 1,5 mL
- introduire 100 μL de tampon TE (p. 283)
- chauffer à 65°C pendant 5 minutes
- procéder à une extraction phénol-chloroforme (p. 234)

Alternativement, il existe des kits commerciaux pour réaliser cette opération : Qiagen QIAquick «Gel Extraction Kit».

Protocole XIV.10

Double restriction d'un fragment d'ADN

Ce protocole décrit la double restriction d'un substrat d'ADN par des enzymes notées \mathcal{A} et \mathcal{B} . Cette opération est généralement utilisée pour exciser un fragment d'ADN en vue d'un clonage. Dans ce cas, il est indispensable que les sites de restriction de \mathcal{A} et \mathcal{B} soient à bouts collants (*sticky ends*).

Les enzymes \mathcal{A} et \mathcal{B} doivent posséder un tampon mutuellement compatible. Si ce n'est pas le cas, une restriction séquentielle (p. 238), c'est à dire deux restrictions simples l'une à la suite de l'autre, est nécessaire.

i. Restriction double

Pour exciser le fragment d'ADN compris entre les sites \mathcal{A} et \mathcal{B} , procéder comme suit

- introduire dans un tube Eppendorf 0,6 mL environ 50 fmol de plasmide (typiquement 10 μL d'une solution d'ADN d'environ 5000 bp issue d'une miniprep, p. 233)
- ajouter l'enzyme \mathcal{A} à concentration finale 3% v/v (typiquement 0,4 μL)
- ajouter l'enzyme \mathcal{B} à concentration finale 3% v/v (typiquement 0,4 μL)
- ajouter le tampon mutuellement compatible aux enzymes \mathcal{A} et \mathcal{B} à concentration finale «1×» (typiquement 1,2 μL)
- compléter éventuellement par ddH₂O
- porter à la température de travail de \mathcal{A} et \mathcal{B} (typiquement 37°C) pendant une heure
- inactiver thermiquement \mathcal{A} et \mathcal{B} (si c'est possible) en portant le mélange à 80°C pendant 20 minutes
- stocker à -20°C pendant au plus 6 mois

ii. Restriction séquentielle

Pour effectuer une restriction séquentielle, procéder comme suit

- introduire dans un tube Eppendorf 0,6 mL environ 50 fmol de plasmide (typiquement 10 μL d'une solution d'ADN d'environ 5000 bp issue d'une miniprep, p. 233)
- ajouter l'enzyme \mathcal{A} à concentration finale 5% v/v (typiquement 0,6 μL)
- ajouter le tampon spécifique à l'enzyme \mathcal{A} à concentration finale «1×» (typiquement 1,2 μL)
- compléter éventuellement par ddH₂O
- porter à la température de travail de \mathcal{A} (typiquement 37°C) pendant une heure
- inactiver thermiquement \mathcal{A} (si c'est possible) en portant le mélange à 80°C pendant 20 minutes
- purifier l'ADN du mélange, de préférence en utilisant un kit de purification d'un produit de réaction enzymatique
- introduire dans le mélange purifié l'enzyme \mathcal{B} à concentration finale 5% v/v (typiquement 0,6 μL)
- ajouter le tampon spécifique à l'enzyme \mathcal{B} à concentration finale «1×» (typiquement 1,2 μL)
- compléter éventuellement par ddH₂O
- porter à la température de travail de \mathcal{B} (typiquement 37°C) pendant une heure
- inactiver thermiquement \mathcal{B} (si c'est possible) en portant le mélange à 80°C pendant

20 minutes

□ stocker à -20°C pendant au plus 6 mois □

Protocole XIV.11

Dephosphorylation d'un ADN

Pour éviter la religation d'un ADN sur lui-même, il est nécessaire de déphosphoryler les extrémités 5' libres des fragments obtenus.

i. Déphosphorylation

Pour effectuer une déphosphorylation des fragments 5' libres, procéder comme suit

- introduire dans un tube Eppendorf 0,6 mL environ 500 fmol de plasmide (typiquement 50 μL d'une solution d'ADN d'environ 5000 bp issue d'une excision, p. 238)
- ajouter 0.05 u de *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIAP) par pmol d'extrémités (typiquement 2.5 μL pour une solution 0.01 u· μL^{-1})
- ajouter le tampon spécifique à l'enzyme CIAP (NEB 3) à concentration finale «1×» (typiquement 6 μL)
- compléter éventuellement par ddH₂O
- porter à la température de travail de CIAP (37°C) pendant 30 minutes
- inactiver thermiquement CIAP en portant le mélange à 85°C pendant 45 minutes
- stocker à -20°C pendant au plus 6 mois

Il est souhaitable (bien que ce ne soit pas obligatoire) de soustraire le fragment excisé du milieu réactionnel. Par ailleurs, la ligation est une réaction sensible qui pourrait être polluée par les enzymes ou tampons accumulés au cours des précédentes étapes. Cette purification peut être réalisée efficacement par un kit adapté à la taille du fragment à soustraire ou par une purification sur gel d'agarose (p. 237).

Protocole XIV.12

Hybridation d'oligonucléotides

Dans le cas de ligations (comme par exemple des clonages ou la préparation d'ADN pour des expériences de pinces magnétiques), les fragments doivent se présenter sous la forme d'une paire ADN double brin à extrémités phosphorylées en 5' et complémentaires l'une de l'autre.

Si un des fragments est synthétique, il est généralement nécessaire d'en hybrider les deux brins.

i. Hybridation

Pour hybrider deux oligonucléotides complémentaires, procéder comme suit

- dissoudre éventuellement les oligonucléotides deshydratés dans une solution tampon Tris pH 8.0, typiquement à une concentration $200 \text{ fmol}\cdot\text{L}^{-1}$
- mélanger mole à mole les deux oligonucléotides et porter le mélange à 94°C pendant une minute
- diminuer la température par paliers de 1°C pendant 1 minute jusqu'à atteindre 4°C
- stocker à -20°C pendant au plus 6 mois

Protocole XIV.13

Ligation

Deux fragments d'extrémités complémentaires sont susceptibles de s'hybrider de manière spécifique l'un avec l'autre. Une ADN Ligase catalyse alors la création d'une liaison covalente entre des extrémités sucre-3' et les extrémités 5'-phosphate des fragments.

i. Ligation

Pour effectuer une réaction de ligation, procéder comme suit

- préparer un tube Eppendorf 0,6 mL
- introduire jusqu'à 500 ng de vecteur digéré, prévoir une concentration finale de 10-50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$
- ajouter de 1 à 3 équivalents molaires de fragment à insérer
- ajouter 10% en volume de tampon de ligation «10×»
- ajouter 4% en volume d'ADN ligase
- compléter éventuellement par ddH₂O
- incuber à 16°C pendant la nuit ou 22°C pendant 1 heure
- inactiver thermiquement la ligase en portant le mélange à 65°C pendant 10 minutes
- stocker à 4°C

Protocole XIV.14

Restriction simple d'un fragment d'ADN

Ce protocole est généralement utilisé pour vérifier la présence d'un site \mathcal{C} dans un fragment d'ADN, par exemple pour réaliser un contrôle négatif d'un clonage. Il peut également être utilisé pour produire des couples de fragments d'ADN possédant des extrémités \mathcal{C} , comme dans le cas de la préparation de substrats d'ADN contenant des bases modifiées.

i. Restriction par l'enzyme \mathcal{C}

Pour réaliser une restriction simple, procéder comme suit

- introduire dans un tube Eppendorf 0,6 mL environ 50 fmol d'ADN (typiquement 10 μL d'une solution d'ADN d'environ 5000 bp issue d'une miniprep, p. 233)
- ajouter l'enzyme \mathcal{C} à concentration finale 5% v/v (typiquement 0,6 μL)
- ajouter le tampon spécifique à l'enzyme \mathcal{C} à concentration finale «1×» (typiquement 1,2 μL)
- compléter éventuellement par ddH₂O
- porter à la température de travail de \mathcal{C} (typiquement 37°C) pendant une heure
- pendant ce temps couler un gel d'agarose environ 1% dans «1×» TAE (p. 281)
- inactiver thermiquement \mathcal{C} (si c'est possible) en portant le mélange à 80°C pendant 20 minutes
- introduire dans les puits du gel : une échelle moléculaire d'ADN, la solution issue de la restriction par \mathcal{C} , une quantité équivalente d'ADN non digéré
- faire migrer le gel à 7V/cm pendant environ 10 minutes/cm

Si le puits contenant l'ADN digéré présente une série de bandes avec une masse moléculaire cohérente, la restriction a probablement réussi. Dans le cas d'un clonage, faire ensuite séquencer le plasmide au voisinage du fragment inséré pour une contrôle positif.

ii. Résolution de problèmes

On se place dans le cas d'un clonage d'un insert contenant \mathcal{C} entre les sites \mathcal{A} et \mathcal{B} . Si le plasmide cloné n'est pas clivé par \mathcal{C} mais l'est par \mathcal{A} et \mathcal{B} en donnant des bandes uniques de masse moléculaire cohérente, il est probable que le fragment voulu n'a pas été inséré. Dans ce cas, il peut suffire d'augmenter la quantité de fragment à insérer introduite à l'étape de ligation.

Si, quel que soit le profil de restriction du plasmide cloné, la taille du plasmide excède ce qui est attendu, des auto-ligations ont probablement eu lieu. Dans ce cas, il est recommandé d'abord de bien soustraire le fragment excisé et de déphosphoryler le plasmide. En cas d'insuccès, la quantité de fragment à insérer lors de la ligation peut être modifiée à la hausse. Enfin, le temps de ligation peut éventuellement être modifié (des temps plus courts sont susceptibles de conduire à des produits moins complexes).

Protocole XIV.15

Préparation d'oligonucléotides par PCR

Le principe est d'amplifier par *Polymerase Chain Reaction* (PCR) un ou plusieurs fragments d'ADN contenant des sites (généralement de restriction) d'intérêt. Des nucléotides modifiés peuvent être incorporés lors de cette étape dans l'ADN.

Ce protocole présente en plus d'une PCR classique (tube «C») les conditions d'incorporation de biotine (tube «B») et de digoxygénine (tube «D») dans un fragment d'ADN par amplification. Ces nucléotides modifiés existent commercialement sous forme d'un adduit covalent avec le *deoxyUracile TriPhosphate* (dUTP). Ces X-dUTP synthétiques peuvent être incorporés en lieu et place de dTTP par l'ADN polymérase, pourvu qu'elle ait une tolérance suffisamment grande, ce qui est le cas de la plupart des polymérases à ADN utilisées pour les réactions de PCR.

En pratique, il n'est pas souhaitable de substituer totalement dTTP par X-dUTP, d'une part parce que les propriétés de la polymérase (en particulier sa fidélité) dépendent des taux d'incorporation respectifs des nucléotides. La substitution de dTTP par X-dUTP déséquilibrerait le système. D'autre part, les fragments synthétisés sont amenés à subir ultérieurement une réaction de restriction. Le remplacement des bases T par des bases X-U perturberaient la reconnaissance de leur site par les enzymes de restriction.

Par conséquent, on choisit de se placer dans des conditions dans lesquelles des nucléotides X-dUTP sont *statistiquement* substitués aux dTTP ; cela implique de choisir un fragment à amplifier suffisamment long pour que quelques bases T puissent être substituées par des bases X-U.

i. Amplification d'un fragment d'ADN par PCR

Pour amplifier un fragment d'ADN à partir d'un substrat, procéder comme suit

- préparer 3 tubes Eppendorf 200 μL et les marquer «B», «C» et «D»
- introduire dans les trois tubes environ 100 ng d'ADN substrat
- introduire dans les trois tubes 1 μL d'une solution 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ d'oligonucléotide *forward primer*
- introduire dans les trois tubes 1 μL d'une solution 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ d'oligonucléotide *reverse primer*
- introduire dans les trois tubes 5 μL d'une solution «10 \times » de tampon de PCR $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- introduire dans les trois tubes 2 μL d'une solution 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de MgCl_2
- introduire dans les trois tubes 1 μL d'une solution à 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ chacun de dNTP
- introduire dans le tube «B» 2,5 μL d'une solution 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de biotine-(16)-dUTP
- introduire dans le tube «D» 0,7 μL d'une solution 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de digoxygénine-(11)-dUTP
- compléter à 49 μL par ddH₂O
- programmer le thermocycleur (voir ci-dessous)
- placer les trois tubes dans le thermocycleur
- lancer le programme et interrompre le cycle dès que la température atteint 94°C
- introduire dans les trois tubes 1 μL d'ADN polymérase de *Taq*
- reprendre le cycle jusqu'à son terme
- stocker à 4°C pendant au plus 6 mois

Les oligonucléotides *forward primer* et *reverse primer* sont choisis de manière à en-

cadre une séquence du substrat contenant les sites d'intérêt. De plus, les températures d'hybridation T_m (*melting temperature*) de ces deux oligonucléotides avec le plasmide sont très proches et inférieures d'au moins 10°C à la température de travail (72°C) de l'ADN polymérase de *Taq*.

ii. Programmation du thermocycleur

Le thermocycleur doit être programmé selon le diagramme 14.1. La réaction de PCR peut facilement être optimisée selon les situations. Il appartient à l'utilisateur d'adapter les températures et les temps de réaction selon les conditions expérimentales particulières qu'il souhaite adopter.

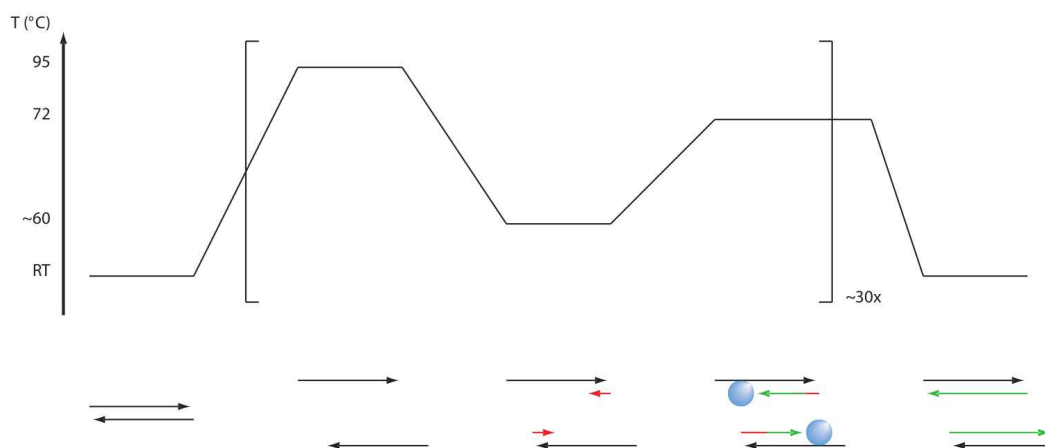


FIG. 14.1: Diagramme schématisé du cycle de PCR. La partie supérieure représente le cycle de température couramment utilisé. Le cadre inférieur représente l'état de l'ADN : à chaque cycle, l'ADN présent (noir) est dénaturé, puis hybridé aux amorces (en rouge) spécifiques de la séquence à amplifier. L'ADN polymérase de *Taq* (en bleu) incorpore les déoxyribo-nucléotides complémentaires de la séquence. A la fin du cycle, chaque brin d'ADN a conduit à la production de son complémentaire (en vert).

iii. Amplification par PCR sur bactéries

La réaction de PCR n'est sensible que linéairement à la quantité d'ADN initial (par comparaison avec une sensibilité exponentielle au nombre de cycles de réaction). Par conséquent, des quantités très faibles de substrat suffisent à assurer une amplification efficace. Cela signifie que, sous réserve qu'aucune autre séquence ne puisse être amplifiée (ce qui est généralement vrai pour des *primers* suffisamment longs), une source "sale" comme un lysat bactérien peut être utilisée à la place d'un ADN qui aurait été soigneusement purifié.

Pour préparer des extrémités directement sur une culture bactérienne, utiliser environ 10 μL de culture bactérienne comme source d'ADN dans le mélange précédent, et programmer un palier de température à 94°C pendant 10 minutes juste avant le cycle de PCR pour obtenir *in situ* le lysat bactérien.

Protocole XIV.16

Test *in vitro* de l'activité ARN polymérase

i. Test d'activité

Ce test de transcription *in vitro* utilise une lecture sur gel d'agarose du mélange réactionnel pour confirmer et quantifier la présence d'ARN.

- introduire le substrat d'ADN linéarisé (p. 238, 100 ng)
- ajouter le tampon de transcription («1×»)
- ajouter le mélange de ribonucléotides (2 mmol·L⁻¹ chacun)
- ajouter l'inhibiteur de ribonucléases RiboLock (2,5%)
- compléter par de l'eau exempte de nucléases
- ajouter finalement l'ARN polymérase (400 nmol·L⁻¹)
- incuber pendant 1h à 37°C
- pendant ce temps couler un gel d'agarose environ 1% dans «1×» TAE (p. 281)
- inactiver pendant 10 minutes à 70°C
- prélever 10 μL par échantillon
- ajouter dans ce volume le tampon de charge (2 μL)
- introduire dans les puits du gel : une échelle moléculaire d'ADN, une échelle moléculaire d'ARN, la solution précédente, une quantité équivalente de l'ADN linéarisé
- faire migrer le gel à 7V/cm pendant environ 10 minutes/cm

En présence de bromure d'ethidium, des bandes d'acides nucléiques supplémentaires (par comparaison avec l'échantillon d'ADN seul) apparaissent dans le cas de transcription.

La vitesse de migration des ARN est environ 0,7 fois plus lente que celle de l'ADN double brin : pour estimer le poids moléculaire du transcrit, il faut repérer la masse sur l'échelle d'ADN qui correspond à $1/0,7 = 1,4$ fois le rapport frontal du transcrit.

Protocole XIV.17

Expression de la protéine biotinylée

La biotinylation repose sur l'expression d'une protéine de fusion avec un petit peptide selon une méthode commercialisée par Avidity.

i. Transformation

- récupérer un stock de plasmide contenant le gène de la protéine à biotinyler
- cloner le gène dans le plasmide de biotinylation contenant en N- ou C-terminal la séquence «AviTag» (<http://www.avidity.com>) MSGLNDIFEAQKIEWHE avec la bonne phase de traduction
- transformer (p. 230) une bactérie contenant également un plasmide codant pour la biotine ligase BirA
- sélectionner (p. 231) sur boîte de pétri sous double sélection d'antibiotique (plasmide de biotinylation et plasmide de clonage) 2-3 clones viables
- faire éventuellement une culture rapide pour préparer un stock glycerol (p. 281)

Dans le cas du système Avidity, l'antibiotique de sélection du clonage est l'ampiciline et l'antibiotique de sélection de BirA est le chloramphénicol.

ii. Expression

- ensemercer 1L de LB par clone sous double sélection antibiotique
- cultiver à 37°C sous agitation (200 rpm) jusqu'à densité optique $DO_{600\text{ nm}} \geq 0.7$
- prélever un stock glycerol (p. 281) et 1 mL de milieu avant induction, noté **NI**
- induire la production de BirA et de la protéine recombinante en introduisant IPTG ($1.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ final) et biotine ($50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ final)
- cultiver à 37°C sous agitation (200 rpm) pendant 3h
- prélever un stock glycerol (p. 281) et 1 mL de milieu après induction, noté **I**
- centrifuger à $4000\times g$ pendant 10 minutes à 4°C
- éliminer le surnageant puis resuspendre le culot dans 10 mL de tampon PBS (p. 282)
- transférer dans un Falcon 50 mL
- centrifuger à $4000\times g$ pendant 10 minutes à 4°C
- éliminer le surnageant puis stocker avec bouchage parafilm à -20°C
- procéder immédiatement au traitement (p. 251) des fractions **I** et **NI**

iii. Presse de FRENCH

Les cellules sont d'abord brisées par une détente brutale. A partir de ce point, il est nécessaire de porter des gants en tout temps pour éviter la contamination par des protéases. De plus, il faut éviter de stocker la solution de protéine avant la fin de la purification.

- resuspendre chaque culot dans 15 mL de tampon LyB (p. 283)
- ajouter du lysozyme à $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ final
- laisser incuber 30 minutes sur glace

- injecter dans la chambre d'une presse de FRENCH préalablement refroidie à 4°C
- introduire le piston et éliminer autant que possible l'air au-dessus du liquide
- charger l'ensemble sur la presse et comprimer à 70 bar
- ouvrir très lentement le robinet de détente pour récupérer le lysat dans un Falcon 50 mL neuf sur bain de glace
- recharger le lysat dans la chambre et répéter pour un total de 3 opérations de lyse par culot
- (optionnel) prélever 0.5 mL de milieu, noté **FP**
- conserver sur glace

iv. **Sonication**

Les restes de parois ainsi que l'ADN génomique sont dégradés par sonication.

- placer le lysat dans un Falcon 50 mL ou un tube résistant aux ultrasons
- conserver sur glace et introduire la sonde à ultrasons
- appliquer des *pulse* de 10 secondes séparés de 10 secondes pendant 5 minutes
- (optionnel) prélever 0.5 mL de milieu, noté **U**

v. **Clarification**

Tous les constituants lourds sont éliminés par centrifugation, suivie d'une filtration.

- centrifuger le sonicat à 14000×g pendant 30 minutes à 4°C
- transférer le surnageant dans une seringue stérile munie de filtres 0.45 μm puis 0.22 μm montés en série (Millipore)
- filtrer la solution et la transférer dans un Falcon 50 mL stocké sur glace
- (optionnel) prélever 0.5 mL de milieu, noté **F**

La solution est ensuite purifiée par chromatographie sur une colonne d'affinité.

Protocole XIV.18

Purification de la protéine biotinylée

Une protéine biotinylée est facilement purifiée par chromatographie sur colonne d'affinité. Une résine pour FPLC est commercialisée par Promega (www.promega.com, *SoftLink Soft Release Avidin Resin*).

i. Activation

La colonne doit avoir été activée une première fois avant utilisation.

- rincer les pompes à $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ phosphate (pH = 7.0)
- injecter 6 volumes de tampon phosphate
- rincer les pompes à $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ phosphate (pH = 7.0) + $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ biotine
- saturer la colonne par 3 volumes de tampon phosphate additionné de biotine ($0.1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$)
- laisser à saturer 15 minutes
- régénérer la colonne

ii. Purification

- pré-refroidir des flacons de tampon APB (p. 283) et de solution de biotine ($5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
- charger la solution de protéines à purifier dans la boucle d'injection
- prépositionner des tubes dans le collecteur de fraction
- rincer les pompes par APB
- rincer la colonne par 6 volumes d'APB ($0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, ca. 0.45 MPa, $\gamma \approx 21 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$)
- prendre la référence d'absorption UV et noter la valeur de la conductivité
- régler le volume de collecte des fraction au maximum (5 mL)
- injecter la solution de protéines dans la colonne ($0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, ca. 1.3 MPa)
- rincer la colonne par 6 volumes d'APB ($0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, ca. 1.1 MPa, $\gamma \approx 21 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$)
- régler le volume de collecte à 1 mL
- rincer les pompes par le mélange APB + biotine ($5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
- éluer la colonne par 5-6 volumes du mélange ($0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, ca. 1.2 MPa, $\gamma \approx 20 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$)
- collecter immédiatement les fractions du pic, les placer dans des tube Eppendorf et les stocker à 4°C
- régénérer la colonne

iii. Régénération

La colonne doit être régénérée entre plusieurs utilisations. A la fin de l'opération, elle peut être utilisée directement ou bien stockée dans 20% EtOH.

- rincer les pompes à 10% AcOH
- laver la colonne avec 8 volumes d'acide acétique ($0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, ca. 1.23 MPa, $\gamma \approx 2 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$)

- rincer les pompes à $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ phosphate (pH = 7.0)
- laver la colonne avec 8 volumes de tampon phosphate ($0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, ca. 0.9 MPa, $\gamma \approx 15 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$)
- laisser la streptavidine se replier pendant 30 minutes
- rincer les pompes avec 20% EtOH
- reconditionner la colonne dans 8 volumes d'éthanol 20% ($0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, ca. 1.5 MPa, $\gamma \approx 0.5 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$)
- stocker à 4°C

iv. Purification finale et conditionnement

La solution de protéines obtenue dans les fractions en sortie de colonne doit être débarrassé de la biotine, éventuellement placée dans un nouveau tampon, et complétée avec du glycérol. A l'aide d'une membrane de concentration (Millipore Amicon Ultra-4), les protéines de haut poids moléculaire peuvent être sélectivement retenues et le tampon partiellement éliminé.

- rassembler les fractions sélectionnées à l'aide du gel de contrôle (p. 251) en super-fractions d'au plus 4 mL
- pour chaque super-fraction, introduire la solution dans la partie supérieure de la cartouche
- centrifuger à $5000\times g$ pendant 15 minutes à 4°C
- conserver le filtrat pour contrôle
- ajouter le tampon désiré dans la partie supérieure de la cartouche
- centrifuger à $5000\times g$ pendant 15 minutes à 4°C
- récupérer soigneusement la solution restant dans la partie supérieure de la cartouche
- la diluer éventuellement volume à volume avec du glycérol
- quantifier la concentration de protéine ($\epsilon(280\text{nm}) = 1.4 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$, $M = 9.8 \cdot 10^4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- aliquoter et stocker à -80°C

Protocole XIV.19

Gels de contrôle de l'induction et de l'expression

Pour vérifier la qualité du processus de purification, une électrophorèse sur gel (éventuellement suivie d'un *Western Blot*) est menée sur les fractions récoltées aux différentes étapes.

i. Lyse des fractions cellulaires

Les fractions cellulaires (avant et après induction) doivent être préalablement lysées.

- centrifuger les fractions **I** et **NI** à $10000\times g$ pendant 10 minutes à 4°C
- éliminer le surnageant
- resuspendre le culot dans 1 mL LyB (p. 283)
- ajouter SDS à 3% final
- transférer les tubes **sous hotte** jusqu'à la fin de la manipulation
- ajouter 2-mercaptoethanol à 1% final
- soniquer pendant 5 minutes dans un bain d'eau glacée
- dénaturer à 95°C pendant 5 minutes
- stocker à 4°C

ii. Gel d'électrophorèse dénaturant

Les protéines sont séparées en fonction de leur masse moléculaire par une électrophorèse sur gel dénaturant de polyacrylamide en présence de SDS. Ces gels peuvent par exemple être obtenus pré-coulés auprès d'Invitrogen (gamme «NuPAGE»).

- rassembler 20 μL des fractions à analyser : **NI**, **I**, **FP**, **U** et des fractions choisies collectées en sortie de la colonne
- ajouter 2 μL de tampon de charge
- dénaturer à 70°C pendant 10 minutes (c'est inutile pour **NI** et **I**)
- placer le gel de polyacrylamide dans une cuve contenant la solution d'électrophorèse
- enlever avec précaution le peigne du gel immergé
- introduire dans le compartiment cathodique (fil rouge) 200 μL d'agent antioxydant («1 \times » final)
- charger les puits extrêmes par un marqueur de poids moléculaire protéique
- charger les puits restants avec les fractions dénaturées
- faire migrer avec un champ électrique de l'ordre de $20\text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ jusqu'à ce que le colorant de migration atteigne la limite du gel
- laisser refroidir pour permettre au gel de se rigidifier un peu

iii. Coloration au Bleu de Coomassie

Le gel peut être révélé directement pour visualiser les protéines présentes par physisorption sur les acides aminés aromatiques et l'arginine.

- préparer un bain d'environ 1 cm d'épaisseur de Bleu de Coomassie, idéalement à température assez fraîche (4°C)
- dans un fond de tampon d'électrolyse, récupérer très délicatement le gel et couper les dents des puits sans créer de fracture

- transférer très délicatement, par exemple à l'aide d'une des plaques du gel, dans le bain de colorant
- laisser sous agitation douce sur un rotateur orbital pendant 45 minutes
- transférer délicatement dans un bain 10% AcOH + 20% EtOH contenant un morceau de papier absorbant
- laisser sous agitation douce sur un rotateur orbital pendant 2 heures en changeant la solution toutes les 30 minutes
- vérifier la présence de bandes claires et bien contrastées (bien que relativement pâles)
- transférer dans une pochette plastique transparente et éliminer les bulles d'air entre la pochette et les surfaces
- scanner le gel pour en conserver l'image

iv. Western Blot (transfert)

Par transfert sur une membrane de cellulose (PVDF 0.2 μm), marquage spécifique par une chimère streptavidine-HRP et révélation par chimiluminescence, il est possible de montrer la présence de protéines biotinylées.

- découper une feuille de membrane de cellulose légèrement plus grande (de quelques millimètres) que le gel
- la prétrempier dans du tampon de migration additionné de 20% EtOH
- rincer rapidement le gel dans du PBS (p. 282)
- déposer sur l'anode (fil noir) une feuille de papier Whatman, plus grande (d'environ 1 cm) que le gel, imbibée de tampon de migration
- déposer par-dessus le gel
- déposer par-dessus la membrane de migration
- déposer enfin une seconde feuille de papier Whatman imbibée
- recouvrir avec la cathode (fil rouge)
- faire migrer avec une densité de courant d'environ $1 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ pendant 1h
- vérifier que le colorant de l'échelle de poids moléculaire a passé dans la membrane
- plonger la membrane dans une solution «1×» de PBS (p. 282) + 0.1% Tween + 5% lait (en poudre, m/v)
- laisser sous agitation douce sur un rotateur orbital pendant la nuit à 4°C

v. Western Blot (marquage)

- plonger la membrane dans une solution «1×» de PBS (p. 282) + 0.1% Tween
- laisser sous agitation douce sur un rotateur orbital pendant 5 minutes
- répéter pour un total de 3 rincages
- plonger la membrane dans une solution «1×» de PBS (p. 282) + 0.1% Tween + 5% lait (en poudre, m/v) + 1/10 000 (v/v) HRP:avidine
- laisser sous agitation douce sur un rotateur orbital pendant 1 heure
- plonger la membrane dans une solution «1×» de PBS (p. 282) + 0.1% Tween
- rincer rapidement
- répéter pour un total de 3 rincages
- plonger la membrane dans une solution «1×» de PBS (p. 282) + 0.1% Tween + 5% lait (en poudre, m/v)
- laisser sous agitation vigoureuse sur un rotateur orbital pendant 5 minutes

- répéter pour un total de 3 rincages
- préparer l'agent de révélation au luminol (Amersham ECL)
- couper une série de films aux dimensions de la membrane
- plonger la membrane dans le révélateur (quelques minutes) et passer en chambre noire
- disposer la membrane dans un film plastique fin et la placer dans la cassette d'exposition
- exposer les films avec une série de temps (*e.g.* 1 seconde, 10 secondes, 1 minute, 5 minutes) et les révéler immédiatement □

Protocole XIV.20

Nettoyage préalable des surfaces pour la fluorescence

Si la propreté des surfaces est jugée insuffisante, les protocoles suivants peuvent être utilisés pour effectuer un nettoyage soigné. Les nettoyages utilisant des solutions acides de sels de chrome sont à proscrire absolument, étant données la forte toxicité de ces sels et l'incompatibilité qu'ils entraînent avec les applications biologiques.

i. Nettoyage basique

Pour effectuer un nettoyage en milieu basique, procéder comme suit

- préparer une solution de soude (NaOH) ou de potasse (KOH) à $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$
- immerger les surfaces à traiter dans la solution basique contenue dans un récipient inerte et propre (préférentiellement une surface téflonnée ou du verre, ne jamais utiliser de surface métallique)
- transférer dans un sonicateur et soniquer pendant 15 minutes à pleine puissance
- rincer à l'eau ultrapure, 5 à 10 fois
- immerger les surfaces à traiter dans de l'éthanol absolu (qualité «*spectro grade*» ou «fluorescence»)
- soniquer pendant 15 minutes à pleine puissance
- rincer à l'eau ultrapure, 5 à 10 fois
- sécher à l'argon et conserver en boîte fermée à l'abri de la poussière

Attention : Les solutions concentrées de soude ou potasse sont corrosives. Porter des gants et des lunettes de sécurtié, éventuellement une blouse de laboratoire. En cas de contact avec la peau ou les muqueuses, rincer abondamment à l'eau froide.

ii. Nettoyage neutre

Pour effectuer un nettoyage par détergent en milieu neutre, procéder comme suit

- préparer une solution à 1% de HELLMANEX II dans l'eau ultrapure
- immerger les surfaces à nettoyer dans cette solution contenue dans un récipient inerte et propre (préférentiellement une surface téflonnée ou du verre)
- transférer dans un sonicateur et soniquer pendant 15 minutes à pleine puissance
- rincer à l'eau ultrapure, 5 à 10 fois ; il ne doit pas rester de mousse
- sécher à l'argon et conserver en boîte fermée à l'abri de la poussière

iii. Nettoyage acide

Pour effectuer un nettoyage en milieu acide, procéder comme suit

- préparer un lit de mélange glace/eau
- disposer un b cher à large ouverture de contenance au moins trois fois supérieure au volume de solution oxydante ; prendre soin d'immerger les parois du récipient
- se placer sous une hotte à extraction, porter gants, blouse et lunettes de protection
- introduire dans le b cher 75% v/v d'acide sulfurique concentré
- introduire *lentement*, en prenant garde à ce que la température ne s'élève pas au-delà de 50 C, 25% v/v de solution de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)   «30 volumes» ;

si on dispose d'une solution plus concentrée, préalablement diluer cette solution dans le volume approprié de ddH₂O ; si le mélange se met à bouillir, interrompre l'addition et laisser reposer

- disposer les surfaces à nettoyer dans la solution ; ne pas introduire d'éléments métalliques
- laisser agir 15 minutes
- retirer les surfaces et les rincer à l'eau ultrapure 5 à 10 fois sécher à l'argon et conserver en boîte fermée à l'abri de la poussière
- introduire *lentement* un grand volume d'eau dans la solution jusqu'à observer un pH proche de la neutralité (entre 6 et 8) ; jeter à l'évier □

Attention : Ce protocole utilise des solutions très acides et oxydantes. Les déchets doivent impérativement être traités avant élimination et l'opérateur doit prendre des précautions en manipulant sous hotte à extraction avec blouse, gants et lunettes de protection avec un grand récipient d'eau à proximité. En cas d'emballement, verser *calmement et sans éclabousser* l'eau dans la solution.

Protocole XIV.21

Films hydrophobes pour pinces magnétiques

i. Solution de polystyrène

Pour préparer une solution à 5% m/v de polystyrène dans le toluène, procéder comme suit

- nettoyer à l'eau puis à l'acétone deux bouteilles en verre de 25 mL possédant un bouchage résistant au toluène
 - sécher les bouteilles à l'argon ou, a défaut, à l'air propre et sans poussières
 - introduire dans la première 10 mL de toluène de qualité «*spectro grade*» ou «*fluorescence*»
 - peser 0,5 g de polystyrène ($45000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) et les introduire dans le toluène
 - fermer et agiter la bouteille jusqu'à dissolution complète
 - préparer une seringue de 20 mL, sans son piston, munie à son extrémité d'un filtre à pores de $0,2 \mu\text{m}$
 - à l'abri des poussières, verser la solution de toluène dans la seringue
 - introduire le piston et expulser le filtrat dans la seconde bouteille
 - si le filtre se bouche, le remplacer et continuer l'opération
-

ii. Film de polystyrène

Pour déposer un film de polystyrène sur une lame, procéder comme suit

- travailler dans un environnement sans poussière ni courant d'air
 - déposer une lamelle de microscopie propre sur une platine de spin-coating
 - régler l'accélération à $4000 \text{ rpm}\cdot\text{s}^{-1}$ et la vitesse à 4000 rpm
 - déposer au centre de la lamelle 100 μL de solution de polystyrène (p. 256)
 - démarrer la rotation de la platine pour 2 secondes
 - stocker en boîte de PETRI propre fermée par du parafilm ou dans un autre contenant approprié
-

iii. Film de Teflon

Pour déposer un film de Teflon sur une lame, procéder comme suit

- travailler dans un environnement sans poussière ni courant d'air
- déposer une lamelle de microscopie propre sur une platine de spin-coating
- régler l'accélération à $4000 \text{ rpm}\cdot\text{s}^{-1}$ et la vitesse à 4000 rpm
- déposer au centre de la lamelle 100 μL de solution de Teflon
- démarrer la rotation de la platine pour 2 secondes
- stocker en boîte de PETRI propre fermée par du parafilm ou dans un autre contenant approprié

Protocole XIV.22

Film hydrophile pour fluorescence

i. Solution de silane

- dans un récipient propre, verser 40 mL d'éthanol absolu
 - ajouter de l'acide acétique ($1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 2 mL ou pur : $16.6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 130 μL) et mélanger
 - ajouter 40 μL de silane (APTES) et mélanger
 - chasser l'air du flacon d'APTES avec de l'argon et le stocker à 4°C
-

ii. Film de silane

- plonger les lamelles de microscopie propres dans la solution de silane (p. 257) à température ambiante pendant au moins deux heures
- rincer les lamelles par trempage dans un Falcon 50 mL d'éthanol absolu, 10 \times ;
- rincer les lamelles par trempage dans un Falcon 50 mL d'eau Millipore, 10-15 \times , jusqu'à ce que le film d'eau soit bien homogène
- sécher à l'air comprimé
- les lamelles peuvent être conservées dans un dessiccateur, sous vide, pendant quelques semaines

Le film de silane doit être recuit à 70°C pendant quelques secondes. Cette opération s'effectue généralement lors de la préparation de la chambre d'observation. En-dessous de pH 9, les chaînes ammonium du silane vont conférer une charge positive à la surface, ce qui permet d'y accrocher par interaction électrostatique des protéines ou de l'ADN.

Protocole XIV.23

Surface anti-digoxygénine pour pinces magnétiques

La surface inférieure des chambres d'observations, après avoir été recouverte d'un film hydrophobe comme du polystyrene (p. 256) ou du teflon (p. 256), peut fixer par interaction non-spécifique des anticorps. Ce protocole décrit la préparation de chambres d'observation recouvertes d'anti-digoxygénine.

i. Solution d'anticorps anti-digoxygénine

Pour préparer une solution d'anticorps anti-digoxygénine, procéder comme suit

- diluer la poudre d'anticorps anti-digoxygénine dans «1×» PBS (p. 282) à $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
- aliquoter par $50 \mu\text{L}$ et stocker à -20°C

ii. Surface recouverte d'anticorps anti-digoxygénine

Pour recouvrir d'anticorps anti-digoxygénine la surface hydrophobe d'une chambre d'observation, procéder comme suit

- injecter la solution d'anticorps anti-digoxygénine (p. 258) à $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
- placer dans une boîte de PETRI contenant un papier absorbant saturé de tampon de passivation (p. 282)
- réaliser un joint étanche de Parafilm
- incuber 1 heure à température ambiante ou sur la nuit à 4°C
- aspirer avec un papier absorbant la solution d'anticorps
- injecter du tampon pour surfaces SB (p. 283)
- aspirer et injecter à nouveau
- replacer dans la boîte de PETRI et refaire le joint
- stocker à 4°C

Il est nécessaire de respecter un temps d'équilibration d'environ une heure après la préparation de la surface. Par ailleurs, toujours vérifier que le tampon dans la boîte de Petri contient de l'azide de sodium pour assurer la conservation à long terme de la surface.

Protocole XIV.24

Surface biotine ou streptavidine pour pinces magnétiques ou fluorescence

Le principe de ce jeu de protocoles est d'obtenir une surface recouverte de biotine puis de streptavidine, à partir d'une surface chargée positivement.

i. Solution de caséine biotinylée

Attention, les solutions de caséine ne se congèlent pas et les solutions ont tendance à précipiter. Elles doivent par conséquent être fraîches d'au plus quelques jours pour éviter la formation d'agrégats sur les surfaces.

- préparer une solution de caséine à $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ par dissolution dans le tampon PIPES (p. 282)
- ajouter la solution de NHS-biotine (Pierce) conservée dans le DMSO sec «100×» à -20°C
- incuber sur glace 30 minutes

ii. Solution de streptavidine

Pour préparer une solution de streptavidine, procéder comme suit

- peser la quantité suffisante de streptavidine pour une solution à $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
- compléter le volume par le tampon Pipes pH 6.8 (p. 282)
- stocker à 4°C pendant quelques jours

Le pH du tampon correspond au point isoélectrique de la streptavidine et permet une dissolution puis un accrochage facile.

iii. Surface recouverte de caséine biotinylée

La surface silanisée est chargée positivement et va fixer la caséine par interaction électrostatique, en plus de l'accrochage non spécifique

Pour recouvrir de caséine biotinylée la surface silanisée (p. 257) d'une chambre d'observation, procéder comme suit

- injecter une solution de caséine biotinylée (p. 259) à $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
- incuber 10 minutes à température ambiante
- aspirer avec un papier absorbant la solution de caséine
- injecter du PBS (p. 282)
- renouveler le rinçage, 3-4×
- placer dans une boîte de PETRI contenant un papier absorbant saturé de PBS (p. 282)
- réaliser un joint étanche de Parafilm
- stocker à 4°C

iv. Surface recouverte de streptavidine

Pour recouvrir de streptavidine la surface biotinylée d'une chambre d'observation, procéder comme suit

- injecter la solution de streptavidine (p. 259) à $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
- incuber 10 minutes à température ambiante
- aspirer avec un papier absorbant la solution de caséine
- injecter du tampon PIPES pH 6.8 (p. 282)
- renouveler le rinçage, 3-4×
- placer dans une boîte de PETRI contenant un papier absorbant saturé de tampon PIPES pH 6.8 (p. 282)
- réaliser un joint étanche de Parafilm
- stocker à 4°C

Protocole XIV.25

Greffage d'ADN sur billes magnétiques

Ce protocole décrit le greffage de constructions d'ADN sur les billes magnétiques utilisées en pinces magnétiques. On supposera que les billes magnétiques sont recouvertes de streptavidine et que l'ADN porte une ou plusieurs biotine.

i. Discussion sur la stoechiométrie et les concentrations

L'interaction spécifique biotine:streptavidine conduit à la formation de complexes (streptavidine):(ADN)_n avec pour n une statistique poissonnienne du premier ordre. Quelques applications spécifiques mises à part, comme le *braiding*, on cherche absolument à se limiter au cas $n = 1$. Il faut noter que les quotients des probabilités $p(n = 2)/p(n = 1)$ et $p(n = 1)/p(n = 0)$ sont nécessairement égaux. Dans des conditions que nous recherchons, où les complexes $n > 1$ sont rares, le nombre de streptavidine ne comportant pas d'ADN ($n = 0$) sera donc relativement élevé par rapport aux complexes de stoechiométrie $n = 1$.

De manière générale, la molalité en ADN est de l'ordre de $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Pour des constructions de quelques milliers de paires de bases, cela porte la concentration à quelques nanomolaires.

D'après le fabricant, la densité de billes est de l'ordre de 10^{10} mL^{-1} , ce qui correspond à une concentration de l'ordre de 15 pM. Ce chiffre est cohérent avec une molalité annoncée de $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ et conduit en ordre de grandeur à des particules de taille micrométrique.

La «capacité de fixation de biotine» annoncée varie de 25 mM (MyOne Streptavidine) à 7-9 mM (M280 Streptavidine) (la concentration s'entend par rapport à un volume de solution commerciale de billes). Cette donnée est par contre surprenante ; elle conduit à une borne inférieure sur la molalité de streptavidine à plusieurs centaines de grammes par litre, pour une molalité en billes de $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Dans un modèle simple d'adsorption irréversible de streptavidine à la surface de la bille, cela conduirait à un rayon caractéristique de l'ordre de 50 pm pour la protéine. Ces deux valeurs sont vides de sens physique.

Il faut donc en conclure soit que ce dernier chiffre n'est pas transposable directement en concentration de streptavidine, soit que l'immense majorité de la streptavidine est sous forme libre dans la solution. Dans le même modèle simple d'adsorption irréversible de streptavidine à la surface de la bille, un rayon caractéristique de l'ordre de 10 nm pour la protéine conduit à une borne supérieure sur la concentration de streptavidine fixée à quelques micromolaires, soit quelques dizaines de milliers de protéines par bille.

Par conséquent, un mélange ADN:billes à 1:50 en volume correspond à un mélange 1:1 en moles de billes et donc 1:10000 en moles de streptavidine. Cela assure à la fois un très bon rendement en complexes (bille)(ADN)₁ et une quantité faible de complexes (bille)(ADN)₂.

ii. Greffage d'ADN sur billes magnétiques

En pratique, les proportions ADN:billes sont modulées autour de la valeur théorique 1:50 (p. 261) en fonction des observations. Le protocole de base pour obtenir des complexes bille:ADN (p. 261) de stoechiométrie 1:1 est le suivant

- introduire dans un tube Eppendorf de 0,6 mL, $10 \mu\text{L}$ de billes magnétiques

- ajouter 50 μL de tampon de passivation PB (p. 282) et mélanger très doucement
- utiliser un collecteur magnétique pour condenser les billes sur la paroi
- éliminer totalement le liquide contenant les streptavidines libres
- resuspendre très doucement les billes dans 50 μL de tampon de passivation (p. 282)
- répéter éventuellement le lavage
- ajouter 1 μL de solution d'ADN biotinylé et mélanger très doucement
- incuber 30 minutes à température ambiante sur rotateur
- (optionnel à partir de ce point) utiliser un collecteur magnétique pour condenser les billes sur la paroi
- éliminer totalement le liquide contenant les ADN libres
- resuspendre très doucement les billes dans 50 μL de tampon de passivation (p. 282)
- répéter éventuellement le lavage
- stocker à température ambiante sur rotateur

iii. **Protection des streptavidines libres**

Après incubation, un nombre considérable de sites streptavidine restent libres. Pour éviter l'accrochage ultérieur non souhaité de produits biotinylés (protéines, fluorophores), ces sites peuvent être saturés par de la biotine libre.

Pour saturer les sites streptavidine libres, procéder comme suit

- préparer 50 μL de solution de complexes bille:ADN (p. 261)
- après incubation, ajouter 1 μL de solution de biotine à 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
- incuber 15 minutes à température ambiante sur rotateur
- utiliser un collecteur magnétique pour condenser les billes sur la paroi
- éliminer totalement le liquide
- resuspendre très doucement les billes dans 50 μL de tampon de passivation (p. 282)
- répéter le lavage
- stocker à température ambiante sur rotateur

Protocole XIV.26

Greffage des complexes bille:ADN sur la surface

Ce protocole décrit le greffage de complexes bille:ADN (p. 261) sur une surface recouverte d'anti-digoxygenine, ainsi que des éléments de résolution de problèmes courants.

i. Injection

La cellule de mesure devra être installée sur le microscope, les aimants à plus grande distance possible de la surface.

Pour préparer une surface recouverte de complexes bille:ADN, procéder comme suit

- connecter une surface anti-digoxygenine (p. 258) à la connectique adaptée
- rincer rapidement avec 500 μL de tampon pour surfaces SB (p. 283)
- régler le débit pour avoir une vitesse au voisinage de la surface de l'ordre de 10 $\mu\text{m/s}$ (soit environ 10 $\mu\text{L}/\text{min}$)
- interrompre le flux et injecter 1 μL de solution de complexes bille:ADN (p. 261) dans le réservoir
- laisser sédimenter 2 minutes puis remettre le flux
- interrompre le flux dès que les billes passent devant l'objectif (entre 15 secondes et 2 minutes après injection)
- remplacer immédiatement le tampon dans le réservoir pour éliminer les billes non injectées
- laisser sédimenter (entre 30 secondes et 3 minutes) puis incuber 5 minutes
- remettre le flux et rincer les billes qui ne se sont pas liés à la surface (de 5 à 10 minutes)
- soumettre l'échantillon à une force de l'ordre de 0,3 pN

Idéalement, la chambre ne devrait comporter à ce stade que des billes magnétiques pontées par un ADN à la surface, fluctuant doucement dans le champ magnétique à quelques microns au-dessus de la surface. En réalité, un certain nombre de problèmes peuvent apparaître.

ii. Résolution de problèmes : peu de billes juste après injection

La densité optimale de billes correspond à une distance moyenne d'environ 5 diamètres après sédimentation sur la surface. Si la densité observée est nettement plus faible, procéder pas à pas jusqu'à résolution du problème :

- augmenter la quantité de billes injectées, jusqu'à un maximum de 10 μL
- si la quantité injectée n'a pas d'influence sur la concentration juste après injection, diminuer le volume de tampon dans lequel les billes sont injectées, jusqu'à un minimum de 30 μL
- si cela n'est pas suffisant, laisser sédimenter plus longtemps (5 minutes) avant d'injecter
- si la concentration juste après injection est encore trop faible, injecter avec flux et sans laisser sédimenter préalablement
- si la concentration juste après injection est suffisante, mais que la sédimentation est difficile, injecter dans un tampon moins dense comme le tampon bas sel (p. 283)

Si à ce stade le problème n'est pas résolu, la raison est sans doute que le système

introduit une dispersion notable du paquet initial de billes, ce qui a pour effet d'en diminuer la concentration.

iii. Résolution de problèmes : peu de billes après rinçage

La préparation des complexes bille:ADN (p. 261) nécessite un large excès initial de billes, en principe éliminé après rinçage. Cet excès, combiné aux vicissitudes de la chimie de surface et des réactions de complexation, a pour effet de conduire à une proportion de billes magnétiques qui ne sont pas greffées sur la surface après incubation. En dessous d'une efficacité de 30%, procéder comme suit

- augmenter le temps d'incubation, jusqu'à un maximum de 15 minutes
- si l'effet n'est pas suffisant et que ce n'est pas le tampon pour surfaces (p. 283) qui a été utilisé, injecter dans un tampon à plus bas sel, qui écranterait moins les interactions
- si l'efficacité est encore trop faible, augmenter le rapport stoechiométrique dans le complexe ADN:bille en faveur de l'ADN, jusqu'à un maximum de 1,5 μL pour 10 μL de billes

A partir de ce moment, trois possibilités principales subsistent en cas d'échec

- la surface a une capacité de fixation de la digoxygénine dégradée, en plus des facteurs précédents, par le passage répété de bulles d'air, la saturation des sites par les expériences précédentes, des films bactériens, *etc.* : essayer une construction d'ADN qu'on sait valide ; si ce n'est pas le cas la surface doit probablement être changée
- l'ADN est dégradé par l'âge, le cisaillement dû à une manipulation brutale, des nucléases, *etc.* : quantifier d'abord la quantité totale de nucléotides. Si elle est suffisante, tester l'ADN sur une surface et avec des billes valides. Repréparer le cas échéant la construction d'ADN.
- les billes ont une capacité de fixation de la biotine dégradée par l'âge, les chocs thermiques, *etc.* : resuspendre vigoureusement et tester avec une construction d'ADN et une surface valides. Changer de lot si nécessaire.

iv. Résolution de problèmes : peu de billes «en l'air»

Après sédimentation, incubation puis rinçage, les billes restant sur la surface peuvent y demeurer collées même en appliquant une force magnétique de quelques pN. La proportion de billes «en l'air» peut s'avérer assez faible : jusqu'à 5% sans inquiétude, du moment que la quantité totale de billes en l'air est suffisante. Si ce n'est pas le cas, procéder comme suit

- augmenter la concentration de billes injectées et de billes restant après rinçage
- si la quantité reste faible, augmenter le rapport stoechiométrique dans le complexe ADN:bille en faveur de l'ADN, jusqu'à un maximum de 1,5 μL pour 10 μL de billes
- si la proportion reste faible, augmenter la quantité de surfactant dans le tampon d'injection pour diminuer les interactions surface:bille non spécifiques ; augmenter également un peu la quantité de sel pour écranter les interactions surface:bille, sans les annuler pour autant

En cas d'échec, tester la qualité de la surface et de la construction d'ADN.

Protocole XIV.27

Purification de marqueurs

Des marqueurs de grande taille comme les *Quantum Dots*, les *FluoSpheres* et les billes magnétiques ou non sont recouverts de molécules (comme la biotine, la streptavidine ou des anticorps) permettant leur accrochage. Selon la qualité du lot, ces molécules peuvent être relarguées partiellement, entraînant une baisse de l'efficacité du couplage ultérieur du marqueur avec la molécule d'intérêt. Une purification s'avère généralement nécessaire.

i. Purification par filtration

Ce protocole décrit la purification de marqueurs de grande taille par filtration à travers une membrane. La taille des pores (25 nm) impose de travailler avec des marqueurs suffisamment gros ou, dans les cas limites, sur des temps assez courts. Procéder comme suit

- préparer une boîte de PETRI de 6 cm
- remplir d'environ 10 mL de tampon de passivation (p. 282)
- déposer un filtre de nitrocellulose (Millipore, USA)
- déposer au centre un minimum de 5 μL de solution de marqueur à purifier
- incuber de 15 à 30 minutes à température ambiante ou de 30 à 60 minutes à 4°C

Le volume récupéré diffère généralement peu du volume déposé. Certains *Quantum Dots* ont un diamètre de l'ordre de 20 nm, voisin de celui des pores ; il peut dans ce cas y avoir un peu de fuites vers le tampon.

Par ailleurs, selon la nature du marqueur, un tampon autre que PB peut s'avérer plus adapté.

ii. Purification magnétique

Les marqueurs magnétiques peuvent être purifiés facilement par sédimentation temporaire. Procéder comme suit

- dans un tube Eppendorf 0,5 mL, introduire 1 volume de solution de billes magnétiques resuspendues
- ajouter 5 volumes de tampon de passivation (p. 282) et homogénéiser
- placer un aimant sur le côté du tube et laisser sédimenter les billes
- toujours sous aimantation, éliminer totalement le liquide
- répéter le rinçage au moins une deuxième fois
- resuspendre dans le volume désiré de tampon

iii. Purification par exclusion de taille

Par cette méthode, les éléments de taille plus petite que celle des pores vont passer à travers la membrane. Seuls les plus gros sont retenus dans la partie supérieure, puis récupérés.

- placer une membrane de filtration Microcon (Millipore) adaptée sur un tube Eppendorf
- déposer la solution à filtrer dans le puits au centre de la membrane, sans la toucher

14 Protocoles

- centrifuger (se reporter à la vitesse et au temps indiqués dans le manuel en fonction de la taille des pores utilisés)
- placer la membrane sur un nouveau tube Eppendorf en retournant le puits
- centrifuger 3 minutes à $1000\times g$ pour récupérer le liquide

Protocole XIV.28

Préparation de complexes T7RNAP:ADN fluorescents bloqués en transcription

Ce protocole décrit la préparation de complexes T7RNAP:ADN fluorescents, bloqués après le départ de la transcription par défaut de rUTP.

i. Complexe (*Quantum Dot*:streptavidine):(biotine:RNAP)

Pour préparer des complexes RNAP:*Quantum Dot*, procéder comme suit

- purifier par filtration (p. 265) 5 μL d'une solution «1/3 \times » (670 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) de *Quantum Dot* 655:streptavidine
- dans un tube Eppendorf de 200 μL introduire 1 μL de cette solution
- ajouter 4 μL de solution de RNAP:biotine à 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
- ajouter 1 μL de solution de BSA (150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
- incuber 15 minutes à température ambiante
- purifier par filtration (p. 265) cette solution en incubant 15 minutes à température ambiante
- stocker à 4°C sur la journée

ii. Complexe (*FluoSpheres*:streptavidine):(biotine:RNAP)

Pour préparer des complexes RNAP:*FluoSpheres*, procéder comme suit

- purifier par filtration (p. 265) 5 μL d'une solution «1 \times » (680 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) de *FluoSpheres* 505/515:neutravidine
- dans un tube Eppendorf de 200 μL introduire 1 μL de cette solution
- ajouter 4 μL de solution de RNAP:biotine à 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
- ajouter 1 μL de solution de BSA (150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
- incuber 15 minutes à température ambiante
- purifier par filtration (p. 265) cette solution en incubant 15 minutes à température ambiante
- stocker à 4°C sur la journée

iii. Complexe (*FluoSpheres*:streptavidine):(biotine:RNAP):(ADN:bille)

Sur un certain nombre de substrats d'ADN, la première incorporation d'un nucléotide rUTP se fait *après* la formation du complexe d'élongation. En présence de rATP, rGTP et rCTP, un complexe d'élongation prêt à repartir peut donc être temporairement formé. La présence de rUDP augmente la stabilité du complexe (Thomen 2002).

Pour préparer un complexe d'élongation arrêté, procéder comme suit

- préparer préalablement une solution de complexes ADN:bille (p. 261) (concentration voisine de 5 $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
- préparer préalablement une solution de complexes *Quantum Dot*:RNAP (p. 267) ou complexes *FluoSphere*:RNAP (p. 267) (concentration voisine de 100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
- préparer préalablement 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ d'une solution de tampon de transcription (p. 283) «1 \times » supplémenté de 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ des nucléotides rATP+rGTP+rCTP+rUDP

14 Protocoles

- dans un tube Eppendorf de 200 μL introduire 5 μL de complexe ADN:bille
- ajouter 2 μL de complexe fluorophore:RNAP
- ajouter 1 μL de tampon de transcription (p. 283) «10 \times »
- ajouter 2 μL d'un mélange rATP+rGTP+rCTP (1 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ chacun)
- incuber 15 minutes à température ambiante sur rotateur
- purifier magnétiquement (p. 265) les complexes en resuspendant à deux reprises dans le tampon de transcription supplémenté des 3 rNTP et de rUDP
- stocker sur le rotateur

Protocole XIV.29

Test d'activité de transcription *in vitro*

La transcription est évaluée par observation d'un gel d'électrophorèse du milieu après réaction.

i. Réaction *in vitro*

Les manipulations doivent s'effectuer avec des gants et le plus possible en l'absence de nucléases (paillasse nettoyée avec un cocktail d'inhibiteurs, eau certifiée sans nucléases, *etc.*). L'ensemble des tubes à préparer est le suivant :

Réactif	Final	RNAP	-rNTP	-ADN	-RNAP	+DNase
ADN	100 μg	+	+	-	+	+
Tampon	«1 \times »	+	+	+	+	+
rNTP	2 mM	+	-	+	+	+
RiboLock	-	+	+	+	+	+
RNAP	400 nM	+	+	+	-	+

TAB. 14.1: Test d'activité *in vitro* de RNAP

L'ADN doit être un fragment *linéarisé* contenant le promoteur de la polymérase et permettant la synthèse d'un produit de transcription assez long (quelques milliers de nucléotides). Le tampon de transcription (p. 283) ne doit pas contenir d'ions chlorure. Le RiboLock est un cocktail d'inhibiteurs de ribonucléases. La DNase I est utilisée dans un des tubes pour vérifier que les polynucléotides produits sont bien des ARN.

- porter les tubes à 37°C pendant 1 heure
- pendant ce temps procéder au coulage du gel si besoin
- inactiver les protéines à 70°C pendant 20 minutes
- dans le tube +**DNase** ajouter 1 μL de DNase I
- porter les tubes à 37°C pendant 15 minutes
- inactiver les protéines à 70°C pendant 10 minutes
- ajouter une quantité suffisante de bleu de charge dans tous les tubes à analyser

ii. Gel d'électrophorèse

- couler un gel d'agarose à 2% dans du TAE «1 \times » (p. 281)
- introduire dans le moule 0.5 - 1 μL de bromure d'ethidium (EtBr)
- laisser reposer jusqu'à prise complète et enlever le peigne
- remplir les puits extrêmes avec des échelles de poids moléculaire d'ADN et d'ARN
- remplir les puits restants avec le produit de la réaction de transcription additionné de bleu de charge
- faire migrer à 20 $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$
- révéler la présence des polynucléotides sous irradiation UV

En cas de succès, des bandes (éventuellement multiples et plus ou moins bien séparées) différentes de la bande de l'ADN substrat devraient être présentes, et uniquement dans les tubes **RNAP** et +**DNase**. Selon la qualité du gel et de la transcription, un *smear* important peut apparaître.

Protocole XIV.30

Construction du faisceau d'excitation

Ce protocole permet de construire un faisceau d'excitation polychromatique à partir d'une collection de sources LASER. La numérotation des éléments reprend celle de la figure 2.12 p. 31.

i. Choix des optiques

Le montage décrit comprend trois sources LASER permettant d'exciter la plupart des fluorophores classiques. Il comprend

- un laser Hélium-Néon S_i émettant à $\lambda = 633$ nm, de puissance moyenne $P = 17$ mW
- un laser à diode S_{ii} émettant à $\lambda = 532$ nm, de puissance moyenne $P = 50$ mW
- un laser Argon-ion S_{iii} émettant à $\lambda = 488$ nm et $\lambda = 532$ nm, de puissance moyenne $P = 15$ mW

Afin de recombinaison ces faisceaux, des filtres dichroïques sont utilisés :

- un filtre réjecteur vert M_{ii} $\lambda = 535$ nm ± 15 nm
- un filtre réjecteur bleu M_{iv} $\lambda = 480$ nm ± 10 nm

ii. Recombinaison grossière des faisceaux d'excitation

- disposer parallèlement et fixer mécaniquement les sources S_i , S_{ii} et S_{iii} espacées d'environ 15 cm
- allumer S_i et sur le trajet optique disposer D_i à 25 cm de la source
- disposer sur le trajet optique D_{ii} à 10 cm en aval de D_i
- fermer D_i et D_{ii}
- régler finement le positionnement (x,y,z) de D_i et D_{ii} pour amener le faisceau issu de S_i au centre de ces deux diaphragmes
- disposer M_{ii} sur le trajet optique à environ 10 cm de S_i ; l'incliner à environ 45° par rapport à l'axe optique
- allumer S_{ii}
- disposer M_i au croisement du faisceau issu de S_{ii} et de la perpendiculaire au faisceau issu de S_i passant par M_{ii}
- incliner M_i à environ 45° par rapport à l'axe optique jusqu'à faire coïncider sur M_{ii} les taches de diffusion des faisceaux issus de S_i et S_{ii}
- disposer M_{iv} sur le trajet optique à environ 20 cm de S_i ; l'incliner à environ 45° par rapport à l'axe optique
- allumer S_{iii}
- disposer M_{iii} au croisement du faisceau issu de S_{iii} et de la perpendiculaire au faisceau issu de S_i passant par M_{iv}
- incliner M_{iii} à environ 45° par rapport à l'axe optique jusqu'à faire coïncider sur M_{iv} les taches de diffusion des faisceaux issus de S_i et S_{iii} \square

iii. Recombinaison fine des faisceaux d'excitation

- vérifier que D_{ii} est fermé et que S_i , S_{ii} et S_{iii} sont allumées

- ouvrir D_i et centrer à l'aide de M_{ii} le faisceau issu de S_{ii} sur D_{ii}
- fermer D_i et centrer à l'aide de M_i le faisceau issu de S_{ii} sur D_i
- répéter les deux étapes précédentes jusqu'à obtenir un centrage stable
- ouvrir D_i et centrer à l'aide de M_{iv} le faisceau issu de S_{iii} sur D_{ii}
- fermer D_i et centrer à l'aide de M_{iii} le faisceau issu de S_{iii} sur D_i
- répéter les deux étapes précédentes jusqu'à obtenir un centrage stable □

iv. Modulateur acousto-optique

Certaines techniques comme le FRET imposent une modulation rapide de l'intensité d'excitation. Un modulateur acousto-optique diffracte le faisceau d'excitation et permet de régler à volonté le rapport des intensités entre l'ordre 0 et l'ordre -1. Le montage d'excitation est conçu pour éliminer l'ordre 0 afin de ne conserver que les longueurs d'onde sélectionnées.

- vérifier que D_i et D_{ii} sont ouverts et que S_i , S_{ii} et S_{iii} sont allumées
- disposer le modulateur hors-tension entre D_i et D_{ii}
- régler finement le positionnement (x,y,z) du modulateur pour centrer le faisceau d'excitation sur sa pupille d'entrée
- réduire l'ouverture de D_i
- régler finement le positionnement (θ,ϕ) du modulateur en amenant au centre de D_i la réflexion du faisceau sur la pupille d'entrée du modulateur □

Le modulateur lui-même doit ensuite être réglé conformément à la documentation fournie par le constructeur.

Protocole XIV.31

Alignement de la fibre optique et optimisation

La numérotation des éléments reprend celle de la figure 2.12 p. 31.

i. Alignement du faisceau sur la fibre optique

Si un modulateur acousto-optique est présent, il doit être préalablement mis sous tension et réglé de telle manière que les faisceaux issus de S_i , S_{ii} et S_{iii} émergent du modulateur avec une intensité maximale à l'ordre -1.

La fibre optique est munie d'une lentille de couplage L_i fournie par le constructeur. La fibre est mécaniquement contrainte au point focal image de L_i ce qui assure un couplage optimal. L'entrée de la fibre sera par extension désignée L_i .

- allumer S_i et vérifier que S_{ii} et S_{iii} sont éteints
- disposer sur le trajet optique le miroir M_v à environ 5 cm de D_{ii} ; l'incliner à environ 45° par rapport au faisceau
- disposer sur le trajet optique le miroir M_{vi} à environ 10 cm de M_v ; l'incliner à environ 45° par rapport au faisceau
- disposer sur le trajet optique D_{iii} à 5 cm de M_{vi}
- régler finement le positionnement (x,y,z) de D_{iii} pour amener le faisceau au centre de ce diaphragme
- disposer sur le trajet optique D_{iv} à 10 cm en aval de D_{iii}
- régler finement le positionnement (x,y,z) de D_{iv} pour amener le faisceau au centre de ce diaphragme
- fixer mécaniquement L_i sur D_{iii} et vérifier le parfait centrage du faisceau sur L_i

ii. Réglage grossier du couplage

Même apparemment centré sur L_i , le faisceau d'excitation doit être finement réglé pour être correctement couplé à la fibre optique.

Ce réglage nécessite un puissance-mètre réglé à la longueur d'onde de la source S_i . Pour obtenir une mesure fiable, le point de focalisation du faisceau sur le détecteur doit être déplacé régulièrement, celui-ci chauffant assez rapidement.

- disposer le détecteur du puissance-mètre immédiatement à la sortie S_1 de la fibre
- ajuster le réglage porte P de M_{vi} pour maximiser l'intensité en sortie de la fibre
- ajuster le réglage trappe T de M_{vi} pour maximiser l'intensité en sortie de la fibre
- répéter les deux étapes précédentes jusqu'à obtenir un réglage stable
- ajuster le réglage P de M_v pour maximiser l'intensité en sortie de la fibre
- ajuster le réglage T de M_v pour maximiser l'intensité en sortie de la fibre
- répéter les deux étapes précédentes jusqu'à obtenir un réglage stable
- répéter les réglages P/T sur M_{vi} en alternance avec M_v jusqu'à obtenir un réglage stable

Le réglage peut être fait en inversant les ordres P/T et M_{vi}/M_v sans conséquence sur le résultat.

iii. Optimisation du rendement de couplage

Bien que le protocole précédent ait permis d'effectuer un réglage (x,y,θ,ϕ) très précis de l'incidence du faisceau d'excitation sur L_i , il est néanmoins possible qu'un mode secondaire (un maximum local d'intensité en S_1) ait été sélectionné. Ce protocole permet de faire un réglage fin de (x,y,θ,ϕ) en procédant à des excursions importantes dans l'espace des paramètres.

iv. Réglage porte

- noter l'intensité I_0 mesurée en S_1
- modifier dans le sens horaire le réglage porte P de M_{vi} jusqu'à mesurer en S_1 une intensité $I \approx I_0/2$
- ajuster le réglage P de M_v jusqu'à mesurer en S_1 une intensité maximale I_1 . Noter le sens (horaire ou anti-horaire) qui a été utilisé

Si $I_1 < I_0$

- ajuster dans le sens inverse le réglage P de M_v jusqu'à revenir en S_1 à une intensité $I \approx I_0/2$
- modifier dans le sens anti-horaire le réglage P de M_{vi} jusqu'à retrouver en S_1 une intensité maximale $I \approx I_0$
- répéter le protocole d'optimisation du réglage porte en modifiant le réglage P de M_{vi} dans le sens *anti-horaire*

Si $I_1 > I_0$, répéter le protocole d'optimisation du réglage porte en continuant à modifier le réglage P de M_{vi} dans le même sens

Si $I_1 = I_0$, passer au réglage trappe.

v. Réglage trappe

- noter l'intensité I_1 mesurée en S_1
- modifier dans le sens horaire le réglage trappe T de M_{vi} jusqu'à mesurer en S_1 une intensité $I \approx I_1/2$
- ajuster le réglage T de M_v jusqu'à mesurer en S_1 une intensité maximale I_2 . Noter le sens (horaire ou anti-horaire) qui a été utilisé

Si $I_2 < I_1$

- ajuster dans le sens inverse le réglage T de M_v jusqu'à revenir en S_1 à une intensité $I \approx I_1/2$
- modifier dans le sens anti-horaire le réglage T de M_{vi} jusqu'à retrouver en S_1 une intensité maximale $I \approx I_1$
- répéter le protocole d'optimisation du réglage trappe en modifiant le réglage T de M_{vi} dans le sens *anti-horaire*

Si $I_2 > I_1$, répéter le protocole d'optimisation du réglage trappe en continuant à modifier le réglage T de M_{vi} dans le même sens

Si $I_2 = I_1$, répéter au réglage porte jusqu'à obtention d'un réglage stable.

Protocole XIV.32

Positionnement et alignement de la source

Le but de ces opérations est de faire coïncider l'axe optique de l'objectif et le faisceau LASER d'excitation. Ceci réalisé, le faisceau est focalisé sur le plan focal arrière de l'objectif. Les éléments optiques ont été préalablement positionnés sur la table optique de telle manière que seuls les réglages angulaires restent à réaliser. La numérotation des éléments reprend celle de la figure 2.28 p. 43.

Il est important de vérifier préalablement que le miroir dichroïque M_2 est compatible avec la longueur d'onde du faisceau LASER utilisé pour l'alignement.

i. Réglage grossier

Procéder comme suit :

- monter l'objectif L_2 dans son logement
- centrer grossièrement la position angulaire des miroirs M_1 et M_2 autour de 45°
- fixer mécaniquement l'ensemble $D_1 + L_1$ devant la source
- fermer le diaphragme D_2 et déplacer grossièrement sur la table optique l'ensemble source + $D_1 + L_1$ pour positionner le faisceau sur le centre de D_2
- ouvrir D_2 et affiner la position de l'ensemble source + $D_1 + L_1$ sur la table optique pour positionner le faisceau sur le centre de L_2
- déplacer l'ensemble source + $D_1 + L_1$ le long de l'axe optique approximatif pour obtenir un faisceau le plus fin possible au niveau de L_2
- placer l'ensemble $D_3 + M_3$ à l'arrière de l'objectif L_2 . Il est crucial que ces deux composants soient *mécaniquement alignés* avec l'axe optique de L_2 , par exemple en les vissant sur la bague de l'objectif.
- fermer D_3 et affiner la position de l'ensemble source + $D_1 + L_1$ sur la table optique pour positionner le faisceau sur le centre de D_3
- monter l'ensemble source + $D_1 + L_1$ sur deux platines de translation horizontales et perpendiculaires et fixer fermement l'ensemble sur la table optique

L'étape suivante est le réglage fin de la coïncidence de l'axe optique de l'objectif et du faisceau LASER d'excitation.

ii. Alignement du faisceau

Procéder comme suit

- vérifier que D_2 est ouvert, entrouvrir D_1 et fermer D_3
- à l'aide de la platine de translation, déplacer latéralement le faisceau jusqu'à environ 1mm du bord de D_2 , afin de faire en sorte qu'en configuration «onde évanescence» le faisceau ne soit pas coupé par D_2
- centrer le faisceau sur D_3 à l'aide de M_1
- ouvrir D_3 et centrer sur D_1 le faisceau réfléchi par M_3 à l'aide de M_2
- fermer D_3 et répéter les deux étapes précédentes jusqu'à obtenir un centrage stable
- ouvrir D_3 et D_2 et démonter l'ensemble $D_3 + M_3$

Le faisceau du laser est maintenant confondu avec l'axe optique de l'objectif L_2 . Comme l'objectif peut être amené à être déplacé (par exemple pour utiliser des porte-échantillons d'épaisseur différente) ou le faisceau être déplacé pour passer en configuration «onde

évanescente», cette procédure devra régulièrement être répétée.

iii. Focalisation du faisceau

Pour focaliser précisément le faisceau au plan focal arrière de l'objectif, procéder comme suit :

- placer un écran à l'avant de l'objectif de manière à observer le faisceau après son passage par L_2
- (optionnel) placer une gouttelette d'huile à immersion puis une lamelle de verre sur l'objectif de façon à avoir un dioptré de sortie bien plan
- à l'aide de la platine de translation, déplacer l'ensemble source + D_1 + L_1 dans la direction de l'axe optique de façon à minimiser la taille de la tache de diffraction du faisceau sur l'écran
- réaligner l'axe optique du faisceau avec celui de l'objectif par le protocole précédent (p. 274) et vérifier la qualité du réglage □

Le faisceau d'excitation est maintenant parfaitement aligné et focalisé. Il n'est en général pas nécessaire de répéter régulièrement l'étape de focalisation, la profondeur de champ de la lentille L_1 étant relativement grande devant celle de L_2 au niveau du plan focal arrière de l'objectif.

Protocole XIV.33

Mise en œuvre de l'onde évanescente

A partir d'un faisceau coïncidant avec l'axe optique de L_2 et focalisé au point focal arrière de celui-ci, le faisceau d'excitation peut être déplacé en configuration «onde évanescente» sans modifier le parallélisme du faisceau et de l'axe optique de L_2 . La numérotation des éléments reprend celle de la figure 2.28 p. 43.

i. Mise en place

Procéder comme suit

- placer sur l'objectif une goutte d'huile à immersion, puis une lamelle de verre surmontée d'une goutte d'eau
- (optionnel) surmonter l'ensemble d'une seconde lamelle de verre pour obtenir un dioptre plan
- à l'aide de la platine de translation, déplacer l'ensemble source + D_1 + L_1 parallèlement à l'axe optique
- s'assurer que le faisceau est amené plus près du centre de D_2 et pas plus près du bord
- observer l'angle de sortie du faisceau à l'avant de L_2 augmenter progressivement jusqu'à atteindre 90° ; si la goutte d'eau n'est pas surmontée d'une lamelle, la réfraction sur le dioptre eau-air peut s'avérer légèrement trompeuse
- lorsque le faisceau incident s'est approché du bord de l'objectif L_2 jusqu'à environ 3mm, observer un faisceau émergent indiquant l'existence de la réflexion totale du faisceau au niveau du dioptre verre-eau; cette réflexion présente probablement un angle important avec l'axe optique
- en déplaçant grossièrement l'objectif dans la direction de l'axe optique, faire en sorte que le faisceau émergent soit parallèle à l'axe optique et symétrique du faisceau incident par rapport à l'axe optique

ii. Réglage fin

Le principe du réglage fin est de modifier la position de l'objectif le long de l'axe optique à l'aide de l'actuateur piezo-électrique, en observant la fluorescence d'objets ponctuels déposés à la surface de la lamelle de verre.

Ces objets doivent être excitables par le LASER utilisé pour l'alignement, émettre dans une gamme spectrale compatible avec les filtres présents sur le chemin optique et idéalement être d'une grande brillance. Une solution diluée de *FluoSpheres* ou de *Quantum Dots* satisfera ces critères.

Procéder comme suit

- placer sur l'objectif une goutte d'huile à immersion, puis une lamelle de verre
- déposer sur la lamelle une goutte de solution de fluorophore
- recouvrir la goutte d'une seconde lamelle
- en déplaçant grossièrement l'objectif selon l'axe optique en direction de la surface, produire une image la plus nette possible des fluorophores sur la caméra
- affiner ce réglage à l'aide de l'actuateur piezo-électrique jusqu'à focalisation parfaite
- à l'aide de la platine de translation, déplacer le faisceau en s'éloignant du centre de

- l'objectif jusqu'à faire disparaître le faisceau émergent à l'arrière de l'objectif
- se placer juste à la réapparition du faisceau émergent et confirmer la focalisation parfaite □

Protocole XIV.34

Réglage et alignement des caméras

Ce protocole présente le réglage de l'intégralité de l'étage de détection, comprenant fluorescence en onde évanescente et observation par transmission à longueur d'onde élevée. Les réglages des deux caméras ne sont pas indépendants et il est nécessaire de les réaliser en même temps. La numérotation des éléments reprend celle de la figure 2.28 p. 43.

Attention : pour protéger la surface sensible des détecteurs, les caméras doivent être manipulées hors-tension sauf lorsqu'il est nécessaire d'observer une image.

i. Alignement de C_2

L'objectif L_2 forme une image de l'échantillon à l'infini. Après passage par le système optique, cette image est envoyée sur les lentilles L_3 et L_4 et focalisée sur les détecteurs C_1 et C_2 . Un tube optique transparent d'environ 5cm, portant à ses deux extrémités les diaphragmes D_6 et D_7 , est noté T1 dans ce protocole.

Pour aligner le détecteur C_2 , procéder comme suit

- remplacer temporairement C_2 par T1, D_6 se trouvant en amont de D_7
- se placer en fluorescence directe en utilisant le protocole d'alignement (p. 274)
- démonter le miroir M_5
- vérifier que D_3 et M_3 se trouvent à l'arrière de l'objectif L_2
- fermer le diaphragme D_5
- en utilisant M_4 , centrer sur D_5 le faisceau réfléchi par M_3
- ouvrir D_6 et centrer à l'aide de M_8 le faisceau sur D_7
- fermer D_6 et centrer à l'aide de M_7 le faisceau sur D_6
- répéter les deux étapes précédentes jusqu'à obtenir un centrage stable
- démonter l'ensemble $D_3 + M_3$
- remonter le miroir M_5
- démonter T1 et remplacer C_2

ii. Alignement rigoureux de C_1

Pour aligner le détecteur C_1 , procéder comme suit

- remplacer temporairement C_1 par T1, D_6 se trouvant en amont de D_7
- se placer en fluorescence directe en utilisant le protocole d'alignement (p. 274)
- aligner le détecteur C_2 par le protocole précédent (p. 278), en particulier en ce qui concerne M_4
- vérifier que D_3 et M_3 se trouvent à l'arrière de l'objectif L_2
- ouvrir le diaphragme D_4
- ouvrir D_6 et centrer à l'aide de M_6 le faisceau sur D_7
- fermer D_6 et centrer à l'aide de M_5 le faisceau sur D_6
- répéter les deux étapes précédentes jusqu'à obtenir un centrage stable
- démonter l'ensemble $D_3 + M_3$
- démonter T1 et remplacer C_1

iii. Alignement pragmatique de C_1

La caméra C_1 peut être difficile à manipuler et rendre fastidieuses à réaliser les vérifications périodiques du réglage du montage. Ce protocole présente une alternative utilisant le diaphragme D_4 et où le détecteur lui-même joue le rôle de second diaphragme.

Attention : cela implique qu'une fraction du faisceau d'excitation atteindra D_4 qui, étant très sensible, risque d'être endommagé. Il faut donc réduire autant que possible l'intensité du faisceau en plaçant une densité neutre sur le chemin optique.

Pour aligner le détecteur C_1 , procéder comme suit

- se placer en fluorescence directe en utilisant le protocole d'alignement (p. 274)
- aligner le détecteur C_2 par le protocole précédent (p. 278), en particulier en ce qui concerne M_4
- vérifier que D_3 et M_3 se trouvent à l'arrière de l'objectif L_2
- fermer D_3 et D_4 et mettre C_1 sous tension
- vérifier que C_1 ne sature pas ; le cas échéant, mettre C_1 hors tension et changer la densité neutre
- ouvrir D_3 à moitié et fermer progressivement D_4 jusqu'à mi-course
- en observant l'image donnée par C_1 , ajuster le réglage de M_6 pour centrer grossièrement le faisceau sur le détecteur
- en observant l'image donnée par C_1 , ajuster le réglage de M_5 pour centrer grossièrement le faisceau sur D_4
- fermer encore de moitié D_3 et D_4
- en observant l'image donnée par C_1 , ajuster le réglage de M_6 pour centrer grossièrement le faisceau sur le détecteur
- en observant l'image donnée par C_1 , ajuster le réglage de M_5 pour faire coïncider les centres des anneaux de diffraction dus à D_3 et D_4
- répéter les trois étapes précédentes jusqu'à coïncidence parfaite
- mettre C_1 hors tension
- retirer la densité neutre du chemin optique
- ouvrir D_4
- démonter l'ensemble $D_3 + M_3$

15 Solutions

15.1 Solution de stockage au glycérol

La composition de la solution de stockage au glycérol pour les souches bactériennes est la suivante :

glycerol	65% v/v
tampon Tris pH 8,0	25 mmol·L ⁻¹

15.2 Solution TfbIA

La composition de la solution TfbIA est la suivante :

tampon AcOK (potassium acetate) pH 6,0	30 mmol·L ⁻¹
KCl	100 mmol·L ⁻¹
CaCl ₂	10 mmol·L ⁻¹
glycerol	15% v/v
MnCl ₂ (immédiatement avant usage)	50 mmol·L ⁻¹

15.3 Solution TfbIIA

La composition de la solution TfbIIA est la suivante :

tampon MOPS pH 7,0	10 mmol·L ⁻¹
KCl	10 mmol·L ⁻¹
CaCl ₂	75 mmol·L ⁻¹
glycerol	15% v/v

15.4 Tampon TAE

La composition de la solution-stock «50×» de TAE est la suivante :

trizma base	2M (242 g·L ⁻¹)
sel disodique d'EDTA	50 mmol·L ⁻¹ (18,6 g·L ⁻¹)
acide acétique	5,75 % v/v

15.5 Tampon PP

La composition du tampon PP «1×» est la suivante :

tampon Tris pH 8,0	40 mmol·L ⁻¹
MgCl ₂	20 mmol·L ⁻¹
DTT	10 mmol·L ⁻¹
spermidine	2 mmol·L ⁻¹
NaOH ou HCl	q.s.p. pH 7,9

15.6 Tampon PP-gly

La composition du tampon PP-gly «1×» est la suivante :

tampon PP (p. 281)	95% v/v
glycerol	5% v/v

15.7 Tampon PIPES

La composition du tampon PIPES «10×» est la suivante :

PIPES	1 mol·L ⁻¹ (15,1 g·L ⁻¹)
NaCl	500 mmol·L ⁻¹ (29,0 g·L ⁻¹)
NaOH	q.s.p. pH = pK _A (PIPES) = 6,8

Le PIPES solide ne se dissout bien qu'au voisinage de pH 6,8.

15.8 Tampon HEPES

La composition du tampon HEPES «10×» est la suivante :

HEPES	500 mmol·L ⁻¹ (119,2 g·L ⁻¹)
NaCl	2 mol·L ⁻¹ (117 g·L ⁻¹)
sel tetrasodique d'EDTA	10 mmol·L ⁻¹ (4,52 g·L ⁻¹)
NaOH	q.s.p. pH = pK _A (HEPES) = 7,5

Le HEPES solide ne se dissout bien qu'au voisinage de pH 7,5.

15.9 Tampon Tris Acetate pH 7,9

Ce tampon permet de ne pas introduire d'ions chlorure dans la solution. La composition du tampon Tris Acetate pH 7,9 1 mol·L⁻¹ est la suivante :

trizma base	121,1 g·L ⁻¹
acide acetique	~ 6-8% jusqu'à pH 7,9

La dissolution du Trizma base est un peu lente, même au pH optimal. Prendre bien le temps d'agiter vigoureusement avant de rajouter de l'acide acétique.

15.10 Tampon PBS

La composition du tampon PBS (*Phosphate Buffer Saline*) «1×» est la suivante :

tampon phosphate	10 mmol·L ⁻¹ pH 7,4
NaCl	150 mmol·L ⁻¹ (8,75 g·L ⁻¹)
sel tetrasodique d'EDTA	1 mmol·L ⁻¹ (0,45 g·L ⁻¹)

15.11 Tampon de passivation PB

La composition du tampon de passivation (*Passivation Buffer*, PB) «1×» est la suivante :

tampon PBS (p. 282)	«1×»
BSA	0,2% (2 g·L ⁻¹)
F-127 (Pluronic)	0,2% (2 g·L ⁻¹)
sel tetrasodique d'EDTA	5 mmol·L ⁻¹ (2,25 g·L ⁻¹)
sodium azide	0,1% (1 g·L ⁻¹)

15.12 Tampon pour surfaces SB

La composition du tampon pour surfaces (*Surfaces Buffer*, SB) «1×» est la suivante :

tampon phosphate	10 mmol·L ⁻¹ pH 8,
BSA	1% (10 g·L ⁻¹)
F-127 (Pluronic)	1% (10 g·L ⁻¹)
sel tetrasodique d'EDTA	1 mmol·L ⁻¹ (0,45 g·L ⁻¹)
sodium azide	0,1% (1 g·L ⁻¹)

15.13 Tampon de base pour purification de protéines APB

La composition du tampon de base pour la purification de protéines (*All Purpose Buffer*, APB) est la suivante :

tampon Tris	10 mmol·L ⁻¹ pH 8
NaCl	200 mmol·L ⁻¹ (26,3 g·L ⁻¹)
sel tetrasodique d'EDTA	1 mmol·L ⁻¹ (0,45 g·L ⁻¹)

15.14 Tampon de lyse cellulaire LyB

La composition du tampon de lyse cellulaire (*Lysis Buffer*, LyB) est la suivante :

tampon Tris	10 mmol·L ⁻¹ pH 8
NaCl	200 mmol·L ⁻¹ (26,3 g·L ⁻¹)
sel tetrasodique d'EDTA	1 mmol·L ⁻¹ (0,45 g·L ⁻¹)
dithiothreitol (DTT)	1 mmol·L ⁻¹ (0,15 g·L ⁻¹)
PMSF	«1×»
Triton X-100	0.05% v/v

15.15 Tampon bas sel LSB

La composition du tampon bas sel (*Low Salt Buffer*, LSB) «1×» est la suivante :

tampon Tris pH 8,0	10 mmol·L ⁻¹ pH 8,0
BSA	0,2% (2 g·L ⁻¹)
F-127 (Pluronic)	0,2% (2 g·L ⁻¹)
sodium azide	0,1% (1 g·L ⁻¹)

15.16 Tampon TE

La composition de la solution-stock «1×» de TE est la suivante :

trizma hydrochloride	10 mmol·L ⁻¹ (1,58 g·L ⁻¹) pH 7,6
sel disodique d'EDTA	1 mmol·L ⁻¹ (0,37 g·L ⁻¹)

15.17 Tampon de transcription

La composition du tampon de transcription «10×» est la suivante :

tampon Tris acetate pH 7.9 (p. 282)	400 mmol·L ⁻¹
magnesium acetate	80 mmol·L ⁻¹ (17,2 g·L ⁻¹)
dithiothreitol (DTT)	10 mmol·L ⁻¹ (0,39 g·L ⁻¹)
sel disodique d'EDTA	1 mmol·L ⁻¹ (0,37 g·L ⁻¹)

La présence d'ions Cl⁻ a été décrite comme inhibant partiellement l'activité de la polymérase. Le tampon peut donc ensuite être supplémenté en sel en utilisant une solution

de glutamate de potassium. En plus d'augmenter la force ionique, le glutamate contribue à la passivation des surfaces. Cependant, les hautes concentrations en sel diminuent l'interaction entre la polymérase et l'ADN et augmentent le taux de dissociation du complexe, ce qui n'est pas souhaitable.

15.18 Tampon pour FtsK

La composition du tampon pour FtsK «1×» est la suivante :

trizma hydrochloride 10 mmol·L⁻¹ (1,58 g·L⁻¹) pH 7,6

NaCl 50 mmol·L⁻¹ (2,9 g·L⁻¹)

MgCl₂ 1 mmol·L⁻¹

BSA 0,2% (2 g·L⁻¹)

sodium azide 0,1% (1 g·L⁻¹)

La concentration en MgCl₂ peut être adaptée selon l'activité de la protéine et la concentration de chélatants (typiquement l'ATP).

16 Calculs, détails et précisions

Ce chapitre présente de manière détaillée les éléments qui ont été présentés dans le corps du manuscrit, mais de manière plus légère afin de ne pas alourdir la lecture.

16.1 Etude des phases de l'ADN

Dans le régime d'étude des molécules uniques, nous nous sommes placés dans des conditions de force et d'ions telles que c'est la phase **B** de l'ADN qui est observée. Cependant, sous l'effet de la torsion, de nouvelles phases sont susceptibles de se former, en particulier une phase *plectonémique* et une phase *dénaturée*.

16.1.1 Description

Phase B

Sous l'effet d'une contrainte de torsion $\sigma = \frac{p}{2\pi} \frac{\theta}{L_0}$, un tube rigide de longueur de contour L_0 accumule de la torsion. Cela contribue à un terme supplémentaire dans l'énergie libre égal à

$$\Delta E = \frac{4\pi^2 k_B T L_0}{p^2} \cdot C_B \sigma^2 \quad (16.1)$$

La valeur expérimentale du module de torsion C_B de l'ADN est une question encore partiellement ouverte (pour une discussion, se reporter à (Mosconi 2009)) mais des arguments théoriques et expérimentaux donnent un ordre de grandeur de 100 nm.

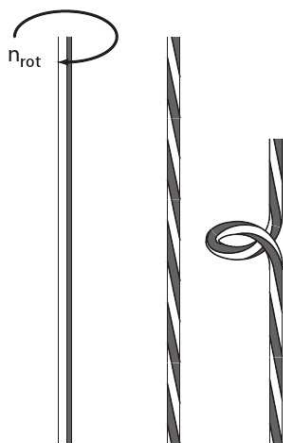


FIG. 16.1: La torsion d'un tube rigide (gauche) engendre d'abord l'accumulation de contraintes réparties (centre). A partir d'un certain seuil, le tube flambe et forme des plectonèmes (droite).

Par ailleurs, sous l'effet de la torsion, la structure de la double hélice est légèrement déformée, conduisant à un changement de longueur de la molécule. Cela s'exprime dans

l'énergie par un couplage prenant la forme

$$\Delta E = \frac{4\pi^2 k_B T L_0}{p^2} \cdot 2D_B \sigma \epsilon \quad (16.2)$$

On appelle D_B la constante de *couplage twist-stretch* de la molécule. Pour la phase **B** de l'ADN, il a été montré qu'elle est de l'ordre de grandeur de -10 nm (Lionnet 2006b; Gore 2006).

$$E_B = \frac{4\pi^2 k_B T L_0}{p^2} (B_B \epsilon^2 + C_B \sigma^2 + 2D_B \sigma \epsilon) - F L_0 \epsilon \quad (16.3)$$

L'énergie totale (eq. 16.3) est minimale à torsion σ fixée lorsque

$$\epsilon = -\frac{D_B}{B_B} \sigma + \epsilon_0 \sim +0.12\sigma + \epsilon_0 \quad (16.4)$$

ce qui correspond à un allongement d'environ 0.4 nm par tour.

Phase T

Au-delà d'une certaine contrainte de torsion, le tube est instable vis-à-vis d'une contrainte de flexion latérale ce qui conduit à une déformation appelée flambage (*buckling*). L'axe du tube s'enroule alors sur lui-même pour former des structures bouclées appelées *plectonèmes* ou torsades.

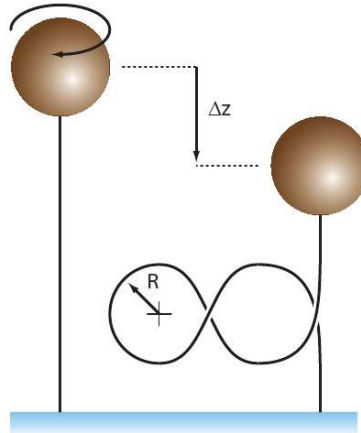


FIG. 16.2: La contrainte de torsion peut engendrer des boucles de plectonèmes qui emmagasinent de l'énergie sous forme de contrainte de flexion et engendrent également un raccourcissement apparent de la molécule.

Une description continue des plectonèmes existe mais nous allons rappeler ici un modèle plus intuitif. Nous considérons que n_T boucles de plectonèmes ont été formées, chacune de rayon de courbure R . Par extensivité, cette contrainte de flexion locale γ s'intègre pour donner une contribution à l'énergie totale

$$\Delta E = k_B T \int G \gamma^2 ds = k_B T G \frac{2\pi R n_T}{R^2} = \frac{4\pi^2 k_B T L_0}{p^2} \cdot G \frac{n_T p^2}{2\pi L_0 R} \quad (16.5)$$

La formation de plectonèmes s'accompagne également d'un raccourcissement $-2\pi R \frac{n_T}{L_0}$. En introduisant $\sigma = p \frac{n_T}{L_0}$ l'énergie s'écrit (en négligeant la constante de *twist-stretch* à

l'échelle des plectonèmes)

$$E_T = \frac{4\pi^2 k_B T L_0}{p^2} \left(B_T \epsilon^2 + C_T \sigma^2 + G \frac{p}{2\pi R} \sigma \right) - F L_0 \left(\epsilon - \frac{2\pi R}{p} \sigma \right) \quad (16.6)$$

Nous en déduisons le rayon de courbure qui minimise l'énergie

$$R = \sqrt{\frac{k_B T G}{F}} \quad (16.7)$$

L'énergie minimale s'exprime par conséquent comme

$$\begin{aligned} E_T &= \frac{4\pi^2 k_B T L_0}{p^2} \left(B_T \epsilon^2 + C_T \sigma^2 + G \frac{p}{2\pi} \sqrt{\frac{F}{k_B T G}} \sigma \right) - F L_0 \left(\epsilon - \frac{2\pi}{p} \sqrt{\frac{k_B T G}{F}} \sigma \right) \\ &= \left[\frac{4\pi^2 k_B T L_0}{p^2} (B_T \epsilon^2 + C_T \sigma^2) - F L_0 \epsilon \right] + 2 \frac{2\pi L_0}{p} \sqrt{k_B T G F} \sigma \end{aligned} \quad (16.8)$$

Phase D

Nous n'avons jusqu'à présent pas tenu compte du caractère chiral de l'ADN. L'hélicité naturelle *droite* de la molécule impose que le comportement sous contrainte de torsion $\sigma < 0$ (c'est à dire contre l'hélicité) n'est pas simplement symétrique au comportement sous torsion $\sigma > 0$ (c'est à dire dans le même sens que l'hélicité).

Energie de dénaturation Sous contrainte de torsion $\sigma < 0$, le déroulement de l'hélice déstabilise l'appariement des bases, qui peuvent donc produire localement une *bulle de dénaturation* de n_D pas hélicaux. Cette opération a un coût énergétique (en introduisant $\sigma = p n_D / L_0$)

$$\Delta E = -n_D \eta_D = -\sigma \frac{L_0 \eta_D}{p} \quad (16.10)$$

Termes de traction Par analogie avec les équations précédentes, les termes de traction s'expriment comme

$$\Delta E = \frac{4\pi^2 k_B T L_0}{p^2} \cdot B_D \epsilon^2 - F L_0 \epsilon \quad (16.11)$$

Energie totale Enfin la bulle de dénaturation, formée de deux ADN simple brins s'enroulant l'un autour de l'autre, possède également un module de torsion. L'énergie totale s'exprime par conséquent en négligeant le *twist-stretch* comme

$$E_D = \frac{4\pi^2 k_B T L_0}{p^2} (B_D \epsilon^2 + C_D \sigma^2) - F L_0 \epsilon - \sigma \frac{L_0 \eta_D}{p} \quad (16.12)$$

16.1.2 Transition en torsion à basse force

Torsion critique

A force nulle et torsion nulle, la phase la plus stable est expérimentalement la phase **B**. L'imposition d'une contrainte de torsion σ se traduit par une augmentation de l'énergie $\partial E / \partial \sigma(\sigma)$. A partir d'une certaine valeur de σ , $\partial E_T / \partial \sigma$ devient plus petit que $\partial E_B / \partial \sigma$ et une transition de phase à lieu avec formation de plectonèmes.

En effet, en utilisant également le résultat (16.12)

$$\frac{\partial E_B}{\partial \sigma} = \frac{4\pi^2 k_B T L_0}{p^2} (2C_B \sigma + 2D_B \epsilon) \quad (16.13)$$

$$= \frac{8\pi^2 k_B T L_0}{p^2} \left(1 - \frac{D_B}{B_B}\right) C_B \sigma + F L_0 \frac{D_B}{B_B} \quad (16.14)$$

Parallèlement,

$$\frac{\partial E_T}{\partial \sigma} = \frac{4\pi^2 k_B T L_0}{p^2} 2C_T \sigma + 2 \frac{2\pi L_0}{p} \sqrt{k_B T G F} \quad (16.15)$$

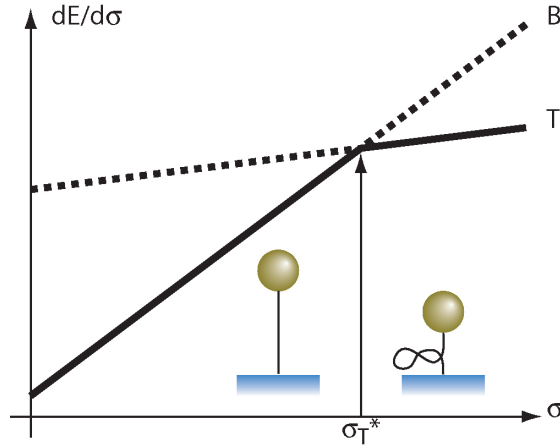


FIG. 16.3: Graphe de la variation d'énergie $\partial R/\partial \sigma$ pour la phase **B** et la phase **T** de l'ADN. La torsion critique σ_T^* signale l'apparition dans la phase **B** d'une phase **T**.

Expérimentalement, $C_T \ll C_B$, ce qui implique que la variation d'énergie associée à la torsion dans la phase plectonémique est presque constante. Symétriquement, D_B/B_B est négligeable par rapport au terme constant de la phase **T**. Par conséquent, on confirme la stabilité de la phase **B** à $\sigma = 0$ et l'existence de la transition de flambage pour

$$\sigma_T^* = \frac{p}{2\pi} \sqrt{\frac{GF}{k_B T C_B^2}} \quad (16.16)$$

Pour des forces de l'ordre de 0.1 pN, σ_T^* est de l'ordre de 10^{-2} , ce qui est relativement petit. Pour une molécule d'un micron de longueur de contour, cela correspond à imposer environ 3 tours pour obtenir la première boucle de plectonème.

Courbe extension-torsion Dans le domaine de la phase **B**, l'extension z/L_0 se réduit à la traction ϵ . On la calcule en minimisant l'énergie par rapport à la traction $\partial E_B/\partial \epsilon = 0$ ce qui conduit à

$$\frac{z}{L_0} = \frac{F p^2}{8\pi^2 k_B T B_B} - \frac{D_B}{B_B} \sigma \quad (16.17)$$

L'effet du *twist-stretch* étant faible, l'extension est essentiellement constante. Ce modèle donne une valeur explicite de l'extension à rotation nulle. Bien que cette expression capture correctement le comportement en fonction de la force et de la température, des modèles plus raffinés comme le modèle du ver doivent être préférés à torsion nulle.

Dans le domaine de la phase **T**, l'extension z/L_0 dépend également du nombre de boucles de plectonèmes formés. En reprenant l'expression de l'équation (16.8), on a

$$\frac{z}{L_0} = \epsilon - \frac{2\pi}{p} \sqrt{\frac{k_B T G}{F}} \sigma \quad (16.18)$$

En minimisant dans l'équation (16.8) l'énergie E_T par rapport à la traction ϵ , on obtient

$$\epsilon = \frac{F p^2}{8\pi^2 k_B T B_T} \quad (16.19)$$

Par conséquent

$$\frac{z}{L_0} = \frac{F p^2}{8\pi^2 k_B T B_T} - \frac{2\pi}{p} \sqrt{\frac{k_B T G}{F}} (\sigma - \sigma_T^*) \quad (16.20)$$

Dans la mesure où l'ADN dans la phase **T** n'est pas localement très différent de celui dans la phase **B**, les modules de traction B_T et B_B sont très voisins. La transition $B \rightarrow T$ se manifeste donc simplement par un décrochement de pente à $\sigma = \sigma^*$ passant d'une extension constante à une extension décroissant linéairement avec σ de pente de l'ordre de 40-60 nm/tour. Cette pente décroît avec la force.

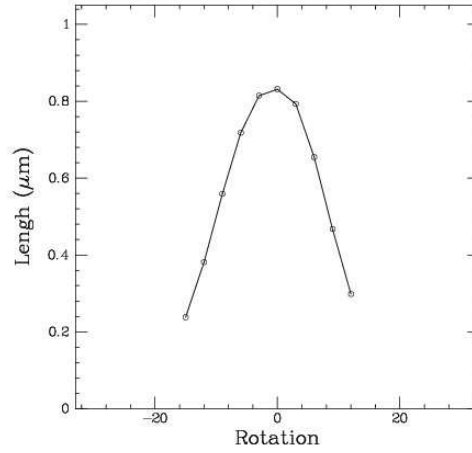


FIG. 16.4: Courbe extension-torsion expérimentale, correspondant à la formation de plectonèmes dans un ADN de longueur de contour $L = 1.2 \mu\text{m}$.

16.1.3 Transition en torsion à haute force

Torsion critique

A torsion nulle, la phase la plus stable est expérimentalement la phase **B**. L'imposition d'une contrainte de torsion $\sigma < 0$ se traduit par une augmentation de l'énergie $\partial E/\partial\sigma(\sigma)$. A partir d'une certaine valeur de σ , $\partial E_D/\partial\sigma$ devient plus petit que $\partial E_B/\partial\sigma$ et une transition de phase a lieu avec formation de bulles de dénaturation.

On rappelle que

$$\frac{\partial E_B}{\partial\sigma} = \frac{8\pi^2 k_B T L_0}{p^2} C_{B\sigma} + F L_0 \frac{D_B}{B_B} \quad (16.21)$$

De plus,

$$\frac{\partial E_D}{\partial\sigma} = \frac{8\pi^2 k_B T L_0}{p^2} C_{D\sigma} - \frac{L_0 \eta_D}{p} \quad (16.22)$$

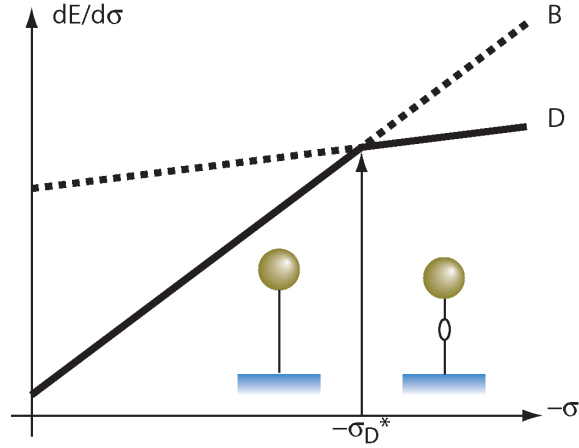


FIG. 16.5: Graphe de la variation d'énergie $\partial R/\partial\sigma$ pour la phase **B** et la phase **D** de l'ADN. La torsion critique σ_D^* signale l'apparition dans la phase **B** d'une phase **D** correspondant à la dénaturation de l'ADN.

Il est évident que le module de torsion $C_D \ll C_B$, ce qui implique que la variation d'énergie associée à la torsion dans la phase dénaturée est presque constante. Symétriquement, D_B/B_B est négligeable par rapport au terme constant de la phase **D**. Par conséquent, on confirme la stabilité de la phase **B** à $\sigma = 0$ et l'existence de la transition de dénaturation pour

$$\sigma_D^* = -\frac{\eta_{DP}}{8\pi^2 k_B T C_B} \quad (16.23)$$

Expérimentalement, σ_D^* est de l'ordre de -3%. Pour une molécule d'un micron de longueur de contour, cela correspond à imposer environ -9 tours pour ouvrir une boucle de dénaturation.

Pour $\sigma > 0$, la phase **D** n'est jamais la plus stable. La compétition se fait entre phase **B** et phase **T** ; par conséquent, on observe la même transition de flambage à σ_T^* .

Courbe extension-torsion Dans le domaine de la phase **B**, on a toujours

$$\frac{z}{L_0} = \frac{Fp^2}{8\pi^2 k_B T B_B} \quad (16.24)$$

Dans le domaine de la phase **D**, l'extension z/L_0 dépend de la fraction d'ADN dénaturé

$$\frac{z}{L_0} = \sigma\epsilon_D + (1 - \sigma)\epsilon_B \quad (16.25)$$

$$= (\sigma - \sigma_D^*)(\epsilon_D - \epsilon_B) + \epsilon_B \quad (16.26)$$

En utilisant l'équation (4.8)

$$\frac{z}{L_0} = \frac{Fp^2}{8\pi^2 k_B T} \left[\left(\frac{1}{B_D} - \frac{1}{B_B} \right) (\sigma - \sigma_D^*) + \frac{1}{B_B} \right] \quad (16.27)$$

L'extension est une fonction croissante de $\sigma < 0$. Pour $\sigma > 0$, on retrouve le comportement de la phase **T**.

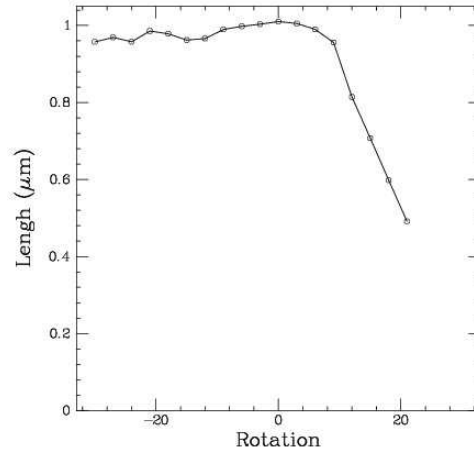


FIG. 16.6: Courbe extension-torsion expérimentale, correspondant à la formation de bulles de dénaturation dans un ADN de longueur de contour $L = 1.2 \mu\text{m}$.

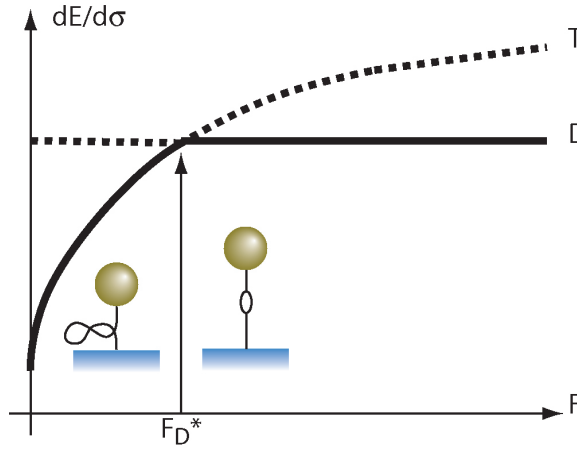


FIG. 16.7: Graphe de la variation d'énergie $\partial E/\partial\sigma$ pour la phase **T** et la phase **D** de l'ADN en fonction de la force. La force critique F_D^* signale la frontière entre la phase **T** et la phase **D**.

16.1.4 Transition en force à torsion négative

Les variations d'énergie $\partial E_T/\partial\sigma$ et $\partial E_D/\partial\sigma$ ne dépendent pas de σ . Par conséquent, aucune transition en torsion entre les deux n'est possible. En revanche, elles dépendent de la force et, pour $\sigma < 0$, une transition de phase $T \rightarrow D$ est possible.

En effet, d'après les équations (16.15) et (16.22), la phase **T** est la plus stable en dessous d'une force critique F_D^* au-dessus de laquelle la phase **D** apparaît

$$F_D^* = \frac{\eta_D^2}{16\pi^2 k_B T G} \quad (16.28)$$

La force critique de dénaturation est de l'ordre de 0.4 pN. On remarque qu'elle correspond d'ailleurs à l'intersection de $\sigma_T^*(F)$ et de σ_D^* .

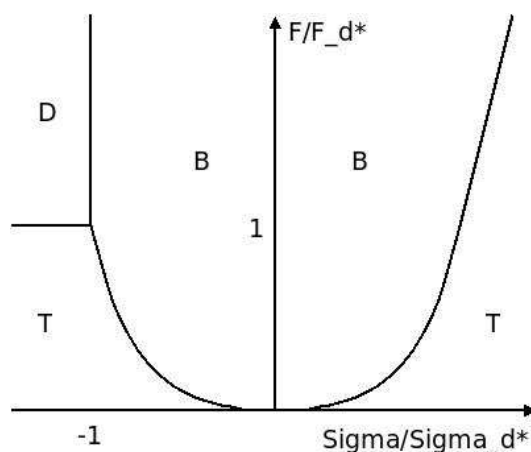


FIG. 16.8: Diagramme de phase de l'ADN au voisinage de la transition de dénaturation. En coordonnées réduites, l'équation de la transition de flambage est simplement $\sigma_T^*/\sigma_D^* = \sqrt{F/F_D^*}$. La phase **B** désigne l'ADN linéaire sous sa forme la plus stable à force nulle, la phase **T** les tresses de plectonèmes et la phase **D** les bulles de dénaturation.

16.2 Physique du montage

16.2.1 Mesure de la force magnétique (dans l'espace direct)

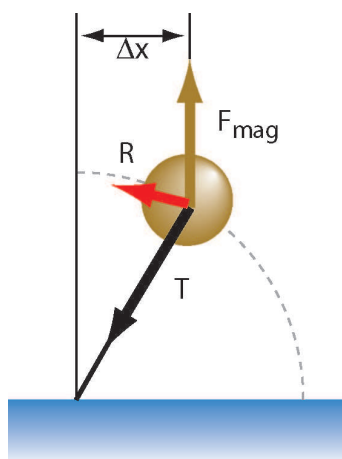


FIG. 16.9: La bille magnétique est placée dans un champ de force constante F_{mag} . Une fluctuation l'amène à se déplacer le long d'un arc de cercle de rayon L dans la direction x . Le bilan de la force magnétique et de la tension T est une force résultante R . Pour les petites déflexions $\Delta x \ll L$, la résultante est presque horizontale et est équivalente à une force de rappel proportionnelle à Δx .

Pour simplifier, nous considérons une surface définissant un plan (x, y) . Une molécule d'ADN est accrochée à une de ses extrémités à la position $(0, 0)$. À son autre extrémité, un opérateur exerce une force selon la direction z . Le vecteur reliant les extrémités de la molécule d'ADN est ainsi défini par le jeu de coordonnées $(x - 0, y - 0, z - 0)$.

Sous l'effet du mouvement brownien, l'ADN fluctue et les coordonnées (x, y, z) décrivent une distribution aléatoire au cours du temps. Cependant par symétrie, les valeurs moyennes $\langle x \rangle$ et $\langle y \rangle$ sont nécessairement nulles. L'extension moyenne $\langle z \rangle$ est égale à celle déterminée

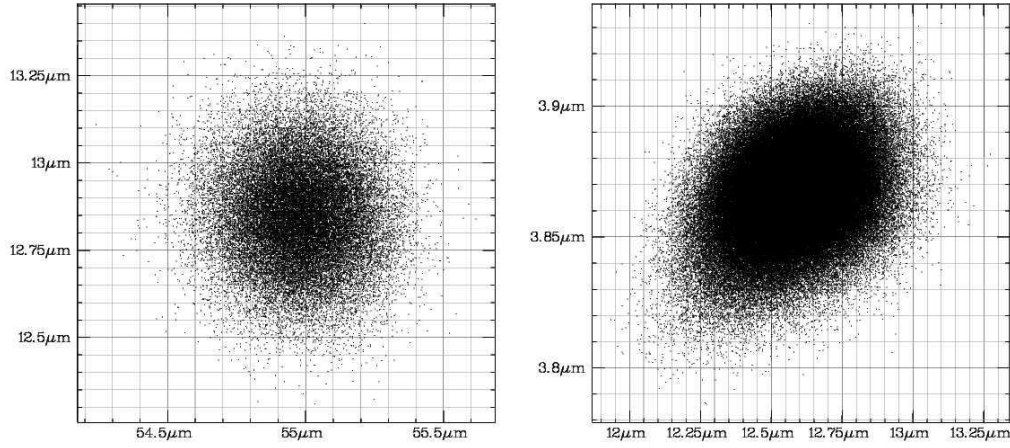


FIG. 16.10: Fluctuations de position (x, y, z) d'une bille magnétique (correspondant à la situation de la figure 3.8). [G] Fluctuations dans le plan transverse (x, y) . [D] Fluctuations dans le plan perpendiculaire aux lignes de champ (y, z) . Une dérive de z aux temps longs est observable ici.

dans la section 4.1 p.75.

Lorsqu'une fluctuation amène la molécule dans une configuration légèrement inclinée (cf. Fig 16.9 p. 292), le bilan des forces fait apparaître une force de rappel transverse

$$\vec{F}_\perp = -F \sin \alpha \vec{u}_r \quad (16.29)$$

Dans la limite des petites fluctuations et en introduisant L , la longueur de contour de la molécule, le module de la force transverse se réduit à

$$F_\perp = \frac{F}{L} \Delta r_\perp \quad (16.30)$$

Alors que, dans la direction de la force, le potentiel E_\parallel est décrit p.75, l'extrémité de l'ADN fluctue donc dans le plan transverse dans un potentiel localement assimilable à un puits élastique ^[1]

$$E_\perp = \frac{F}{2L} r_\perp^2 \quad (16.31)$$

Comme il n'y a pas de couplage entre les variables d'espace (x, y, z) , le théorème d'équipartition de l'énergie conduit à l'expression suivante

$$F = \frac{\langle z \rangle k_B T}{\langle \Delta r_\perp^2 \rangle} \quad (16.32)$$

Toutes ces quantités sont mesurables sans calibration et la force peut ainsi être déterminée sans hypothèse additionnelle.

16.2.2 Mesure de la force magnétique (dans l'espace réciproque)

En réalité, la mesure de la force n'est pas exactement effectuée comme décrit précédemment.

¹Sans rentrer dans les détails, les raideurs transverses, selon la direction de \vec{B}_\perp et la direction $\vec{F} \times \vec{B}_\perp$, diffèrent en fait d'un facteur géométrique. Nous raisonnons ici implicitement sur la direction $\vec{F} \times \vec{B}_\perp$.

Pour repérer l'extrémité de l'ADN, ainsi que pour exercer une force, celle-ci porte une bille de rayon R . La projection dans le plan transverse de l'équation du mouvement conduit à

$$m\partial_t^2 r = F_L(t) - k_\perp r - 6\pi\eta R\partial_t r \quad (16.33)$$

On reconnaît dans ces termes le terme inertiel, la force de LANGEVIN, la force de rappel transverse et la force de friction visqueuse. A l'échelle de la taille de la bille (quelques microns), les termes inertiels sont négligeables et la transformée de FOURIER de l'équation (16.33) s'écrit

$$\bar{r}(\omega) = \frac{\overline{F_L}(\omega)}{k_\perp} \cdot \frac{1}{1 + i\frac{\omega}{\omega_c}} \quad (16.34)$$

On reconnaît un filtre passe-bas de fréquence de coupure

$$\omega_c = \frac{k_\perp}{6\pi\eta R} \quad (16.35)$$

Le spectre de puissance des fluctuations latérales s'écrit donc

$$|\bar{r}|^2(\omega) = \frac{|\overline{F_L}|^2(\omega)}{k_\perp^2} \cdot \frac{1}{1 + \frac{\omega^2}{\omega_c^2}} \quad (16.36)$$

Le théorème de PARSEVAL appliqué à l'équation (16.36) montre que la variance des fluctuations transverses est égale à l'intégrale du spectre de puissance de ces fluctuations, c'est à dire

$$\langle r^2 \rangle = \int_0^\infty |\bar{r}|^2(\omega) d\omega = \frac{|\overline{F_L}|^2}{k_\perp^2} \omega_c \cdot \int_0^\infty \frac{d\frac{\omega}{\omega_c}}{1 + \frac{\omega^2}{\omega_c^2}} \quad (16.37)$$

Par ailleurs, d'après le théorème d'équipartition de l'énergie, cette variance est également égale à

$$\langle r^2 \rangle = \frac{k_B T}{k_\perp} \quad (16.38)$$

Par conséquent, à condition de pouvoir observer le spectre de puissance des fluctuations *au moins jusqu'à* $\approx 2\omega_c$, on peut mesurer directement la raideur du piège k_\perp (et donc la force $F = k_\perp \langle z \rangle$) par la relation

$$k_\perp = \frac{k_B T}{\int_0^\infty |\bar{r}|^2(\omega) d\omega} = \frac{2k_B T}{\pi |\bar{r}|^2(0) \cdot \omega_c} \quad (16.39)$$

16.2.3 Statistique de photons - Détecteur CCD

Statistique de photons

Nous nous proposons de retrouver un résultat classique sur la statistique de photons non corrélés. Nous considérons un unique pixel du détecteur ; on découpe le temps d'acquisition d'une image T en $T/\Delta t$ tranches suffisamment petites pour qu'au maximum un photon atteigne le pixel dans cette tranche. En notant P la probabilité par unité de temps de recevoir un photon, la probabilité $P(N, T)$ de recevoir N photons pendant le temps d'acquisition T vaut

$$P(N, T) = (P\Delta t)^N (1 - P\Delta t)^{T/\Delta t - N} C_{T/\Delta t}^N \quad (16.40)$$

Pour $T/\Delta t \gg N \gg 1$, l'approximation de STIRLING donne

$$\ln C_{T/\Delta t}^N \sim \frac{T}{\Delta t} \ln \frac{T}{\Delta t} - N \ln N - \left(\frac{T}{\Delta t} - N \right) \ln \left(\frac{T}{\Delta t} - N \right) \quad (16.41)$$

Pour les besoins de la démonstration, on introduit un changement de variable $N = T/2\Delta t - Q$ qui va symétriser l'expression précédente. Les termes en $T/\Delta t$ sont regroupés d'un côté et les termes en Q de l'autre.

$$\begin{aligned} \ln C_{T/\Delta t}^N &\sim \frac{T}{\Delta t} \ln \frac{T}{\Delta t} - \left(\frac{T}{2\Delta t} - Q \right) \ln \left(\frac{T}{2\Delta t} - Q \right) - \left(\frac{T}{2\Delta t} + Q \right) \ln \left(\frac{T}{2\Delta t} + Q \right) \\ &\sim \frac{T}{\Delta t} \ln \frac{1}{\sqrt{1 - \frac{4Q^2\Delta t^2}{T^2}}} - Q \ln \frac{1 + \frac{2Q\Delta t}{T}}{1 - \frac{2Q\Delta t}{T}} \end{aligned} \quad (16.42)$$

$$\sim \frac{T}{\Delta t} \ln \frac{1}{\sqrt{1 - \frac{4Q^2\Delta t^2}{T^2}}} - Q \ln \frac{1 + \frac{2Q\Delta t}{T}}{1 - \frac{2Q\Delta t}{T}} \quad (16.43)$$

Dans la limite des illuminations moyennes ($Q \ll T/2\Delta t$), cette expression est équivalente à une forme très simple

$$\ln C_{T/\Delta t}^N \sim \frac{T}{\Delta t} \cdot \left(\frac{1}{2} \cdot \frac{4Q^2\Delta t^2}{T^2} \right) - Q \cdot \frac{4Q\Delta t}{T} \quad (16.44)$$

$$\sim -\frac{2Q^2\Delta t}{T} \quad (16.45)$$

L'expression complète de la probabilité $P(N, T)$ est donc équivalente à

$$\ln P(N, T) \sim \left(\frac{T}{2\Delta t} - Q \right) \ln(P\Delta t) + \left(\frac{T}{2\Delta t} + Q \right) \ln(1 - P\Delta t) - \frac{2Q^2\Delta t}{T} \quad (16.46)$$

$$\sim K(T) - Q \ln \frac{1 - P\Delta t}{P\Delta t} - \frac{2Q^2\Delta t}{T} \quad (16.47)$$

$$\sim -\frac{\left(Q - \frac{T}{4\Delta t} \ln \frac{1 - P\Delta t}{P\Delta t} \right)^2}{2 \frac{T}{4\Delta t}} + K'(T) \quad (16.48)$$

Enfin, en revenant à la variable physique $N = T/2\Delta t - Q$, on a (les moyennes sont temporelles)

$$\ln P(N, T) \sim -\frac{\left[N - \frac{T}{4\Delta t} \left(2 - \ln \frac{1 - P\Delta t}{P\Delta t} \right) \right]^2}{2 \frac{T}{4\Delta t}} + K'(T) = -\frac{[N - \langle N \rangle]^2}{2\sigma_N^2} + K'(T) \quad (16.49)$$

Nous avons donc retrouvé que pour chaque pixel, on a la relation

$$\frac{\langle N \rangle}{\sigma_N^2} = 2 - \ln \frac{1 - P\Delta t}{P\Delta t} \quad (16.50)$$

Relation avec le détecteur

L'équation 16.50 montre que, à partir de la statistique de photons, nous pouvons mesurer la valeur de P sur chaque pixel. Les conditions d'éclairage varient d'un pixel à l'autre, mais nous nous attendons globalement à $P \propto \langle N \rangle$. Effectivement, on peut réécrire le terme $P\Delta t = P \cdot T \cdot (\Delta t/T)$ en utilisant l'équation 16.49, on a

$$P\Delta t = P \cdot T \cdot \frac{1}{4\sigma_N^2} \quad (16.51)$$

$$= \frac{\langle N \rangle}{4\sigma_N^2} \quad (16.52)$$

Combinée à l'équation 16.50, cette seconde relation ferme le système et impose que $x = \sigma_N^2 / \langle N \rangle$ vérifie l'équation $2x - x \ln(4x - 1) - 1 = 0$. Cette équation possède une unique solution $x = 1/2$. Par conséquent, la quantité $\sigma_N^2 / \langle N \rangle$ est *universelle* et vaut

$$\frac{\sigma_N^2}{\langle N \rangle} = \frac{1}{2} \quad (16.53)$$

Expérimentalement, chaque pixel mesure en fait un signal $S = \rho N$ proportionnel au nombre de photons. La statistique de S est semblable à celle de N à ceci près que

$$\frac{\sigma_S^2}{\langle S \rangle} = \frac{\rho^2}{\rho} \frac{\sigma_N^2}{\langle N \rangle} = \frac{\rho}{2} \quad (16.54)$$

Par conséquent, il est très facile de mesurer la sensibilité ρ du détecteur par cette méthode. Une fois cette calibration effectuée, le nombre de photons mesurés par chaque pixel pourra donc être directement mesuré.

Bibliographie

- [Aathavan 2009] K. Aathavan, Adam T. Politzer, Ariel Kaplan, Jeffrey R. Moffitt, Yann R. Chemla, Shelley Grimes, Paul J. Jardine, Dwight L. Anderson & Carlos Bustamante. *Substrate interactions and promiscuity in a viral DNA packaging motor*. Nature, vol. 461, no. 7264, page 669, 2009.
- [Abbondanzieri 2005a] Elio A Abbondanzieri, William J Greenleaf, Joshua W Shaevitz, Robert Landick & Steven M Block. *Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase*. Nature, vol. 438, no. 7067, pages 460–5, 2005.
- [Abbondanzieri 2005b] Elio A Abbondanzieri, Joshua W Shaevitz & Steven M Block. *Picocalorimetry of transcription by RNA polymerase*. Biophys. J., vol. 89, no. 6, pages L61–3, 2005.
- [Adachi 2000] K Adachi, R Yasuda, H Noji, H Itoh, Y Harada, M Yoshida & K Kinosita. *Stepping rotation of F1-ATPase visualized through angle-resolved single-fluorophore imaging*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 97, no. 13, pages 7243–7, 2000.
- [Alivisatos 2004] Paul Alivisatos. *The use of nanocrystals in biological detection*. Nat. Biotechnol., vol. 22, no. 1, pages 47–52, 2004.
- [Allemand 2009] Jean-Francois Allemand & Berenike Maier. *Bacterial translocation motors investigated by single molecule techniques*. FEMS Microbiol. Rev., vol. 33, no. 3, pages 593–610, 2009.
- [Amblard 1996] F Amblard, AC Maggs, B Yurke, A Pargellis & S Leibler. *Subdiffusion and Anomalous Local Viscoelasticity in Actin Networks*. Phys. Rev. Lett., vol. 77, no. 21, pages 4470–4473, 1996.
- [Aussel 2002] L. Aussel, FX. Barre, M. Aroyo, A. Stasiak, AZ. Stasiak & D. Sherratt. *FtsK Is a DNA Motor Protein that Activates Chromosome Dimer Resolution by Switching the Catalytic State of the XerC and XerD Recombinases*. Cell, vol. 108, pages 195–205, 2002.
- [Bailey 2007] Scott Bailey, William K Eliason & Thomas A Steitz. *Structure of hexameric DnaB helicase and its complex with a domain of DnaG primase*. Science, vol. 318, no. 5849, pages 459–63, 2007.
- [Barre 2000] F X Barre, M Aroyo, S D Colloms, A Helfrich, F Cornet & D J Sherratt. *FtsK functions in the processing of a Holliday junction intermediate during bacterial chromosome segregation*. Genes Dev., vol. 14, no. 23, pages 2976–88, 2000.

- [Bates 2007] Mark Bates, Bo Huang, Graham T Dempsey & Xiaowei Zhuang. *Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes*. Science, vol. 317, no. 5845, pages 1749–53, 2007.
- [Begg 1995] K J Begg, S J Dewar & W D Donachie. *A new Escherichia coli cell division gene, ftsK*. J. Bacteriol., vol. 177, no. 21, pages 6211–22, 1995.
- [Bensimon 1998] D. Bensimon, D. Dohmi & M. Mezard. *Stretching a heteropolymer*. Europhysics Letters, vol. 42, no. 1, pages 97–102, 1998.
- [Berg-Sørensen 2004] Kirstine Berg-Sørensen & Henrik Flyvbjerg. *Power spectrum analysis for optical tweezers*. Review of Scientific Instruments, vol. 75, no. 3, page 594, 2004.
- [Betzig 2006] Eric Betzig, George H Patterson, Rachid Sougrat, O Wolf Lindwasser, Scott Olenych, Juan S Bonifacino, Michael W Davidson, Jennifer Lippincott-Schwartz & Harald F Hess. *Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution*. Science, vol. 313, no. 5793, pages 1642–5, 2006.
- [Biebricher 2009] Andreas Biebricher, Wolfgang Wende, Christophe Escudé, Alfred Pingoud & Pierre Desbiolles. *Tracking of single quantum dot labeled EcoRV sliding along DNA manipulated by double optical tweezers*. Biophys. J., vol. 96, no. 8, pages L50–2, 2009.
- [Bigot 2004] Sarah Bigot, Jacqueline Corre, Jean-Michel Louarn, François Cornet & François-Xavier Barre. *FtsK activities in Xer recombination, DNA mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein*. Mol. Microbiol., vol. 54, no. 4, pages 876–86, 2004.
- [Bigot 2005] Sarah Bigot, Omar A Saleh, Christian Lesterlin, Carine Pages, Meriem El Karoui, Cynthia Dennis, Mikhail Grigoriev, Jean-François Allemand, François-Xavier Barre & François Cornet. *KOPS : DNA motifs that control E. coli chromosome segregation by orienting the FtsK translocase*. EMBO J., vol. 24, no. 21, pages 3770–80, 2005.
- [Bigot 2006] Sarah Bigot, Omar A Saleh, François Cornet, Jean-François Allemand & François-Xavier Barre. *Oriented loading of FtsK on KOPS*. Nat. Struct. Mol. Biol., vol. 13, no. 11, pages 1026–8, 2006.
- [Binnig 1986] G Binnig, CF Quate & C Gerber. *Atomic force microscope*. Phys. Rev. Lett., vol. 56, no. 9, pages 930–933, 1986.
- [Bonneau 2005] Stéphane Bonneau, Maxime Dahan & Laurent D Cohen. *Single quantum dot tracking based on perceptual grouping using minimal paths in a spatiotemporal volume*. IEEE transactions on image processing : a publication of the IEEE Signal Processing Society, vol. 14, no. 9, pages 1384–95, 2005.

- [Bouchiat 1999] C Bouchiat, M D Wang, J Allemand, T Strick, S M Block & V Croquette. *Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements*. Biophys. J., vol. 76, no. 1 Pt 1, pages 409–13, 1999.
- [Brooks 1985] B Brooks & M Karplus. *Normal modes for specific motions of macromolecules : application to the hinge-bending mode of lysozyme*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 82, no. 15, pages 4995–9, 1985.
- [Brünger 1985] A T Brünger, C L Brooks & M Karplus. *Active site dynamics of ribonuclease*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 82, no. 24, pages 8458–62, 1985.
- [Buiteveld 1994] H. Buiteveld, J. M. H. Hakvoort & M. Donze. *The optical properties of pure water*. In J. S. Jaffe, editeur, SPIE Proceedings on Ocean Optics XII, volume 2258, pages 174–183, 1994.
- [Busoni 2005] Lorenzo Busoni, Aure*lie Dornier, Jean-Louis Viovy, Jacques Prost & Giovanni Cappello. *Fast subnanometer particle localization by traveling-wave tracking*. Journal of Applied Physics, vol. 98, no. 6, page 064302, 2005.
- [Cabezón 2006] Elena Cabezón & Fernando de la Cruz. *TrwB : an F(1)-ATPase-like molecular motor involved in DNA transport during bacterial conjugation*. Res. Microbiol., vol. 157, no. 4, pages 299–305, 2006.
- [Cappello 2007] Giovanni Cappello, Paolo Pierobon, Clémentine Symonds, Lorenzo Busoni, J Christof M Gebhardt, Matthias Rief & Jacques Prost. *Myosin V stepping mechanism*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 104, no. 39, pages 15328–33, 2007.
- [Charier 2004] Sandrine Charier, Odile Ruel, Jean-Bernard Baudin, Damien Alcor, Jean-François Allemand, Adrien Meglio & Ludovic Jullien. *An efficient fluorescent probe for ratiometric pH measurements in aqueous solutions*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., vol. 43, no. 36, pages 4785–8, 2004.
- [Charier 2005] Sandrine Charier, Adrien Meglio, Damien Alcor, Emmanuelle Cogné-Laage, Jean-François Allemand, Ludovic Jullien & Annie Lemarchand. *Reactant concentrations from fluorescence correlation spectroscopy with tailored fluorescent probes. An example of local calibration-free pH measurement*. J. Am. Chem. Soc., vol. 127, no. 44, pages 15491–505, 2005.
- [Cheetham 1999a] G M Cheetham, D Jeruzalmi & T A Steitz. *Structural basis for initiation of transcription from an RNA polymerase-promoter complex*. Nature, vol. 399, no. 6731, pages 80–3, 1999.
- [Cheetham 1999b] GMT Cheetham & TA Steitz. *Structure of a Transcribing T7 RNA Polymerase Initiation Complex*. Science, vol. 286, pages 2305–2309, 1999.

- [Chen 2000] Yu-Chi Chen & Shih-Tong Jeng. *Binding Affinity of T7 RNA Polymerase to its Promoter in the Supercoiled and Linearized DNA Templates*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, vol. 64, no. 6, page 1126, 2000.
- [Chen 2008] Zhucheng Chen, Haijuan Yang & Nikola P Pavletich. *Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures*. Nature, vol. 453, no. 7194, pages 489–4, 2008.
- [Chudakov 2005] Dmitriy M Chudakov, Sergey Lukyanov & Konstantin A Lukyanov. *Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging*. Trends Biotechnol., vol. 23, no. 12, pages 605–13, 2005.
- [Chung 1991] S H Chung & R A Kennedy. *Forward-backward non-linear filtering technique for extracting small biological signals from noise*. J. Neurosci. Methods, vol. 40, no. 1, pages 71–86, 1991.
- [Churchman 2005] L Stirling Churchman, Zeynep Okten, Ronald S Rock, John F Dawson & James A Spudich. *Single molecule high-resolution colocalization of Cy3 and Cy5 attached to macromolecules measures intramolecular distances through time*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 102, no. 5, pages 1419–23, 2005.
- [Cluzel 1996] P Cluzel, A Lebrun, C Heller, R Lavery, J L Viovy, D Chatenay & F Caron. *DNA : an extensible molecule*. Science, vol. 271, no. 5250, pages 792–4, 1996.
- [Cordes 2009] Thorben Cordes, Jan Vogelsang & Philip Tinnefeld. *On the Mechanism of Trolox as Antiblinking and Antibleaching Reagent*. Journal of the American Chemical Society, vol. 131, no. 14, pages 5018–5019, April 2009.
- [Cornet 1996] F Cornet, J Louarn, J Patte & J M Louarn. *Restriction of the activity of the recombination site dif to a small zone of the Escherichia coli chromosome*. Genes Dev., vol. 10, no. 9, pages 1152–61, 1996.
- [Cramer 2001] P Cramer, D A Bushnell & R D Kornberg. *Structural basis of transcription : RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution*. Science, vol. 292, no. 5523, pages 1863–76, 2001.
- [Crampton 2006] Donald J Crampton, Sourav Mukherjee & Charles C Richardson. *DNA-induced switch from independent to sequential dTTP hydrolysis in the bacteriophage T7 DNA helicase*. Mol. Cell, vol. 21, no. 2, pages 165–74, 2006.
- [Crick 1958] F H Crick. *On protein synthesis*. Symp. Soc. Exp. Biol., vol. 12, pages 138–63, 1958.
- [Crick 1970] F Crick. *Central dogma of molecular biology*. Nature, vol. 227, no. 5258, pages 561–3, 1970.
- [Crothers 1990] D M Crothers, T E Haran & J G Nadeau. *Intrinsically bent DNA*. J. Biol. Chem., vol. 265, no. 13, pages 7093–6, 1990.

- [Crozat 2010] Estelle Crozat, Adrien Meglio, Jean-François Allemand, Claire E Chivers, Mark Howarth, Catherine Vénien-Bryan, Ian Grainge & David J Sherratt. *Separating speed and ability to displace road-blocks during DNA translocation by FtsK*. The EMBO journal, 2010.
- [Crut 2005] Aurélien Crut, Bénédicte Géron-Landre, Isabelle Bonnet, Stéphane Bonneau, Pierre Desbiolles & Christophe Escudé. *Detection of single DNA molecules by multicolor quantum-dot end-labeling*. Nucleic Acids Res., vol. 33, no. 11, page e98, 2005.
- [Dahan 2003] Maxime Dahan, Sabine Lévi, Camilla Luccardini, Philippe Rostaing, Béatrice Riveau & Antoine Triller. *Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking*. Science, vol. 302, no. 5644, pages 442–5, 2003.
- [Darzacq 2007] Xavier Darzacq, Yaron Shav-Tal, Valeria de Turris, Yehuda Brody, Shailesh M Shenoy, Robert D Phair & Robert H Singer. *In vivo dynamics of RNA polymerase II transcription*. Nat. Struct. Mol. Biol., vol. 14, no. 9, pages 796–806, 2007.
- [Datta 2006] Kausiki Datta, Neil P Johnson & Peter H von Hippel. *Mapping the conformation of the nucleic acid framework of the T7 RNA polymerase elongation complex in solution using low-energy CD and fluorescence spectroscopy*. J. Mol. Biol., vol. 360, no. 4, pages 800–13, 2006.
- [Davenport 2000] R J Davenport, G J Wuite, R Landick & C Bustamante. *Single-molecule study of transcriptional pausing and arrest by E. coli RNA polymerase*. Science, vol. 287, no. 5462, pages 2497–500, 2000.
- [de Vries 2005] Anthony H B de Vries, Bea E Krenn, Roel van Driel & Johannes S Kanger. *Micro magnetic tweezers for nanomanipulation inside live cells*. Biophys. J., vol. 88, no. 3, pages 2137–44, 2005.
- [Dickson 1997] R M Dickson, A B Cubitt, R Y Tsien & W E Moerner. *On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein*. Nature, vol. 388, no. 6640, pages 355–8, 1997.
- [Dong 2007] Ken C Dong & James M Berger. *Structural basis for gate-DNA recognition and bending by type IIA topoisomerases*. Nature, vol. 450, no. 7173, pages 1201–5, 2007.
- [Dong 1995] F Dong, E P Gogol & P H von Hippel. *The phage T4-coded DNA replication helicase (gp41) forms a hexamer upon activation by nucleoside triphosphate*. J. Biol. Chem., vol. 270, no. 13, pages 7462–73, 1995.
- [Dubarry 2010] Nelly Dubarry & François-Xavier Barre. *Fully efficient chromosome dimer resolution in Escherichia coli cells lacking the integral membrane domain of FtsK*. EMBO J., vol. 29, no. 3, pages 597–605, 2010.

- [Dyba 2002] Marcus Dyba & Stefan W Hell. *Focal spots of size $\lambda/23$ open up far-field fluorescence microscopy at 33 nm axial resolution*. Phys. Rev. Lett., vol. 88, no. 16, page 163901, 2002.
- [Eckart 1995] K Eckart & J Spiess. *Electrospray ionization mass spectrometry of biotin binding to streptavidin*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, vol. 6, no. 10, page 912, 1995.
- [Egelman 1995] E H Egelman, X Yu, R Wild, M M Hingorani & S S Patel. *Bacteriophage T7 helicase/primase proteins form rings around single-stranded DNA that suggest a general structure for hexameric helicases*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 92, no. 9, pages 3869–73, 1995.
- [Eggeling 2009] Christian Eggeling, Christian Ringemann, Rebecca Medda, Günter Schwarzmann, Konrad Sandhoff, Svetlana Polyakova, Vladimir N Belov, Birka Hein, Claas von Middendorff, Andreas Schönle & Stefan W Hell. *Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell*. Nature, vol. 457, no. 7233, pages 1159–62, 2009.
- [Enemark 2006] Eric J Enemark & Leemor Joshua-Tor. *Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase*. Nature, vol. 442, no. 7100, pages 270–5, 2006.
- [Enemark 2008] Eric J Enemark & Leemor Joshua-Tor. *On helicases and other motor proteins*. Curr. Opin. Struct. Biol., vol. 18, no. 2, pages 243–57, 2008.
- [Erzberger 2006] Jan P Erzberger & James M Berger. *Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins*. Annual review of biophysics and biomolecular structure, vol. 35, pages 93–114, 2006.
- [Essevaz-Roulet 1997] B Essevaz-Roulet, U Bockelmann & F Heslot. *Mechanical separation of the complementary strands of DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 94, no. 22, pages 11935–40, 1997.
- [Finger 1982] L R Finger & J P Richardson. *Stabilization of the hexameric form of Escherichia coli protein rho under ATP hydrolysis conditions*. J. Mol. Biol., vol. 156, no. 1, pages 203–19, 1982.
- [Földes-Papp 2001] Z Földes-Papp, U Demel & G P Tilz. *Ultrasensitive detection and identification of fluorescent molecules by FCS : impact for immunobiology*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 98, no. 20, pages 11509–14, 2001.
- [Fomenko 2008] Vasilii Fomenko & David J Nesbitt. *Solution control of radiative and nonradiative lifetimes : a novel contribution to quantum dot blinking suppression*. Nano Lett., vol. 8, no. 1, pages 287–93, 2008.
- [Forde 2002] Nancy R Forde, David Izhaky, Glenna R Woodcock, Gijs J L Wuite & Carlos Bustamante. *Using mechanical force to probe the*

- mechanism of pausing and arrest during continuous elongation by Escherichia coli RNA polymerase.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 99, no. 18, pages 11682–7, 2002.
- [Funk 2009] Maren Funk, Simon J Parkin, Alexander B Stilgoe, Timo A Nieminen, Norman R Heckenberg & Halina Rubinsztein-Dunlop. *Constant power optical tweezers with controllable torque.* Opt Lett, vol. 34, no. 2, pages 139–41, 2009.
- [Galburt 2007] Eric A Galburt, Stephan W Grill, Anna Wiedmann, Lucyna Lubkowska, Jason Choy, Eva Nogales, Mikhail Kashlev & Carlos Bustamante. *Backtracking determines the force sensitivity of RNAP II in a factor-dependent manner.* Nature, vol. 446, no. 7137, pages 820–3, 2007.
- [Gell 2006] C. Gell, D. Brockwell & A. Smith. *Handbook of Single Molecule Fluorescence Spectroscopy.* Oxford University Press, 2006.
- [Glynn 2009] Steven E Glynn, Andreas Martin, Andrew R Nager, Tania A Baker & Robert T Sauer. *Structures of asymmetric ClpX hexamers reveal nucleotide-dependent motions in a AAA+ protein-unfolding machine.* Cell, vol. 139, no. 4, pages 744–56, 2009.
- [Gnatt 2001] A L Gnatt, P Cramer, J Fu, D A Bushnell & R D Kornberg. *Structural basis of transcription : an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution.* Science, vol. 292, no. 5523, pages 1876–82, 2001.
- [Gomis-Rüth 2001] F X Gomis-Rüth, G Moncalián, R Pérez-Luque, A González, E Cabezón, F de la Cruz & M Coll. *The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase.* Nature, vol. 409, no. 6820, pages 637–41, 2001.
- [Gong 2006] Peng Gong & Craig T Martin. *Mechanism of instability in abortive cycling by T7 RNA polymerase.* J. Biol. Chem., vol. 281, no. 33, pages 23533–44, 2006.
- [Gordon 2004] Matthew P Gordon, Taekjip Ha & Paul R Selvin. *Single-molecule high-resolution imaging with photobleaching.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 101, no. 17, pages 6462–5, 2004.
- [Gore 2006] Jeff Gore, Zev Bryant, Marcelo Nöllmann, Mai U Le, Nicholas R Cozzarelli & Carlos Bustamante. *DNA overwinds when stretched.* Nature, vol. 442, no. 7104, pages 836–9, 2006.
- [Gosse 2002] Charlie Gosse & Vincent Croquette. *Magnetic tweezers : micromanipulation and force measurement at the molecular level.* Biophys. J., vol. 82, no. 6, pages 3314–29, 2002.
- [Greenleaf 2005] William J Greenleaf, Michael T Woodside, Elio A Abbondanzieri & Steven M Block. *Passive all-optical force clamp for high-resolution laser trapping.* Phys. Rev. Lett., vol. 95, no. 20, page 208102, 2005.

- [Grimaud 1998] R. Grimaud. *Enzymatic and Structural Similarities between the Escherichia coli ATP-dependent Proteases, ClpXP and ClpAP*. Journal of Biological Chemistry, vol. 273, no. 20, page 12476, 1998.
- [Grynkiewicz 1985] G Grynkiewicz, M Poenie & R Y Tsien. *A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties*. J. Biol. Chem., vol. 260, no. 6, pages 3440–50, 1985.
- [Gueroui 2002] Z Gueroui, C Place, E Freyssingas & B Berge. *Observation by fluorescence microscopy of transcription on single combed DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 99, no. 9, pages 6005–10, 2002.
- [Gugel 2004] Hilmar Gugel, Jörg Bewersdorf, Stefan Jakobs, Johann Engelhardt, Rafael Storz & Stefan W Hell. *Cooperative 4Pi excitation and detection yields sevenfold sharper optical sections in live-cell microscopy*. Biophys. J., vol. 87, no. 6, pages 4146–52, 2004.
- [Gustafsson 2000] M G Gustafsson. *Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy*. Journal of microscopy, vol. 198, no. Pt 2, pages 82–7, 2000.
- [Gustafsson 2008] Mats G L Gustafsson, Lin Shao, Peter M Carlton, C J Rachel Wang, Inna N Golubovskaya, W Zacheus Cande, David A Agard & John W Sedat. *Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination*. Biophys. J., vol. 94, no. 12, pages 4957–70, 2008.
- [Gustafsson 1999] M G Gustafsson. *Extended resolution fluorescence microscopy*. Curr. Opin. Struct. Biol., vol. 9, no. 5, pages 627–34, 1999.
- [Habuchi 2008] Satoshi Habuchi, Hidekazu Tsutsui, Anna B Kochaniak, Atsushi Miyawaki & Antoine M van Oijen. *mKikGR, a monomeric photoswitchable fluorescent protein*. PLoS ONE, vol. 3, no. 12, page e3944, 2008.
- [Harada 1990] Y Harada, K Sakurada, T Aoki, D D Thomas & T Yanagida. *Mechanochemical coupling in actomyosin energy transduction studied by in vitro movement assay*. J. Mol. Biol., vol. 216, no. 1, pages 49–68, 1990.
- [Heim 1995] R Heim, A B Cubitt & R Y Tsien. *Improved green fluorescence*. Nature, vol. 373, no. 6516, pages 663–4, 1995.
- [Hein 2008] Birka Hein, Katrin I Willig & Stefan W Hell. *Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 105, no. 38, pages 14271–6, 2008.
- [Hell 2009] Stefan W Hell. *Microscopy and its focal switch*. Nat. Methods, vol. 6, no. 1, pages 24–32, 2009.
- [Hell 1992] S. Hell & EHK. Stelzer. *Properties of a 4Pi Confocal Fluorescence Microscope*. J. Opt. Soc. Am. A, vol. 9, no. 12, pages 2159–2166, 1992.

- [Herbert 2006] Kristina M Herbert, Arthur La Porta, Becky J Wong, Rachel A Mooney, Keir C Neuman, Robert Landick & Steven M Block. *Sequence-resolved detection of pausing by single RNA polymerase molecules*. *Cell*, vol. 125, no. 6, pages 1083–94, 2006.
- [Ho 2009] Bosco K Ho & David A Agard. *Probing the flexibility of large conformational changes in protein structures through local perturbations*. *PLoS Comput. Biol.*, vol. 5, no. 4, page e1000343, 2009.
- [Hohng 2004] Sungchul Hohng & Taekjip Ha. *Near-complete suppression of quantum dot blinking in ambient conditions*. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 5, pages 1324–5, 2004.
- [Hormaeche 2002] Itsaso Hormaeche, Itziar Alkorta, Fernando Moro, Jose M Valpuesta, Felix M Goni & Fernando De La Cruz. *Purification and properties of TrwB, a hexameric, ATP-binding integral membrane protein essential for R388 plasmid conjugation*. *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 48, pages 46456–62, 2002.
- [Hotz 2005] Charles Z Hotz. *Applications of quantum dots in biology : an overview*. *Methods Mol. Biol.*, vol. 303, pages 1–17, 2005.
- [Huang 2000] J Huang, L G Brieba & R Sousa. *Misincorporation by wild-type and mutant T7 RNA polymerases : identification of interactions that reduce misincorporation rates by stabilizing the catalytically incompetent open conformation*. *Biochemistry*, vol. 39, no. 38, pages 11571–80, 2000.
- [Huang 2002] Hayden Huang, Chen Y Dong, Hyuk-Sang Kwon, Jason D Sutin, Roger D Kamm & Peter T C So. *Three-dimensional cellular deformation analysis with a two-photon magnetic manipulator workstation*. *Biophys. J.*, vol. 82, no. 4, pages 2211–23, 2002.
- [Huang 2008] Bo Huang, Wenqin Wang, Mark Bates & Xiaowei Zhuang. *Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy*. *Science*, vol. 319, no. 5864, pages 810–3, 2008.
- [Iyer 2004a] Lakshminarayan M Iyer, Detlef D Leipe, Eugene V Koonin & L Aravind. *Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases*. *J. Struct. Biol.*, vol. 146, no. 1-2, pages 11–31, 2004.
- [Iyer 2004b] Lakshminarayan M Iyer, Kira S Makarova, Eugene V Koonin & L Aravind. *Comparative genomics of the FtsK-HerA superfamily of pumping ATPases : implications for the origins of chromosome segregation, cell division and viral capsid packaging*. *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. 17, pages 5260–79, 2004.
- [Jacob 1961] F Jacob & J Monod. *Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins*. *J. Mol. Biol.*, vol. 3, pages 318–56, 1961.

- [Kaji 2009] Takahiro Kaji, Syoji Ito, Shigenori Iwai & Hiroshi Miyasaka. *Nanosecond to submillisecond dynamics in dye-labeled single-stranded DNA, as revealed by ensemble measurements and photon statistics at single-molecule level*. The journal of physical chemistry. B, vol. 113, no. 42, pages 13917–25, 2009.
- [Kapanidis 2006] Achillefs N Kapanidis, Emmanuel Margeat, Sam On Ho, Ekaterine Kortkhonjia, Shimon Weiss & Richard H Ebright. *Initial transcription by RNA polymerase proceeds through a DNA-scrunching mechanism*. Science, vol. 314, no. 5802, pages 1144–7, 2006.
- [Kochetkov 1998] S Kochetkov. *Recent studies of T7 RNA polymerase mechanism*. FEBS Letters, vol. 440, no. 3, page 264, 1998.
- [Koopmans 2009] W J A Koopmans, R Buning, T Schmidt & J van Noort. *spFRET using alternating excitation and FCS reveals progressive DNA unwrapping in nucleosomes*. Biophys. J., vol. 97, no. 1, pages 195–204, 2009.
- [Koster 2005] Daniel A Koster, Vincent Croquette, Cees Dekker, Stewart Shuman & Nynke H Dekker. *Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase IB*. Nature, vol. 434, no. 7033, pages 671–4, 2005.
- [Koutsopoulos 2009] Sotirios Koutsopoulos, Larry D Unsworth, Yusuke Nagai & Shuguang Zhang. *Controlled release of functional proteins through designer self-assembling peptide nanofiber hydrogel scaffold*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 106, no. 12, pages 4623–8, 2009.
- [Kratky 1949] O Kratky & G Porod. *Diffuse small-angle scattering of X-rays in colloid systems*. Journal of colloid science, vol. 4, no. 1, pages 35–70, 1949.
- [Krishna 2006] Thatavarathy R Krishna, Manuel Parent, Martinus H V Werts, Laurent Moreaux, Said Gmouh, Serge Charpak, Anne-Marie Caminade, Jean-Pierre Majoral & Mireille Blanchard-Desce. *Water-soluble dendrimeric two-photon tracers for in vivo imaging*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., vol. 45, no. 28, pages 4645–8, 2006.
- [Kuempel 1996] P Kuempel, A Høgaard, M Nielsen, O Nagappan & M Tecklenburg. *Use of a transposon (Tndif) to obtain suppressing and nonsuppressing insertions of the dif resolvase site of Escherichia coli*. Genes Dev., vol. 10, no. 9, pages 1162–71, 1996.
- [Kuno 2001] M. Kuno, D. P. Fromm, H. F. Hamann, A. Gallagher & D. J. Nesbitt. *“On”/“off” fluorescence intermittency of single semiconductor quantum dots*. The Journal of Chemical Physics, vol. 115, no. 2, pages 1028–1040, 2001.
- [La Porta 2004] Arthur La Porta & Michelle D Wang. *Optical torque wrench : angular trapping, rotation, and torque detection of quartz microparticles*. Phys. Rev. Lett., vol. 92, no. 19, page 190801, 2004.

- [Laitinen 2006] O H Laitinen, V P Hytönen, H R Nordlund & M S Kulomaa. *Genetically engineered avidins and streptavidins*. Cell. Mol. Life Sci., vol. 63, no. 24, pages 2992–3017, 2006.
- [Lee 2002] Seung-Wuk Lee, Chuanbin Mao, Christine E Flynn & Angela M Belcher. *Ordering of quantum dots using genetically engineered viruses*. Science, vol. 296, no. 5569, pages 892–5, 2002.
- [Lee 2006] Jae Young Lee & Wei Yang. *UvrD helicase unwinds DNA one base pair at a time by a two-part power stroke*. Cell, vol. 127, no. 7, pages 1349–60, 2006.
- [Leger 1998] J F Leger, J Robert, L Bourdieu, D Chatenay & J F Marko. *RecA binding to a single double-stranded DNA molecule : a possible role of DNA conformational fluctuations*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 95, no. 21, pages 12295–9, 1998.
- [Lehmann 2007] Elisabeth Lehmann, Florian Brueckner & Patrick Cramer. *Molecular basis of RNA-dependent RNA polymerase II activity*. Nature, vol. 450, no. 7168, pages 445–9, 2007.
- [Levy 2005] Oren Levy, Jerod L Ptacin, Paul J Pease, Jeff Gore, Michael B Eisen, Carlos Bustamante & Nicholas R Cozzarelli. *Identification of oligonucleotide sequences that direct the movement of the Escherichia coli FtsK translocase*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 102, no. 49, pages 17618–23, 2005.
- [Li-Shishido 2006] Songhua Li-Shishido, Tomonobu M Watanabe, Hiroshi Tada, Hideo Higuchi & Noriaki Ohuchi. *Reduction in nonfluorescence state of quantum dots on an immunofluorescence staining*. Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 351, no. 1, pages 7–13, 2006.
- [Lionnet 2006a] T. Lionnet. *Mécanique de l'ADN et étude des hélicases en molécule unique*. PhD thesis, Université Paris VI, 2006.
- [Lionnet 2006b] Timothée Lionnet, Sylvain Joubaud, Richard Lavery, David Ben-simon & Vincent Croquette. *Wringing out DNA*. Phys. Rev. Lett., vol. 96, no. 17, page 178102, 2006.
- [Liphardt 2001] J Liphardt, B Onoa, S B Smith, I Tinoco & C Bustamante. *Reversible unfolding of single RNA molecules by mechanical force*. Science, vol. 292, no. 5517, pages 733–7, 2001.
- [Lippitz 2005] Markus Lippitz, Florian Kulzer & Michel Orrit. *Statistical evaluation of single nano-object fluorescence*. Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry, vol. 6, no. 5, pages 770–89, 2005.
- [Lodish 2000] Zipursky Matsudaira Baltimore Darnell Lodish Berk. *Molecular Cell Biology*. W.H. Freeman, 2000.
- [Löwe 2008] Jan Löwe, Antti Ellonen, Mark D Allen, Claire Atkinson, David J Sherratt & Ian Grainge. *Molecular mechanism of sequence-directed DNA loading and translocation by FtsK*. Mol. Cell, vol. 31, no. 4, pages 498–509, 2008.

- [Luger 1997] K Luger, A W Mäder, R K Richmond, D F Sargent & T J Richmond. *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, vol. 389, no. 6648, pages 251–60, 1997.
- [Manosas 2010] M. Manosas, A. Meglio, M. Spiering, F. Ding, S. Benkovic, F.-. Barre, O.A. Saleh, J.-F. Allemand, D. Bensimon & V. Croquette. *Magnetic Tweezers for the study of DNA tracking motors*. Methods in Enzymology, 2010.
- [Manzan 2004] Angelo Manzan, Günter Pfeiffer, Melissa L Hefferin, Cara E Lang, James P Carney & Karl-Peter Hopfner. *MlaA, a hexameric ATPase linked to the Mre11 complex in archaeal genomes*. EMBO Rep., vol. 5, no. 1, pages 54–9, 2004.
- [Marko 1995] JF. Marko & ED. Siggia. *Stretching DNA*. Macromolecules, vol. 28, no. 26, pages 8759–8770, 1995.
- [Martin 2005] Andreas Martin, Tania A Baker & Robert T Sauer. *Rebuilt AAA + motors reveal operating principles for ATP-fuelled machines*. Nature, vol. 437, no. 7062, pages 1115–20, 2005.
- [Massey 2006] Thomas H Massey, Christopher P Mercogliano, James Yates, David J Sherratt & Jan Löwe. *Double-stranded DNA translocation : structure and mechanism of hexameric FtsK*. Mol. Cell, vol. 23, no. 4, pages 457–69, 2006.
- [Matz 1999] M V Matz, A F Fradkov, Y A Labas, A P Savitsky, A G Zarausky, M L Markelov & S A Lukyanov. *Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species*. Nat. Biotechnol., vol. 17, no. 10, pages 969–73, 1999.
- [McAllister 1993] W T McAllister. *Structure and function of the bacteriophage T7 RNA polymerase (or, the virtues of simplicity)*. Cell. Mol. Biol. Res., vol. 39, no. 4, pages 385–91, 1993.
- [Mejia 2008] Yara X Mejia, Hanbin Mao, Nancy R Forde & Carlos Bustamante. *Thermal probing of E. coli RNA polymerase off-pathway mechanisms*. J. Mol. Biol., vol. 382, no. 3, pages 628–37, 2008.
- [Meyer 2008] Lars Meyer, Dominik Wildanger, Rebecca Medda, Annedore Punge, Silvio O Rizzoli, Gerald Donnert & Stefan W Hell. *Dual-color STED microscopy at 30-nm focal-plane resolution*. Small, vol. 4, no. 8, pages 1095–100, 2008.
- [Michalet 2005] X Michalet, F F Pinaud, L A Bentolila, J M Tsay, S Doose, J J Li, G Sundaresan, A M Wu, S S Gambhir & S Weiss. *Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics*. Science, vol. 307, no. 5709, pages 538–44, 2005.
- [Miné 2007] Judith Miné, Ludovic Disseau, Masayuki Takahashi, Giovanni Cappello, Marie Dutreix & Jean-Louis Viovy. *Real-time measurements of the nucleation, growth and dissociation of single Rad51-DNA nucleoprotein filaments*. Nucleic Acids Res., vol. 35, no. 21, pages 7171–87, 2007.

- [Moffitt 2009] Jeffrey R Moffitt, Yann R Chemla, K Aathavan, Shelley Grimes, Paul J Jardine, Dwight L Anderson & Carlos Bustamante. *Intersubunit coordination in a homomeric ring ATPase*. Nature, vol. 457, no. 7228, pages 446–50, 2009.
- [Molloy 2002] Justin E. Molloy & Miles J. Padgett. *Lights, action : optical tweezers*. Contemporary Physics, vol. 43, no. 4, page 241, 2002.
- [Mongin 2007a] Olivier Mongin, Anna Pla-Quintana, Francesca Terenziani, Delphine Drouin, Céline Le Droumaguet, Anne-Marie Caminade, Jean-Pierre Majoral & Mireille Blanchard-Desce. *Organic nanodots for multiphotonics : synthesis and photophysical studies*. New Journal of Chemistry, vol. 31, no. 7, page 1354, 2007.
- [Mongin 2007b] Olivier Mongin, Laurent Porrès, Marina Charlot, Claudine Katan & Mireille Blanchard-Desce. *Synthesis, fluorescence, and two-photon absorption of a series of elongated rodlike and banana-shaped quadrupolar fluorophores : a comprehensive study of structure-property relationships*. Chemistry, vol. 13, no. 5, pages 1481–98, 2007.
- [Monod 1965] J Monod, J Wyman & J P Changeux. *On the nature of allosteric transitions : a plausible model*. J. Mol. Biol., vol. 12, pages 88–118, 1965.
- [Morais 2008] Marc C Morais, Jaya S Koti, Valorie D Bowman, Emilio Reyes-Aldrete, Dwight L Anderson & Michael G Rossmann. *Defining molecular and domain boundaries in the bacteriophage phi29 DNA packaging motor*. Structure, vol. 16, no. 8, pages 1267–74, 2008.
- [Moreau 2007] Matthew J Moreau, Adam T McGeoch, Alan R Lowe, Laura S Itzhaki & Stephen D Bell. *ATPase site architecture and helicase mechanism of an archaeal MCM*. Mol. Cell, vol. 28, no. 2, pages 304–14, 2007.
- [Mosconi 2009] Francesco Mosconi, Jean François Allemand, David Bensimon & Vincent Croquette. *Measurement of the Torque on a Single Stretched and Twisted DNA Using Magnetic Tweezers*. Physical Review Letters, vol. 102, no. 7, page 078301, 2009.
- [Moy 1994] V T Moy, E L Florin & H E Gaub. *Intermolecular forces and energies between ligands and receptors*. Science, vol. 266, no. 5183, pages 257–9, 1994.
- [Murakami 2002a] Katsuhiko S Murakami, Shoko Masuda, Elizabeth A Campbell, Oriana Muzzin & Seth A Darst. *Structural basis of transcription initiation : an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex*. Science, vol. 296, no. 5571, pages 1285–90, 2002.
- [Murakami 2002b] Katsuhiko S Murakami, Shoko Masuda & Seth A Darst. *Structural basis of transcription initiation : RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution*. Science, vol. 296, no. 5571, pages 1280–4, 2002.

- [Murray 2000] C. B. Murray, C. R. Kagan & M. G. Bawendi. *Synthesis and characterisation of monodisperse nanocrystals and closed-packed nanocrystal assemblies*. Annual Review of Materials Science, vol. 30, no. 1, page 545, 2000.
- [Nägerl 2008] U Valentin Nägerl, Katrin I Willig, Birka Hein, Stefan W Hell & Tobias Bonhoeffer. *Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 105, no. 48, pages 18982–7, 2008.
- [Nambiar 2004] Rajalakshmi Nambiar, Arivalagan Gajraj & Jens-Christian Meiners. *All-optical constant-force laser tweezers*. Biophys. J., vol. 87, no. 3, pages 1972–80, 2004.
- [Neil 1998] M. A. A. Neil, R. Juskaitis & T. Wilson. *Real time 3D fluorescence microscopy by two beam interference illumination*. Optics Communications, vol. 153, no. 1-3, pages 1–4, 1998.
- [Nelson 1998] Philip Nelson. *Sequence-Disorder Effects on DNA Entropic Elasticity*. Physical Review Letters, vol. 80, no. 26, page 5810, 1998.
- [Neuman 2003] Keir C Neuman, Elio A Abbondanzieri, Robert Landick, Jeff Gelles & Steven M Block. *Ubiquitous transcriptional pausing is independent of RNA polymerase backtracking*. Cell, vol. 115, no. 4, pages 437–47, 2003.
- [Neuman 2004] Keir C Neuman & Steven M Block. *Optical trapping*. The Review of scientific instruments, vol. 75, no. 9, pages 2787–809, 2004.
- [Neveu 2008] Pierre Neveu, Isabelle Aujard, Chouaha Benbrahim, Thomas Le Saux, Jean-François Allemand, Sophie Vríz, David Bensimon & Ludovic Jullien. *A caged retinoic acid for one- and two-photon excitation in zebrafish embryos*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., vol. 47, no. 20, pages 3744–6, 2008.
- [Nirmal 1996] M. Nirmal, B. Dabbousi, M. Bawendi, J. Macklin, J. Trautman, T. Harris & L. Brus. *Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals*. Nature, vol. 383, no. 6603, pages 802–804, 1996.
- [Ormö 1996] M Ormö, A B Cubitt, K Kallio, L A Gross, R Y Tsien & S J Remington. *Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein*. Science, vol. 273, no. 5280, pages 1392–5, 1996.
- [Ovryn 2000] B Ovryn & SH Izen. *Imaging of transparent spheres through a planar interface using a high-numerical-aperture optical microscope*. Journal of the Optical Society of America. A, Optics, image science, and vision, vol. 17, no. 7, pages 1202–13, 2000.
- [Pankhurst 2003] QA. Pankhurst, J. Connolly, SK. Jones & J. Dobson. *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*. Journal of Physics D - Applied Physics, vol. 36, no. 13, pages R167–R181, 2003.

- [Pape 2003] Tillmann Pape, Hedije Meka, Shaoxia Chen, Giorgia Vicentini, Marin van Heel & Silvia Onesti. *Hexameric ring structure of the full-length archaeal MCM protein complex*. EMBO reports, vol. 4, no. 11, page 1079, 2003.
- [Patel 2000] S S Patel & K M Picha. *Structure and function of hexameric helicases*. Annu. Rev. Biochem., vol. 69, pages 651–97, 2000.
- [Patterson 2002] George H Patterson & Jennifer Lippincott-Schwartz. *A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells*. Science, vol. 297, no. 5588, pages 1873–7, 2002.
- [Peabody 1990] D S Peabody. *Translational repression by bacteriophage MS2 coat protein expressed from a plasmid. A system for genetic analysis of a protein-RNA interaction*. J. Biol. Chem., vol. 265, no. 10, pages 5684–9, 1990.
- [Pease 2005] Paul J Pease, Oren Levy, Gregory J Cost, Jeff Gore, Jerod L Ptacin, David Sherratt, Carlos Bustamante & Nicholas R Cozzarelli. *Sequence-directed DNA translocation by purified FtsK*. Science, vol. 307, no. 5709, pages 586–90, 2005.
- [Pédelacq 2006] Jean-Denis Pédelacq, Stéphanie Cabantous, Timothy Tran, Thomas C Terwilliger & Geoffrey S Waldo. *Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein*. Nat. Biotechnol., vol. 24, no. 1, pages 79–88, 2006.
- [Pérals 2000] K Pérals, F Cornet, Y Merlet, I Delon & J M Louarn. *Functional polarization of the Escherichia coli chromosome terminus : the dif site acts in chromosome dimer resolution only when located between long stretches of opposite polarity*. Mol. Microbiol., vol. 36, no. 1, pages 33–43, 2000.
- [Pierobon 2009] Paolo Pierobon, Sarra Achouri, Sébastien Courty, Alexander R Dunn, James A Spudich, Maxime Dahan & Giovanni Cappello. *Velocity, processivity, and individual steps of single myosin V molecules in live cells*. Biophys. J., vol. 96, no. 10, pages 4268–75, 2009.
- [Pincet 2005] Frédéric Pincet & Julien Husson. *The solution to the streptavidin-biotin paradox : the influence of history on the strength of single molecular bonds*. Biophys. J., vol. 89, no. 6, pages 4374–81, 2005.
- [Ptacin 2006] Jerod L Ptacin, Marcelo Nöllmann, Carlos Bustamante & Nicholas R Cozzarelli. *Identification of the FtsK sequence-recognition domain*. Nat. Struct. Mol. Biol., vol. 13, no. 11, pages 1023–5, 2006.
- [Ptacin 2008] Jerod L Ptacin, Marcelo Nollmann, Eric C Becker, Nicholas R Cozzarelli, Kit Pogliano & Carlos Bustamante. *Sequence-directed DNA export guides chromosome translocation during sporulation in Bacillus subtilis*. Nat. Struct. Mol. Biol., vol. 15, no. 5, pages 485–93, 2008.

- [Puchner 2009] Elias M Puchner & Hermann E Gaub. *Force and function : probing proteins with AFM-based force spectroscopy*. Curr. Opin. Struct. Biol., vol. 19, no. 5, pages 605–14, 2009.
- [Qi 2008] Lifeng Qi & Xiaohu Gao. *Emerging application of quantum dots for drug delivery and therapy*. Expert opinion on drug delivery, vol. 5, no. 3, pages 263–7, 2008.
- [Recchia 1999] G D Recchia, M Aroyo, D Wolf, G Blakely & D J Sherratt. *FtsK-dependent and -independent pathways of Xer site-specific recombination*. EMBO J., vol. 18, no. 20, pages 5724–34, 1999.
- [Revyakin 2004] Andrey Revyakin, Richard H Ebright & Terence R Strick. *Promoter unwinding and promoter clearance by RNA polymerase : detection by single-molecule DNA nanomanipulation*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 101, no. 14, pages 4776–80, 2004.
- [Revyakin 2006] Andrey Revyakin, Chenyu Liu, Richard H Ebright & Terence R Strick. *Abortive initiation and productive initiation by RNA polymerase involve DNA scrunching*. Science, vol. 314, no. 5802, pages 1139–43, 2006.
- [Rief 1999] M Rief, H Clausen-Schaumann & H E Gaub. *Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules*. Nat. Struct. Biol., vol. 6, no. 4, pages 346–9, 1999.
- [Rust 2006] Michael J Rust, Mark Bates & Xiaowei Zhuang. *Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)*. Nat. Methods, vol. 3, no. 10, pages 793–5, 2006.
- [Sacconi 2001] L Sacconi, G Romano, R Ballerini, M Capitano, M De Pas, M Giuntini, D Dunlap, L Finzi & F S Pavone. *Three-dimensional magneto-optic trap for micro-object manipulation*. Optics letters, vol. 26, no. 17, pages 1359–61, 2001.
- [Saleh 2004] Omar A Saleh, Corine Pérals, François-Xavier Barre & Jean-François Allemand. *Fast, DNA-sequence independent translocation by FtsK in a single-molecule experiment*. EMBO J., vol. 23, no. 12, pages 2430–9, 2004.
- [Saleh 2005] Omar A Saleh, Sarah Bigot, François-Xavier Barre & Jean-François Allemand. *Analysis of DNA supercoil induction by FtsK indicates translocation without groove-tracking*. Nat. Struct. Mol. Biol., vol. 12, no. 5, pages 436–40, 2005.
- [Sambongi 1999] Y Sambongi, Y Iko, M Tanabe, H Omote, A Iwamoto-Kihara, I Ueda, T Yanagida, Y Wada & M Futai. *Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F₀F₁) : direct observation*. Science, vol. 286, no. 5445, pages 1722–4, 1999.
- [Schwartz 2009] Annie Schwartz, Makhoulf Rabhi, Frédérique Jacquinet, Emmanuel Margeat, A Rachid Rahmouni & Marc Boudvillain. *A stepwise 2'-hydroxyl activation mechanism for the bacterial transcription termination factor Rho helicase*. Nat. Struct. Mol. Biol., vol. 16, no. 12, pages 1309–16, 2009.

- [Seol 2007] Yeonee Seol, Gary Skinner, Koen Visscher, Arnaud Buhot & Avraham Halperin. *Stretching of Homopolymeric RNA Reveals Single-Stranded Helices and Base-Stacking*. Physical Review Letters, vol. 98, no. 15, page 158103, 2007.
- [Severinov 2001] K Severinov. *T7 RNA polymerase transcription complex : what you see is not what you get*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 98, no. 1, pages 5–7, 2001.
- [Shaner 2005] NC Shaner, PA Steinbach & RY Tsien. *A guide to choosing fluorescent proteins*. Nature Methods, vol. 2, no. 12, pages 905–909, 2005.
- [Singleton 2000] M R Singleton, M R Sawaya, T Ellenberger & D B Wigley. *Crystal structure of T7 gene 4 ring helicase indicates a mechanism for sequential hydrolysis of nucleotides*. Cell, vol. 101, no. 6, pages 589–600, 2000.
- [Sivanathan 2006] Viknesh Sivanathan, Mark D Allen, Charissa de Bekker, Rachel Baker, Lidia K Arciszewska, Stefan M Freund, Mark Bycroft, Jan Löwe & David J Sherratt. *The FtsK gamma domain directs oriented DNA translocation by interacting with KOPS*. Nat. Struct. Mol. Biol., vol. 13, no. 11, pages 965–72, 2006.
- [Smith 2003] SB. Smith, YJ. Cui & C. Bustamante. Optical-trap force transducer that operates by direct measurement of light momentum, volume 361 of *Methods in Enzymology*, chapitre Biophotonics, pages 134–162. Academic Press, 525 B STREET, SUITE 1900, SAN DIEGO, CA 92101-4495 USA , 2003.
- [Smith 1992] S B Smith, L Finzi & C Bustamante. *Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads*. Science, vol. 258, no. 5085, pages 1122–6, 1992.
- [Smith 1996] S B Smith, Y Cui & C Bustamante. *Overstretching B-DNA : the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules*. Science, vol. 271, no. 5250, pages 795–9, 1996.
- [Soeller 1999] C. Soeller & MB. Cannon. *Two-photon microscopy : imaging in scattering samples and three-dimensionally resolved flash photolysis*. Microsc. Res. Tech., vol. 47, pages 182–195, 1999.
- [Steitz 2006] Thomas A Steitz. *Visualizing polynucleotide polymerase machines at work*. EMBO J., vol. 25, no. 15, pages 3458–68, 2006.
- [Stern 1919] O. Stern & M. Volmer. *Über die Abklingzeit der Fluoreszenz*. Physik. Zeitschr., vol. 20, pages 183–188, 1919.
- [Stitt 1998] B. L. Stitt. *Sequential Hydrolysis of ATP Molecules Bound in Interacting Catalytic Sites of Escherichia coli Transcription Termination Protein Rho*. Journal of Biological Chemistry, vol. 273, no. 41, page 26477, 1998.

- [Strick 1996] T R Strick, J F Allemand, D Bensimon, A Bensimon & V Croquette. *The elasticity of a single supercoiled DNA molecule*. Science, vol. 271, no. 5257, pages 1835–7, 1996.
- [Strick 1998] T R Strick, J F Allemand, D Bensimon & V Croquette. *Behavior of supercoiled DNA*. Biophys. J., vol. 74, no. 4, pages 2016–28, 1998.
- [Strick 1999] TR. Strick. *Enroulement mécanique de l'ADN et relaxation par les topoisomérases*. PhD thesis, Université Paris VI, 1999.
- [Svoboda 1994] K Svoboda & S M Block. *Biological applications of optical forces*. Annual review of biophysics and biomolecular structure, vol. 23, pages 247–85, 1994.
- [Swain 2006] Joanna F Swain & Lila M Gierasch. *The changing landscape of protein allostery*. Curr. Opin. Struct. Biol., vol. 16, no. 1, pages 102–8, 2006.
- [Tahirov 2002] Tahir H Tahirov, Dmitry Temiakov, Michael Anikin, Vsevolod Patlan, William T McAllister, Dmitry G Vassylyev & Shigeyuki Yokoyama. *Structure of a T7 RNA polymerase elongation complex at 2.9 Å resolution*. Nature, vol. 420, no. 6911, pages 43–50, 2002.
- [Talbot 1990] S J Talbot, S Goodman, S R Bates, C W Fishwick & P G Stockley. *Use of synthetic oligoribonucleotides to probe RNA-protein interactions in the MS2 translational operator complex*. Nucleic Acids Res., vol. 18, no. 12, pages 3521–8, 1990.
- [Tang 2008] Guo-Qing Tang, Rahul Roy, Taekjip Ha & Smita S Patel. *Transcription initiation in a single-subunit RNA polymerase proceeds through DNA scrunching and rotation of the N-terminal subdomains*. Mol. Cell, vol. 30, no. 5, pages 567–77, 2008.
- [Tang 2009] Guo-Qing Tang, Rahul Roy, Rajiv P Bandwar, Taekjip Ha & Smita S Patel. *Real-time observation of the transition from transcription initiation to elongation of the RNA polymerase*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 106, no. 52, pages 22175–80, 2009.
- [Thomen 2002] P. Thomen. *Transcription par une ARN Polymérase : mesures de forces à l'échelle de la molécule unique*. PhD thesis, Université Paris VI, 12 2002.
- [Thomen 2005] Philippe Thomen, Pascal Lopez & François Heslot. *Unravelling the Mechanism of RNA-Polymerase Forward Motion by Using Mechanical Force*. Physical Review Letters, vol. 94, no. 12, page 128102, 2005.
- [Thomen 2008] P Thomen, P J Lopez, U Bockelmann, J Guillerez, M Dreyfus & F Heslot. *T7 RNA polymerase studied by force measurements varying cofactor concentration*. Biophys. J., vol. 95, no. 5, pages 2423–33, 2008.

- [Thompson 2002] Russell E Thompson, Daniel R Larson & Watt W Webb. *Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes*. Biophys. J., vol. 82, no. 5, pages 2775–83, 2002.
- [Thomsen 2009] Nathan D Thomsen & James M Berger. *Running in reverse : the structural basis for translocation polarity in hexameric helicases*. Cell, vol. 139, no. 3, pages 523–34, 2009.
- [Tokunaga 2008] Makio Tokunaga, Naoko Imamoto & Kumiko Sakata-Sogawa. *Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells*. Nat. Methods, vol. 5, no. 2, pages 159–61, 2008.
- [Tucker 2007] Paul A Tucker & László Sallai. *The AAA+ superfamily—a myriad of motions*. Curr. Opin. Struct. Biol., vol. 17, no. 6, pages 641–52, 2007.
- [Van Der Meer 1994] B.W. Van Der Meer, G.III Coker & S.-Y. Chen. *Resonance Energy Transfer Theory and Data*. VCH, New York, NY, USA, 1994.
- [Vassilyev 2002] Dmitry G Vassilyev, Shun-ichi Sekine, Oleg Laptenko, Jookyung Lee, Marina N Vassilyeva, Sergei Borukhov & Shigeyuki Yokoyama. *Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution*. Nature, vol. 417, no. 6890, pages 712–9, 2002.
- [Viani 1999] AM. Viani, TE. Schaffer, A. Chand, M. Rief, HE. Gaub & PK. Hansma. *Small cantilevers for force spectroscopy of single molecules*. J. App. Phys., vol. 86, no. 4, pages 2258–2262, 1999.
- [Vogelsang 2009] Jan Vogelsang, Thorben Cordes, Carsten Forthmann, Christian Steinhauer & Philip Tinnefeld. *Controlling the fluorescence of ordinary oxazine dyes for single-molecule switching and super-resolution microscopy*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 106, no. 20, pages 8107–12, 2009.
- [Walling 2009] Maureen A Walling, Jennifer A Novak & Jason R E Shepard. *Quantum dots for live cell and in vivo imaging*. Int J Mol Sci, vol. 10, no. 2, pages 441–91, 2009.
- [Wang 2005] Xindan Wang, Christophe Possoz & David J Sherratt. *Dancing around the divisome : asymmetric chromosome segregation in Escherichia coli*. Genes Dev., vol. 19, no. 19, pages 2367–77, 2005.
- [Wang 1997] M D Wang, H Yin, R Landick, J Gelles & S M Block. *Stretching DNA with optical tweezers*. Biophys. J., vol. 72, no. 3, pages 1335–46, 1997.
- [Wang 1998] M D Wang, M J Schnitzer, H Yin, R Landick, J Gelles & S M Block. *Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase*. Science, vol. 282, no. 5390, pages 902–7, 1998.

- [Watanabe 2002] Yo-hei Watanabe, Ken Motohashi & Masasuke Yoshida. *Roles of the two ATP binding sites of ClpB from Thermus thermophilus*. J. Biol. Chem., vol. 277, no. 8, pages 5804–9, 2002.
- [Weston 1998] Kenneth D. Weston, Paul J. Carson, Horia Metiu & Steven K. Buratto. *Room-temperature fluorescence characteristics of single dye molecules adsorbed on a glass surface*. The Journal of Chemical Physics, vol. 109, no. 17, pages 7474–7485, 1998.
- [Wiese 2006] Claudia Wiese, John M Hinz, Robert S Tebbs, Peter B Nham, Salustra S Urbin, David W Collins, Larry H Thompson & David Schild. *Disparate requirements for the Walker A and B ATPase motifs of human RAD51D in homologous recombination*. Nucleic Acids Res., vol. 34, no. 9, pages 2833–43, 2006.
- [Wildanger 2009] D Wildanger, R Medda, L Kastrup & S W Hell. *A compact STED microscope providing 3D nanoscale resolution*. Journal of microscopy, vol. 236, no. 1, pages 35–43, 2009.
- [Wilson 1998] T Wilson, MA Neil & R Juskaitis. *Real-time three-dimensional imaging of macroscopic structures*. Journal of microscopy, vol. 191, no. 2, pages 116–118, 1998.
- [Xu 2003] Chunyan Xu, Dror Tobi & I. Bahar. *Allosteric Changes in Protein Structure Computed by a Simple Mechanical Model : Hemoglobin T*R2 Transition*. Journal of Molecular Biology, vol. 333, no. 1, page 153, 2003.
- [Yates 2006] James Yates, Ivailo Zhekov, Rachel Baker, Bjørn Eklund, David J Sherratt & Lidia K Arciszewska. *Dissection of a functional interaction between the DNA translocase, FtsK, and the XerD recombinase*. Mol. Microbiol., vol. 59, no. 6, pages 1754–66, 2006.
- [Yildiz 2003] Ahmet Yildiz, Joseph N Forkey, Sean A McKinney, Taekjip Ha, Yale E Goldman & Paul R Selvin. *Myosin V walks hand-over-hand : single fluorophore imaging with 1.5-nm localization*. Science, vol. 300, no. 5628, pages 2061–5, 2003.
- [Yildiz 2004] Ahmet Yildiz, Michio Tomishige, Ronald D Vale & Paul R Selvin. *Kinesin walks hand-over-hand*. Science, vol. 303, no. 5658, pages 676–8, 2004.
- [Yildiz 2005] Ahmet Yildiz & Paul R Selvin. *Fluorescence imaging with one nanometer accuracy : application to molecular motors*. Acc. Chem. Res., vol. 38, no. 7, pages 574–82, 2005.
- [Yin 2002] Y Whitney Yin & Thomas A Steitz. *Structural basis for the transition from initiation to elongation transcription in T7 RNA polymerase*. Science, vol. 298, no. 5597, pages 1387–95, 2002.
- [Yin 2004] YW Yin & TA Steitz. *The Structural Mechanism of Translocation and Helicase Activity in T7 RNA Polymerase*. Cell, vol. 116, pages 393–404, 2004.

- [Young 2002] Brian A Young, Tanja M Gruber & Carol A Gross. *Views of transcription initiation*. Cell, vol. 109, no. 4, pages 417–20, 2002.
- [Zhang 1999] G Zhang, E CAMPBELL, L MINAKHIN, C RICHTER, K SEVERINOV & S DARST. *Crystal Structure of Core RNA Polymerase at 3.3 Å Resolution*. Cell, vol. 98, no. 6, page 811, 1999.