



**HAL**  
open science

## Organisation structurale et fonctionnelle des chromosomes

Sébastien Almagro

► **To cite this version:**

Sébastien Almagro. Organisation structurale et fonctionnelle des chromosomes. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2003. Français. NNT : . tel-00003099

**HAL Id: tel-00003099**

**<https://theses.hal.science/tel-00003099>**

Submitted on 9 Jul 2003

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

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

**UNIVERSITE GRENOBLE I – JOSEPH FOURIER  
U.F.R. DE CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT**

**T H E S E**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR**

***Discipline : BIOLOGIE  
Spécialité : INTERFACE PHYSIQUE / BIOLOGIE***

Présentée et soutenue publiquement

Par

Sébastien ALMAGRO

Le Jeudi 26 juin 2003

**Titre :**

**Organisation structurale et fonctionnelle des chromosomes**

---

***Directeur de thèse :***

Stefan DIMITROV

***Co-directeur de thèse :***

Daniel RIVELINE

---

**JURY**

**M. Filipski. J**, rapporteur, (Institut J. Monod, 2, place Jussieu Tour 43, 75251 PARIS).

**M. Viovy. J-L**, rapporteur, (Institut Curie, 26 Rue D'Ulm, 75248, Paris Cedex 05).

**M. Bouvet. P**, membre du jury, (E. N. S. Lyon , 46 allée d'Italie, 69364, Lyon Cedex 7).

**M. Dimitrov. S**, directeur de thèse, (Institut A. Bonniot, Domaine de la Merci, 38706 La TroncheCedex).

**M. Nonchev. S**, membre du jury, (Institut A. Bonniot, Domaine de la Merci, 38706 La TroncheCedex).

**M. Riveline. D**, co-directeur de thèse, (Lab. de Spectrométrie Physique, Bat. E, 140 Av. de la Physique, Domaine Universitaire de Grenoble, 38402 St Martin d'Hères).

*A Madeleine,  
A mes parents.*

## I. Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord ma compagne, *Madeleine Revaz*, qui m'a soutenu sur tous les plans tout au long de ces années de thèse. Je remercie aussi *mes parents*, sans qui, mes études n'auraient pas été possible.

Je tiens ensuite à remercier mes directeurs de thèse, *Stefan Dimitrov* et *Daniel Riveline* pour leur encadrement. Je remercie le jury de thèse et, tout spécialement, les rapporteurs de mon mémoire de thèse pour le temps qu'ils m'ont accordé.

Je tiens ensuite à remercier les groupes *PHASE/BOM* ainsi que *toute l'équipe de M. Dimitrov* pour l'ambiance dans laquelle ils m'ont permis de travailler. J'adresse mes vifs remerciements à *Anne-Elisabeth De La Barre* pour son soutien et la formation qu'elle m'a donnée. Un remerciement tout spécial à *Babram Houchmandzadeh* pour des milliards de raisons que je ne citerai pas ici. Un grand merci à *Véronique Gerson*, *Monique Charra* et *François Lenouvel* pour leur aide au jour le jour. Un grand merci à *Hélène Delanoë* pour une foule de raisons qu'il serait vain d'énumérer. Un grand merci également à *Marcel Vallade*, *François Graner* et *Catherine Quilliet* pour leur aide. Un grand merci à *Patrice Ballet* pour la *patience*, le *stoïcisme* et la *compréhension* dont il a fait preuve chaque jour avec les thésards.

## II. Sommaire

### 1. Table des matières

<b><u>I.</u></b>	<b><u>Remerciements</u></b>	<b><u>I-3</u></b>
<b><u>II.</u></b>	<b><u>Sommaire</u></b>	<b><u>4</u></b>
1.	Table des matières .....	4
2.	Index des figures.....	9
3.	Index des équations .....	10
4.	Index des tableaux.....	11
<b><u>III.</u></b>	<b><u>Éléments de signalement de la thèse</u></b>	<b><u>12</u></b>
1.	Titre .....	12
a.	Titre en français .....	12
b.	Titre en anglais.....	12
2.	Résumés.....	12
a.	Résumé en Français .....	12
b.	Résumé en Anglais (“Summary”) .....	12
3.	Mots clés .....	13
a.	Mots clés en français.....	13
b.	Mots clés en anglais (“Keywords”).....	13
4.	Informations sur les laboratoires dans lesquelles la thèse a été préparée.....	13
a.	Laboratoire de rattachement : .....	13
b.	Autre laboratoire.....	14
<b><u>IV.</u></b>	<b><u>Abréviations utilisées.</u></b>	<b><u>15</u></b>
<b><u>V.</u></b>	<b><u>Introduction.</u></b>	<b><u>17</u></b>
1.	Introduction générale sur la problématique.....	17
2.	Genèse des chromosomes.....	18
a.	La cellule.....	18
b.	Le noyau.....	19
c.	Le cycle cellulaire .....	20
	Avant la mitose.....	20
	La mitose .....	21
	Entrée en interphase .....	22
3.	Les niveaux d’organisation de l’ADN.....	23
a.	L’ADN.....	23
b.	La chromatine : vers une superstructure nucléoprotéique. ....	24
	Le nucléosome.....	24
	Les histones .....	24
	Le nucléosome est l’unité basale de la chromatine .....	25
	Le nucléofilament.....	26
	La fibre de 30 nm .....	27
c.	Les chromosomes .....	29

Problèmes techniques freinant l'étude de l'organisation des chromosomes.....	29
La fibre de 30 nm dans les niveaux d'organisation supérieurs .....	30
Organisation à grande échelle de la chromatine interphasique .....	31
Modèles d'organisation des chromosomes interphasiques .....	33
Modèle de « marche au hasard / boucles géantes » du chromosome interphasique	34
Modèle « chromomérique » du chromosome interphasique .....	36
Modèle de « repliement hiérarchisé de l'ADN » du chromosome interphasique ...	37
Modèles d'organisation des chromosomes métaphasiques .....	39
Le modèle « loops + scaffold » du chromosome mitotique .....	39
Modèle « chromomérique » du chromosome mitotique .....	42
Le modèle de « repliement hiérarchisé de l'ADN » du chromosome mitotique.....	43
Le modèle « axes rigides + gaine molle de chromatine » du chromosome mitotique	45
.....	45
Le noyau de sperme.....	48
d. <i>Vue d'ensemble des niveaux d'organisation de la chromatine</i> .....	50
<b>4. Protéines suspectées d'avoir un rôle dans le maintien du chromosome.....</b>	<b>52</b>
a. <i>La topoisomérase II</i> .....	52
Structure de la topoisomérase II (Berger, 1996) .....	52
Mécanisme et fonction de la topoisomérase II.....	53
La topoisomérase II et les chromosomes .....	55
Rôle de la topoisomérase II dans la condensation et la séparation des chromosomes	55
.....	55
Rôle structural de la topoisomérase II.....	55
b. <i>Les protéines SMC</i> .....	56
Structure et classification des protéines SMC.....	57
Les condensines.....	58
Composition .....	58
Activité des condensines .....	59
Mode d'action supposé des condensines.....	59
Rôle structural des condensines .....	61
Les cohésines.....	63
Réparation et signalisation : SMC5/SMC6.....	65
<b>5. Comment apporter de nouvelles informations pertinentes sur l'organisation du</b>	
<b>chromosome mitotique ? .....</b>	<b>65</b>
a. <i>Problématique</i> .....	65
b. <i>Notre modèle d'étude : les chromosomes mitotiques assemblés in vitro de Xénope.</i>	66
66	
Pourquoi techniquement les avoir choisis ? .....	66
Les chromosomes mitotiques assemblés in vitro de Xénope sont-ils de bons modèles ?	
.....	68
c. <i>Les mesures de force en biologie : un nouvel outil</i> .....	69
Les techniques de mesure de force (Shao, 2001).....	70
Les pinces optiques .....	70
Les pinces magnétiques.....	71
La machine de forces.....	71
La chambre à flux.....	72
La membrane biologique comme capteur de force .....	72
La microscopie à force atomique .....	73
Les micropipettes comme capteurs de force .....	74
Quelques résultats obtenus à l'aide de ces techniques .....	75

Etude de la liaison biotine/streptavidine .....	75
Dépliage de protéines .....	76
Étirement d'ARN .....	77
Étirement d'ADN .....	79
Dépliage de nucléosomes .....	80
Les mesures de force en biologie ne sont pas seulement un outil .....	82
Un exemple : le paysage énergétique .....	82
d. <i>Résistance à l'étirement</i> .....	86
Quelques définitions .....	86
Étirements de chromosomes déjà effectués .....	89
e. <i>Mesure des fluctuations d'un objet</i> .....	95
Mesure de la longueur de persistance d'un objet à partir du calcul de sa fonction d'autocorrélation .....	96
Mesures de longueur de persistance déjà effectuées .....	98
<b><u>VI. Matériels et méthodes.</u></b> .....	<b>100</b>
<b>1. Préambule</b> .....	<b>100</b>
<b>2. Extraits mitotiques et sperme démembré de Xénope</b> .....	<b>100</b>
a. <i>Le Xénope</i> .....	100
b. <i>Obtention d'extraits d'œufs de Xénope</i> .....	101
Déclenchement de la ponte et collecte des œufs .....	101
Enlèvement du mucus qui recouvre les œufs .....	102
Préparation de l'extrait d'œufs .....	103
Remarque sur l'extrait d'œufs de Xénope .....	105
c. <i>Obtention des noyaux de sperme de Xénope</i> .....	105
<b>3. Assemblage de chromosome</b> .....	<b>107</b>
<b>4. Enlèvement de la topoisomérase II</b> .....	<b>107</b>
<b>5. Digestion enzymatique des chromosomes</b> .....	<b>108</b>
<b>6. Electrophorèse</b> .....	<b>109</b>
<b>7. Transfert sur membrane</b> .....	<b>109</b>
<b>8. Western blot</b> .....	<b>109</b>
<b>9. Immunofluorescence sur chromosomes</b> .....	<b>110</b>
Protocole de préparation des lames de chromosomes .....	110
Observation sous microscope et prise d'image .....	112
Traitement d'image .....	112
<b>10. L'expérience d'étirement</b> .....	<b>114</b>
a. <i>Généralités sur le montage expérimental</i> .....	114
b. <i>Isolation vibratoire du montage</i> .....	116
c. <i>Réservoir qui accueille la solution de chromosomes</i> .....	116
d. <i>Les micropipettes</i> .....	118
Mesurer une force à l'aide d'une micropipette .....	118
Mesurer la constante de ressort d'une pipette .....	120
Linéarité de la mesure de force par une pipette .....	122
Note sur certains problèmes pouvant arriver lors d'une calibration de pipette .....	122
Mesurer la position d'une pipette et son déplacement à partir d'une séquence d'images .....	123
Calibration de la taille absolue du pixel .....	123
Mesurer le déplacement des pipettes au cours d'un étirement .....	124
Mesure de la précision de mesure du programme .....	125
Lavage des capillaires .....	126
Fabrication des micropipettes .....	127

Cas des pipettes extrêmement souples ( $\mathcal{K} \leq 20 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ ).....	130
Attraper un chromosome à l'aide d'une micropipette.....	132
La technique d'aspiration.....	132
La technique de « collage » (via une interaction antigène/anticorps).....	136
e. <i>Les micromanipulateurs</i> .....	139
Test de vitesse du micromanipulateur permettant d'imposer la distance et la vitesse d'étirement du chromosome.....	139
Gamme de vitesse prévue par le constructeur de l'appareil.....	140
Cas des très basses vitesses (non prévues par le constructeur).....	140
Immobilité des micromanipulateurs.....	140
f. <i>Déroulement de l'expérience d'étirement de chromosome</i> .....	141
Les différents types d'étirement.....	143
L'étirement du type « aller-retour ».....	143
L'étirement du type « infini ».....	143
L'étirement du type « aller-simple ».....	143
<b>11. Projection d'enzyme sur chromosome unique.....</b>	<b>146</b>
a. <i>Montage expérimental</i> .....	146
b. <i>Déroulement de l'expérience</i> .....	148
c. <i>Protocoles et présentation de chaque enzyme</i> .....	150
d. <i>Modifications et contraintes du montage expérimental</i> .....	151
<b>12. Mesure des fluctuations du chromosome.....</b>	<b>151</b>
a. <i>Acquisition d'images de chromosomes fluctuants</i> .....	151
b. <i>Fluctuations d'un chromosome entre deux pipettes</i> .....	152
<b><u>VII. Résultats.</u></b>	<b>153</b>
<b>1. Publication n°1 : .....</b>	<b>153</b>
Figures.....	162
<b>2. Publication n°2 .....</b>	<b>165</b>
Summary.....	167
Introduction.....	168
Results.....	170
The chemical continuity of DNA is crucial for the maintenance of mitotic chromosome structure.....	170
Chromosomal proteins, but not RNA, participate in the maintenance of mitotic chromosome structure.....	171
Mitotic chromosomes exhibit a non-homogenous structure.....	172
The SMC proteins are associated with chromosome regions exhibiting higher elastic response.....	174
Topoisomerase II is not involved in the maintenance of mitotic chromosomes....	176
Discussion.....	177
The elasticity measurements demonstrate a heterogeneous structure of the mitotic chromosomes.....	177
Organization of the chromosome axes.....	178
Mechanism of mitotic chromosome assembly.....	180
Embryonic versus somatic chromosomes.....	181
Experimental procedures.....	183
Preparation of mitotic extracts.....	183
Isolation of <i>Xenopus</i> demembrated sperm nuclei and chromosome assembly..	183
Chromosome micromanipulations.....	184
Topoisomerase II depletion of mitotic chromosomes.....	185
Enzymatic-Micromechanical experiments.....	185

References .....	187
Figures .....	190
<b><u>VIII. Conclusions et perspectives.</u></b>	<b>200</b>
1. Etat de condensation de la chromatine chromosomique .....	200
2. Le maintien du chromosome est assuré par un complexe ADN-protéines .....	202
3. La topoisomérase II ne joue pas de rôle de maintien de l'organisation du chromosome .....	202
4. Organisation duale des chromosomes .....	203
5. Nature des axes .....	203
6. Rôles des protéines SMC .....	204
Rigidification du chromosome mitotique ? .....	204
Protéines à l'origine de l'aspect en bâtonnet du chromosome ? .....	205
7. Genèse des chromosomes lors de la mitose .....	206
8. Le modèle « axes rigides + gaine molle de chromatine » face aux autres modèles d'organisation des chromosomes .....	207
9. Tous les chromosomes semblent avoir la même organisation .....	209
10. Paysage énergétique des chromosomes .....	209
11. Les chromosomes mitotiques assemblés in vitro de Xénope : un bon système d'étude. ....	210
a. Un système d'étude reproductible .....	210
b. Chromosomes embryonnaires et chromosomes somatiques .....	211
12. Les mesures d'élasticité de chromosomes peuvent apporter des informations originales .....	212
13. Perspectives .....	213
<b><u>IX. Conclusion générale</u></b>	<b>214</b>
<b><u>X. Bibliographie</u></b>	<b>216</b>
<b><u>XI. Informations légales, références des logiciels et des figures</u></b>	<b>231</b>
1. Informations légales .....	231
2. Logiciels .....	231
a. Cytofish .....	231
b. Image tool <sup>©</sup> .....	232
c. Programme de détection de mouvement de pipette par corrélation d'image à 2 dimensions .....	232
d. Origin <sup>®</sup> 6 .....	232
e. Scion .....	232
3. Figures .....	232
<b><u>XII. Annexes</u></b>	<b>234</b>
1. Elasticité de la chromatine en présence de 150 mM NaCl .....	234
2. Programme permettant le déplacement des pipettes aux vitesses inférieures à celles prévues par le constructeur du micromanipulateur .....	235
a. Fichier de projet : « sutter4.vbp » .....	235
b. Fichier de module : « MODULE1.bas » .....	236
c. Fichier de form : « form1.frm » .....	236
3. Programme permettant de mesurer les fluctuations d'un chromosome .....	249
a. Fichier de projet : « Angle_evol.vbp » .....	249
b. Fichier de module : « module1.bas » .....	250
c. Fichier de classe : « SEB.cls » .....	258
d. Fichier de classe : « Fit_class.cls » .....	260
e. Fichier de form : « form1.frm » .....	263

## 2. Index des figures

Figure V.1 : Schéma d'une cellule eucaryote animale.....	18
Figure V.2 : Noyau d'une cellule eucaryote en interphase .....	19
Figure V.3 : Succession des différentes étapes d'un cycle cellulaire eucaryote d'environ 24 heures .....	21
Figure V.4 : Les étapes de la mitose et la cytotidérèse .....	22
Figure V.5 : Trois différentes formes d'hélices d'ADN .....	24
Figure V.6 : Structure cristallographique de la particule de cœur d'un nucléosome à 2,8 Å ..	25
Figure V.7 : Cliché de microscopie électronique du nucléofilament.....	26
Figure V.8 : Modèles de structure de la fibre de 30 nm.....	28
Figure V.9 : Clichés de microscopie électronique de chromosomes métaphasiques.....	30
Figure V.10 : Organisation de la chromatine interphasique en territoires chromosomiques ...	32
Figure V.11 : Modèle d'organisation de marche au hasard/boucles géantes du chromosome interphasique .....	35
Figure V.12 : Modèle chromomérique du chromosome interphasique.....	37
Figure V.13 : Modèle de repliement hiérarchisé du chromosome interphasique.....	38
Figure V.14 : Modèle « loops + scaffold » d'organisation du chromosome.....	41
Figure V.15 : Modèle chromomérique du chromosome mitotique.....	43
Figure V.16 : Modèle d'organisation en « repliement hiérarchisé de l'ADN » du chromosome mitotique.....	44
Figure V.17 : Modèle « axes rigides + gaine molle de chromatine » du chromosome mitotique .....	47
Figure V.18 : Schéma explicatif d'un modèle de compaction de sperme.....	49
Figure V.19 : Récapitulatif des niveaux d'organisation de la chromatine .....	51
Figure V.20 : Structure cristallographique d'un fragment du dimère de la topoisomérase II..	52
Figure V.21 : Mécanisme d'action supposé de la topoisomérase II.....	54
Figure V.22 : Structure primaire et dimérisation des protéines SMC .....	57
Figure V.23 : La condensine 13 S (eucaryote).....	58
Figure V.24 : Mode d'action supposé des condensines .....	60
Figure V.25 : Protéines SMC et organisation du chromosome mitotique .....	62
Figure V.26 : Composition et rôle des cohésines eucaryotes.....	64
Figure V.27 : Cinétique de formation des chromosomes mitotiques assemblés <i>in vitro</i> de <i>Xénope</i> .....	68
Figure V.28 : La technique d'utilisation de la membrane biologique comme capteur de force .....	73
Figure V.29 : Illustration et mesures du dépliement de domaines Ig de titine.....	76
Figure V.30 : Élasticité d'une molécule d'ARN .....	78
Figure V.31 : Élasticité de l'ADN.....	80
Figure V.32 : Dépliement de nucléosomes .....	81
Figure V.33 : Déformation du potentiel d'interaction par application d'une force .....	85
Figure V.34 : Illustration du module de Young .....	87
Figure V.35 : Étirement de chromosomes de salamandre <i>in vivo</i> .....	90
Figure V.36 : Régime hystérétique de l'étirement de chromosomes .....	92
Figure V.37 : Relaxation dynamique des chromosomes de salamandre.....	93
Figure V.38 : Schéma explicatif de la relation entre longueur de persistance et module de Young .....	96

Figure V.39 : Illustration de la fonction d'autocorrélation des tangentes dans le cas d'un chromosome .....	97
Figure VI.1 : Photographies de <i>Xénopes</i> .....	101
Figure VI.2 : Photographie d'œufs de <i>Xénope</i> .....	102
Figure VI.3 : Schéma général du montage expérimental .....	115
Figure VI.4 : Réservoir qui contient la solution de chromosomes .....	117
Figure VI.5 : Illustration de la loi de Hooke dans le cas d'un ressort et d'une pipette .....	119
Figure VI.6 : Graphique permettant la détermination de la constante de ressort de l'aiguille .....	121
Figure VI.7 : Détermination de la précision de détection de mouvements de la pipette .....	126
Figure VI.8 : Principe de fabrication des pipettes .....	128
Figure VI.9 : La technique d'aspiration permet de saisir toute la section du chromosome ...	135
Figure VI.10 : Technique d'aspiration du chromosome .....	136
Figure VI.11 : Fonctionnalisation des pipettes .....	137
Figure VI.12 : Technique de « collage » du chromosome .....	138
Figure VI.13 : Séquence d'images successives extraites d'un film d'étirement .....	142
Figure VI.14 : Résultats de deux différents types d'expériences d'étirement de chromosomes .....	144
Figure VI.15 : Résultat typique d'une expérience d'étirement .....	145
Figure VI.16 : Schéma du montage expérimental dans la configuration « étirement + projection » .....	146
Figure VI.17 : Principe de la projection d'enzyme sur chromosome unique .....	147
Figure VI.18 : Schéma descriptif de la projection d'enzyme sur chromosome unique .....	149
Publication n°1 -Figure VII.1 .....	162
Publication n°1 -Figure VII.2 .....	163
Publication n°1 -Figure VII.3 - a .....	164
Publication n°1 -Figure VII.3 - b .....	165
Publication n°2 -Figure VII.1 : The continuity of DNA is essential for the maintenance of the structure of mitotic chromosomes .....	190
Publication n°2 - Figure VII.2 .....	192
Publication n°2 – Figure VII.3 : Elasticity measurements reveal a non-homogenous structure of mitotic chromosomes .....	193
Publication n°2 - Figure VII.4 : Cleavage of SMC proteins with trypsin correlates with a decrease of the chromosome elastic response .....	194
Publication n°2 - Figure VII.5 : The chromosome domains containing SMC proteins exhibit higher elastic response .....	195
Publication n°2 - Figure VII.6 : Topoisomerase II is not involved in the maintenance of the mitotic chromosomes .....	196
Publication n°2 - Figure VII.7 .....	198
Figure XII.1 : Influence de la force ionique sur la résistance à l'étirement de la chromatine. ....	235

### **3. Index des équations**

Équation V.1 : Définition du taux de variation de force dans le cas de l'expérience d'étirement de chromosome .....	84
Équation V.2 : Définition du stretch modulus .....	88
Equation V.3 : Définition du coefficient de Poisson .....	88

Équation V.4 : Relation entre module de courbure et longueur de persistance ..... 95  
Équation V.5 : Relation entre module de courbure et module de Young ..... 95  
Équation V.6 : Définition de la fonction d'autocorrélation des tangentes ..... 97  
Équation V.7 : Obtention de la longueur de persistance à partir de la mesure de la variation  
angulaire de deux segments du chromosome ..... 98  
Équation VI.1 : Loi de Hooke ..... 118  
Équation VI.2 : Détermination du Stretch Modulus ..... 142

#### **4. Index des tableaux**

Tableau 1 : Effet de la salinité sur des chromosomes mitotiques de salamandre ..... 94

## **III. Eléments de signalement de la thèse**

### **1. Titre**

#### **a. Titre en français**

Organisation structurale et fonctionnelle des chromosomes.

#### **b. Titre en anglais**

Structural and Functional Organization of mitotic chromosomes

### **2. Résumés**

#### **a. Résumé en Français**

Nous avons utilisé une technique récente de mesure d'élasticité de chromosomes mitotiques assemblés *in vitro* de *Xénope* et mis au point une technique de fonctionnalisation par anticorps de micropipettes. Nous avons confirmé que le chromosome mitotique n'était pas un objet homogène. Il est constitué de deux parties bien distinctes : une gaine molle de chromatine et une structure rigide. Nous avons identifié les protéines SMC comme actrices de ces structures rigides. Nous avons aussi montré que l'ADN et les protéines sont nécessaires au maintien de l'organisation des chromosomes alors que l'ARN ne l'est pas. Nous avons aussi étudié le paysage énergétique du chromosome, ce qui n'avait jamais été réalisé sur un objet aussi complexe. Nous proposons un modèle dynamique de formation des chromosomes dans lequel les protéines SMC agissent comme médiatrices de la forme en bâtonnet des chromosomes mitotiques et dans lequel les ions  $Mg^{++}$  et  $Ca^{++}$  jouent le rôle d'agents de compaction.

#### **b. Résumé en Anglais ("Summary")**

A combination of two novel micropipette based techniques were used to measure the elasticity of an individual mitotic chromosome assembled in *Xenopus* egg extract. Our data show that the mitotic chromosome is not a homogenous object. It is constituted of two distinct parts: a soft chromatin envelope and inner rigid cores. The SMC proteins play a key role in the organization of the cores. We have also shown that both DNA and the proteins, but not RNA, are necessary for the maintenance of the chromosome structure. The energy landscape of the mitotic chromosome was also studied and new information for these complex objects was obtained. A dynamic model for the mitotic chromosome assembly was proposed. In this model the SMC proteins are responsible for the rod-like shape of the mitotic chromosomes while the bivalent ions  $\text{Ca}^{++}$  and  $\text{Mg}^{++}$  are essential for chromosome condensation.

### **3. Mots clés**

#### **a. Mots clés en français**

Xénope, chromosome, élasticité, structure, organisation, mitose, condensines, SMC, topoisomérase.

#### **b. Mots clés en anglais (“Keywords”)**

Xenopus, chromosome, elasticity, structure, organization, mitosis, condensins, SMC, topoisomerase.

### **4. Informations sur les laboratoires dans lesquelles la thèse a été préparée**

#### **a. Laboratoire de rattachement :**

Unité INSERM 309

Institut Albert Bonniot (IAB)

Domaine de la Merci

38706 La Tronche Cedex

France

Site internet : <http://www-iab.ujf-grenoble.fr/>

**b. Autre laboratoire**

Laboratoire de Spectrométrie Physique (LSP),

Bâtiment E

140, Avenue de la Physique

Domaine Universitaire de Grenoble

38402 St Martin d'Hères

France

Site internet : <http://www-lsp.ujf-grenoble.fr>

## **IV. Abréviations utilisées.**

$\nu$  : Coefficient de Poisson.

$\sigma$  : Contrainte.

$\varepsilon$  : Déformation.

$\sim$  : Environ, approximativement.

$\mu\text{m}\cdot\text{pixel}^{-1}_{X,Y}$  : Nombre de pixels par micromètre selon les axes X et Y.

ADP : **A**dénosine **di**-phosphate.

AFM : Microscope à force atomique.

AMP : **A**dénosine **mono**-phosphate.

ATP : **A**dénosine **tri**-phosphate.

BFP : Membrane biologique utilisée comme capteur de force.

Da : **D**alton.

FISH : Hybridation in situ avec un fluorochrome.

FJC : **F**ree **j**oint **c**hain.

H<sub>2</sub>O  $\Delta$  : Eau distillée (18,2 M $\Omega$ ) filtrée 0,22  $\mu\text{m}$ .

Ig : Immunoglobuline.

$\mathcal{K}$  : Constante de ressort.

$k_B$  : Constante de Boltzmann.

kb : **Kilobase**, millier de paires de bases.

L<sub>bb</sub> : **L**ongueur **b**out à **b**out d'un chromosome.

L<sub>c</sub> : **L**ongueur de **c**ontour d'un chromosome.

$\mathcal{L}_k$  : **L**inking number (nombre d'enlacement).

$\mathcal{L}_p$  : **L**ongueur de **p**ersistence.

Mb : **Mégabase**, million de paires de bases.

N : **N**ewton.

NA : **N**umerical aperture (ouverture numérique).

nN : **N**ano **N**ewton.

NTP : **N**ucléotide tri-phosphorylé (ATP, GTP, etc).

Ø : Diamètre.

Pa : **P**ascal.

pb : **P**aire de **b**ases.

PFA : **P**araformaldéhyde.

Pi : **P**hosphate inorganique.

pN : **P**iconewton.

PSF : **P**oint **s**pread **f**unction (fonction d'étalement de point).

$r$  : Rayon.

rpm : **R**ound **p**er **m**inute (tours par minute).

SAB : **S**érumalbumine de **b**œuf.

SDS : **S**odium **d**odécyl **s**ulfate.

$\mathcal{SM}$  : Stretch modulus.

SMC : **S**tructural **M**aintenance of **C**hromosome.

U : **U**nité enzymatique.

WLC : **W**orm like **c**hain.

XCAP : **X**enopus **C**hromosome **A**ssembly **P**rotein.

$\mathcal{Y}$  : Module de **Y**oung.

## **V. Introduction.**

### **1. Introduction générale sur la problématique**

Les chromosomes sont connus depuis la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. Néanmoins, nous ne savons encore que peu de choses sur leur mécanisme d'assemblage et leur maintien. Ils sont composés d'environ  $\frac{1}{3}$  d'ADN,  $\frac{1}{3}$  de protéines nommées histones et  $\frac{1}{3}$  de protéines non histones. Chez le *Xénope* (une grenouille originaire d'Afrique), leur longueur est d'environ 10  $\mu\text{m}$  pour un diamètre de l'ordre de 0,8  $\mu\text{m}$ .

Leur taille, leur densité et la multitude de protéines différentes qui les composent, en font des objets extrêmement difficiles à étudier par les techniques utilisées conventionnellement en biologie. La biochimie nous apporte des informations sur leur composition. Les microscopies de fluorescence et de lumière visible n'ont pas une résolution suffisante pour nous permettre d'accéder aux détails de leur organisation. Quant à la microscopie électronique, l'obtention d'images contrastées impose l'utilisation de protocoles relativement agressifs pouvant être à l'origine d'artefacts.

Au cours de cette introduction, je vais vous présenter les divers aspects de cette problématique. Cette introduction présente quatre parties. La première partie s'attache à décrire le contexte cellulaire dans lequel apparaissent les chromosomes. La seconde partie présente les différents niveaux d'organisation de l'ADN. Au cours de la troisième partie, je vous décrirai les différents constituants connus du chromosome et la quatrième partie vous exposera les moyens que je me propose d'utiliser afin d'apporter de nouvelles informations sur le maintien et l'organisation du chromosome.

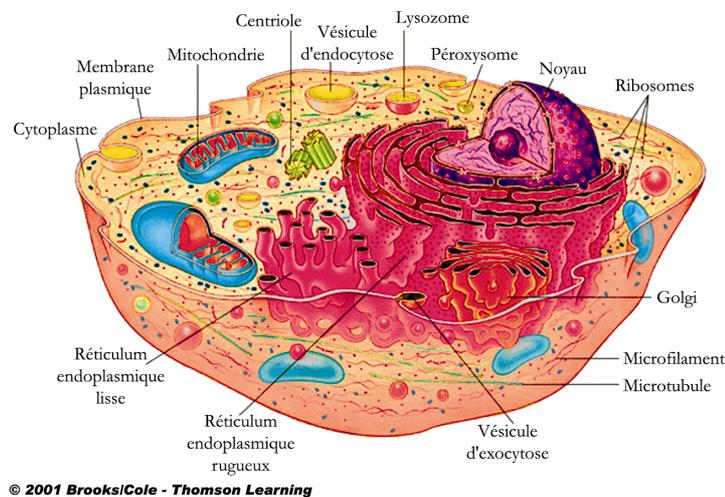
Ce travail se trouvant à l'interface physique/biologie, je me suis donc efforcé d'être compréhensible en même temps par des biologistes et par des physiciens, d'où des rappels qui peuvent sembler triviaux pour une communauté, alors qu'ils ne le sont pas pour l'autre.

## 2. Genèse des chromosomes<sup>1</sup>

La chromatine, c'est-à-dire l'ensemble « ADN + protéines », est une structure dynamique. Au cours de la vie de la cellule, cette structure est perpétuellement remodelée, permettant ainsi tour à tour à la cellule d'exprimer, de réprimer ou de perpétuer son patrimoine génétique.

### a. La cellule

La cellule eucaryote (cf. Figure V.1) est une fantastique machinerie. La membrane plasmique sépare l'intérieur de la cellule du milieu environnant. L'intérieur contient pour environ moitié du volume du cytoplasme : un liquide (ou gel) dans lequel baignent ions, sucres, protéines, ARN et différents organites. Les ribosomes, l'appareil de Golgi et les réticulums endoplasmiques lisses et rugueux concourent à la traduction des gènes. Le noyau de la cellule est le compartiment dans lequel se trouve la chromatine. Il occupe environ 10 % du volume cellulaire. Bien que non représenté dans la figure ci-dessous, un squelette protéique nommé cytosquelette parcourt la cellule dans toutes les directions et permet entre autres son maintien.



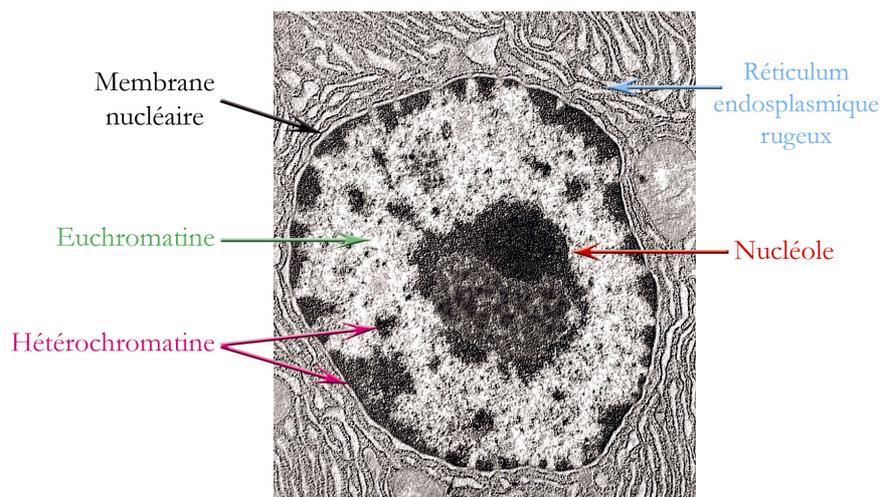
**Figure V.1 : Schéma d'une cellule eucaryote animale**

*Voir texte pour légende. (© Brooks/Cole –Thomson Learning).*

<sup>1</sup> Alberts B, 1994, "Molecular Biology of the Cell".

### **b. Le noyau**

Les cellules eucaryotes comme leur nom l'indique sont, à de rares exceptions près, pourvues d'un ou plusieurs noyaux. Le noyau a une forme arrondie (cf. Figure V.2) et est entouré d'une double membrane : la membrane nucléaire. L'ADN que contient le noyau n'est pas nu. Il est associé à diverses protéines et cet ensemble forme la chromatine. La chromatine peut être plus ou moins compactée selon le moment de la vie de la cellule ou son activité. L'hétérochromatine est de la chromatine relativement compacte et non traduite. L'euchromatine est, dans son ensemble, moins dense que l'hétérochromatine. Les zones les moins denses de l'euchromatine correspondent à des zones du génome aptes à être transcrites ou en cours de transcription. Le noyau peut comporter un ou plusieurs nucléoles. Le nucléole est le siège de l'assemblage des sous-unités ribosomales et est un lieu important de la transcription.



**Figure V.2 : Noyau d'une cellule eucaryote en interphase**

(<http://academics.hamilton.edu/biology/kbart/image/nucleus.jpg>.)

Cette image est un cliché de microscopie électronique. Le noyau d'une cellule eucaryote est entouré de la membrane nucléaire. La chromatine présente dans le noyau peut être compacte (hétérochromatine) ou peu compacte (euchromatine). L'hétérochromatine est localisée principalement en périphérie du noyau. Le nucléole, siège important de la transcription, apparaît comme une structure dense.

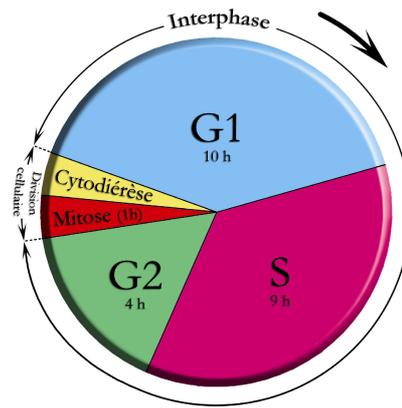
La chromatine du noyau est constituée de chromosomes interphasiques, des chromosomes encore peu compacts en comparaison aux chromosomes métaphasiques. Ces chromosomes sont au nombre de 46 chez l'homme et de 36 chez le *Xénope*. Ils possèdent des régions plus ou moins compactes. Quoique l'ADN nous apparaisse au premier abord inextricablement enchevêtré au sein du noyau, une certaine organisation en territoires chromosomiques existe (Belmont, 1999).

### **c. Le cycle cellulaire**

#### *Avant la mitose*

Au cours de la vie de la cellule, il y a différentes phases (cf. Figure V.3). Par exemple, grandir ou engendrer une copie d'elle-même. A l'exception de quelques types cellulaires comme les cellules nerveuses, les cellules se divisent. Evidemment, certaines cellules se divisent plus que d'autres. Les cellules embryonnaires se divisent toutes les heures alors que les cellules du foie se divisent 1 à 2 fois par an. A noter que ce sont tous deux des cas extrêmes. Un cycle cellulaire d'une cellule somatique mammifère dure environ 24 heures.

Lorsque la cellule lance le processus de division, elle est en phase  $G_1$ . La cellule croît alors en taille et synthétise tout le matériel protéique nécessaire à la survie des deux cellules-filles qui résulteront de la mitose. Au cours de la phase S qui suit, l'ADN et le centrosome sont dédoublés. Une fois la duplication finie, la cellule entre dans une phase où elle se prépare à être séparée en deux cellules-filles : la phase  $G_2$ , la dernière phase avant la division cellulaire. Au cours de cette phase, la cellule synthétise de nombreux facteurs dont notamment les facteurs nécessaires à la condensation de la chromatine en des chromosomes très compacts. Néanmoins, le passage de la phase  $G_2$  à la mitose (phase M) n'est pas clairement défini. Au cours de l'interphase, la chromatine s'est petit à petit condensée en chromosomes qui seront dans leur état le plus compact au cours de la phase M.



**Figure V.3 : Succession des différentes étapes d'un cycle cellulaire eucaryote d'environ 24 heures**

*Voir texte pour légende. (© Sébastien Almagro, 2003.)*

### *La mitose*

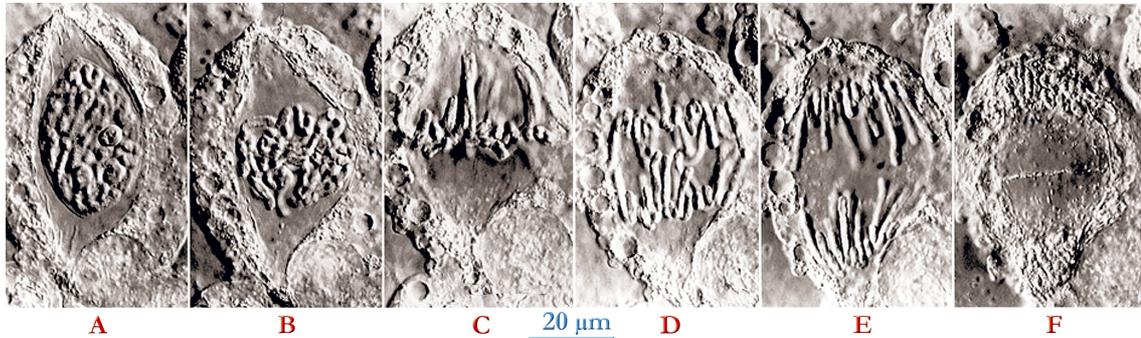
La prophase (cf. Figure V.4-A) marque le début de la mitose, et sa limite avec la phase G<sub>2</sub> n'est pas très claire. Au cours de cette étape, les microtubules cytoplasmiques se dépolymérisent et le fuseau mitotique (compris entre les deux pôles) commence à se former.

Ensuite, en prométaphase (cf. Figure V.4-B), l'enveloppe nucléaire disparaît et les kinétochores (situés au niveau du centromère de chaque chromosome) mûrissent. Les kinétochores de chaque paire de chromosomes restent appariés. La disparition de l'enveloppe nucléaire permet à des microtubules de se fixer au niveau des kinétochores et de relier chaque lot de chromosomes aux pôles.

En métaphase (cf. Figure V.4-C), les chromosomes se disposent sur le plan équatorial de la cellule. Une force est exercée par les microtubules sur les chromosomes provoquant leur séparation et leur rapprochement à chacun des pôles.

Au début de l'anaphase (cf. Figure V.4-D), les kinétochores de chaque lot de chromosomes homologues se séparent. Ceci provoque en quelques minutes la séparation des chromatides sœurs en deux lots distincts.

Puis finalement en télophase (cf. Figure V.4-E), les chromosomes sont fortement éloignés l'un de l'autre et commencent à se décondenser tandis que le noyau amorce sa reformation. C'est la fin de la mitose. Les deux cellules-filles se séparent lors de la cytotdiérèse (cf. Figure V.4-F) où un anneau contractile va permettre aux deux cellules de se séparer.



**Figure V.4 : Les étapes de la mitose et la cytotdiérèse**

(<http://www.biozentrum.unibas.ch/~izmb/atlas/htm/index2.htm>.)

Ces images sont des clichés successifs d'une cellule d'endosperme vivant (*Haemanthus katharinae*) observée par microscopie interférentielle différentielle. La mitose commence par la prophase (A) et est suivie par la prometaphase (B). En métaphase (C), les chromosomes se disposent sur un plan équatorial et sont séparés dès le début de l'anaphase (D). En télophase (E), les deux lots de chromosomes sont très bien séparés puis la chromatine se décondense et le noyau se reforme. La cytotdiérèse (F) marque la séparation des deux cellules-filles.

### ***Entrée en interphase***

Après la cytotdiérèse, chaque cellule entre en phase  $G_1$ . Trois choix s'offrent alors à elle :

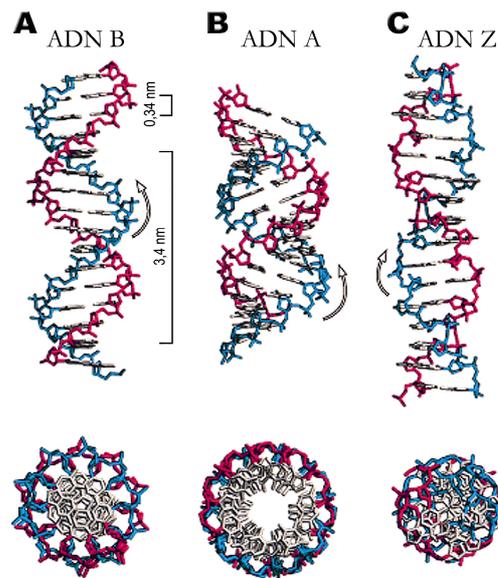
- Grandir, jouer son rôle puis mourir.
- Repartir dans un cycle de division ( $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$ )
- Entrer en phase  $G_0$ , une phase quiescente.

### **3. Les niveaux d'organisation de l'ADN**

Depuis l'année 1879, avec la description complète par W. Flemming des chromosomes et leur visualisation par coloration par T. Boveri et E. Strasburger un an plus tard, l'étude de l'organisation des chromosomes n'a jamais cessé. Elle fait, de nos jours, l'objet d'un très grand nombre de publications. Et pour cause ! Nous ne savons encore que très peu de choses concernant leur organisation. La découverte de l'ADN est bien plus tardive, mais notre connaissance au sujet de ce polymère est bien plus grande que celle que nous avons sur les chromosomes. De façon générale et comme cela vous sera montré au cours des chapitres suivants, notre connaissance de la structuration de la chromatine est inversement proportionnelle à la taille de l'échelle observée : les structures les plus petites sont les mieux connues. Quant à la structuration des chromosomes, un des stades les plus compacts de la chromatine, leur taille intermédiaire, leur densité, leur composition riche et hétéroclite en font des objets très difficiles à étudier. Raison pour laquelle nous ne savons encore que peu de choses sur leur organisation.

#### **a. L'ADN**

L'ADN est une double hélice d'environ 2 nm de diamètre. C'est un polymère très stable de 4 différents nucléotides. Ce polymère, principalement chargé négativement, peut avoir une très grande longueur, de l'ordre du cm chez l'homme ou le *Xénope*. Il existe plusieurs formes d'hélices d'ADN (cf. Figure V.5). Les conditions du milieu environnant (ex : salinité) et/ou la séquence nucléotidique peuvent affecter la forme de l'hélice.



**Figure V.5 : Trois différentes formes d'hélices d'ADN**

(<http://ww2.mcgill.ca/biology/undergra/c200a/sec2-1.htm>.)

**(A)** La forme B de l'ADN est la forme sous laquelle se présente le plus couramment l'ADN. Un tour d'hélice (10 bases) a une longueur de 3,4 nm. Cette hélice présente deux sillons (majeur et mineur). Les deux sillons sont à peu près également creusés, mais le sillon majeur est plus large. Comme indiqué au bas de la figure par la vue axiale, tous les nucléotides sont exposés vers l'extérieur. **(B)** La forme A de l'ADN est fréquente. Le grand sillon est présent alors que le petit est très écrasé et donc inaccessible. **(C)** La forme Z de l'ADN ou forme zigzag, est rare. Ses deux sillons sont de taille équivalente. Les hélices A et B sont des hélices droites alors que l'hélice Z est gauche.

Mais à l'intérieur de la cellule, l'ADN ne reste pas nu : des protéines et des ions s'associent à lui.

### ***b. La chromatine : vers une superstructure nucléoprotéique.***

#### ***Le nucléosome***

##### ***Les histones***

Les histones sont de petites protéines basiques d'environ 25 kDa. Ces protéines sont chargées positivement du fait de la présence d'un taux élevé d'arginine et de lysine. L'ADN étant chargé négativement, les interactions ADN/histones sont fortement favorisées. Il existe principalement 5 types d'histones :

- H2A (28 kDa), H2B (28 kDa), H3 (30 kDa) et H4 (22 kDa) nommées histones de cœur.
- H<sub>1</sub> (24 kDa) nommée histone de liaison.

A noter que, dans le cas de la chromatine embryonnaire de *Xénope*, l'histone H<sub>1</sub> est remplacée par l'histone B<sub>4</sub>. Les protéines histones sont des protéines très conservées au cours de l'évolution.

*Le nucléosome est l'unité basale de la chromatine*

Les histones de cœur peuvent s'associer à l'ADN pour former un nucléosome. Le nucléosome est formé de 146 pb qui font 1,65 tour autour d'un octamère d'histones avec un pas de 2 nm (Lewin, 1997 ; Luger, 1997 ; Rhodes, 1997 et cf. Figure V.6). Cet octamère a grossièrement l'aspect d'un cylindre de 6 nm de long pour 11 nm de diamètre, présentant des charges positives sur sa face externe.

Au sein de cet octamère, deux dimères H3-H4 interagissent pour former un tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> dont la présence est impérative pour le maintien de la structure nucléosomique. Ce tétramère interagit avec les deux dimères H2A-H2B.

Les histones possèdent des extrémités N-terminales de grandes tailles. Ces extrémités ne semblent pas être structurées. Il a été montré par exemple que l'acétylation/désacétylation de ces extrémités N-terminales pouvait influencer sur la transcription (Wolffe et Hayes, 1999 ; Khochbin, 2001 ).

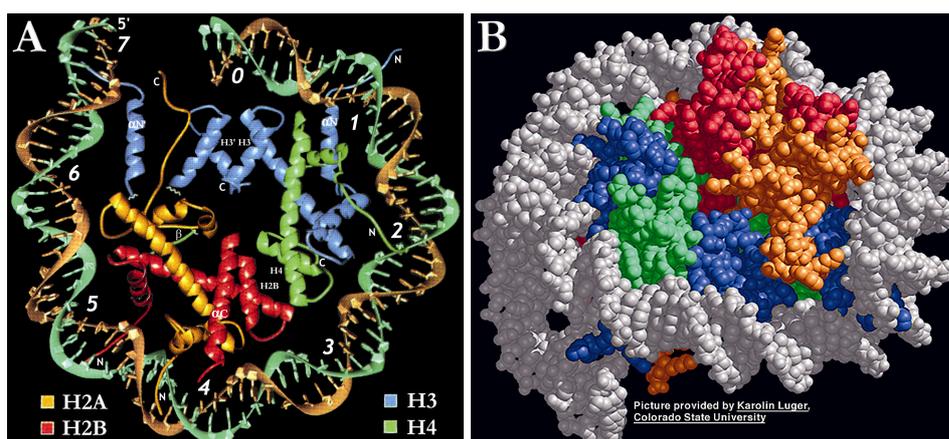
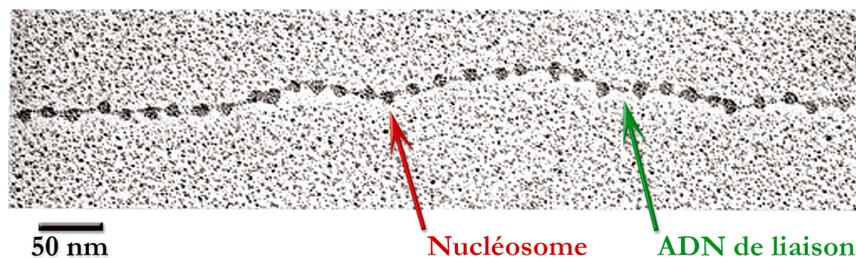


Figure V.6 : Structure cristallographique de la particule de cœur d'un nucléosome à 2,8 Å

**(A)** (Luger, 1997, <http://www.nature.com/>) Le nucléosome est regardé axialement. La moitié de l'octamère est visible. Les histones H2A (jaune), H2B (rouge), H3 (bleu) et H4 (vert clair) sont entourées d'une double hélice d'ADN (brins en vert et bronze). Les extrémités N-terminales sont marquées d'un N, les C-terminales d'un C. Les positions de 0 à 7 montrent la périodicité de la double hélice d'ADN. **(B)** (Propriété de Karolyn Luger.) Le nucléosome est regardé radialement avec une inclinaison. La totalité du nucléosome est visible. L'ADN apparaît en gris et les histones dans les mêmes couleurs que dans la figure (A). Les extrémités N-terminales des histones ne sont pas entièrement visualisables sur les deux figures car elles ne sont pas structurées.

### *Le nucléofilament*

Le nucléofilament représente la succession des nucléosomes le long de l'ADN (Thoma, 1979, cf. Figure V.7). Selon la séquence nucléotidique ou la présence de protéines structurantes de l'ADN, la longueur de l'ADN qui relie deux nucléosomes successifs (ADN de liaison) peut varier notamment selon les espèces. Cette longueur est comprise 8 et 116 pb (Luger, 1997). Le diamètre de cette structure est d'environ 11 nm. Il semble que les extrémités N-terminales des histones peuvent concourir à des interactions inter-nucléosomales entre entités spatialement proches.



**Figure V.7 : Cliché de microscopie électronique du nucléofilament**

(Propriété de Victoria Foe, [http://148.216.10.83/cellbio/chromosomal\\_dna.htm](http://148.216.10.83/cellbio/chromosomal_dna.htm))

Sur ce cliché de microscopie électronique apparaissent 32 nucléosomes (petites boules noires) le long d'une double hélice d'ADN. Chaque nucléosome de cœur est séparé de son voisin par de l'ADN de liaison.

A l'intérieur de la cellule, les conditions physiologiques normales et la présence de l'histone de liaison ( $H_1$  ou  $B_4$ ) ne permettent pas d'observer une telle structure. A noter que le nucléosome représente l'ensemble « octamère + 146 pb + ADN de liaison ». Ce qui a été nommé nucléosome auparavant ( « octamère + 146 pb ») représente la particule de cœur du nucléosome.

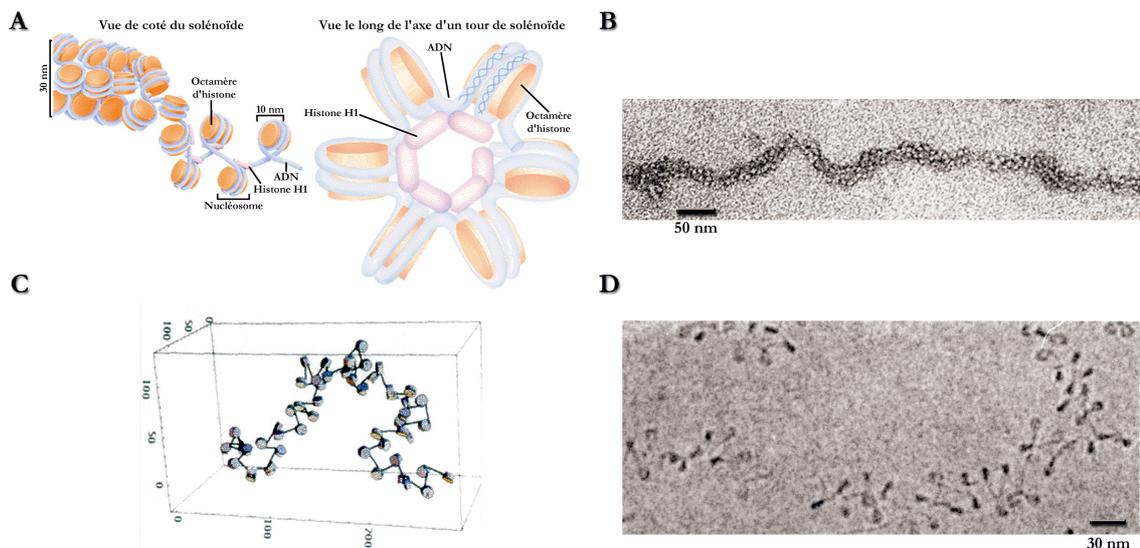
### *La fibre de 30 nm*

La fibre de 30 nm est la structure observée lorsque nucléofilament et histones de liaison sont mélangés dans des conditions ioniques physiologiques (Thoma, 1979 ; Bednar, 1998). Une histone de liaison interagit avec l'ADN de liaison au niveau de la zone où l'ADN entre et sort du nucléosome.  $H_1$  serait disposée de manière décalée par rapport au cœur du nucléosome (Zhou, 1998). Les extrémités N-terminales et C-terminales de  $H_1$  interagiraient avec l'octamère et l'ADN de liaison (Hamiche, 1996). Ces extrémités sont chargées positivement ce qui permettrait un écrantage des charges négatives de l'ADN (Clark et Kimura, 1990). Ainsi, les parties entrantes et sortantes de l'ADN peuvent mieux se rapprocher. L'ensemble de ces effets permettrait la formation de la fibre de 30 nm.

La structure de la fibre de 30 nm et le rôle de l'histone  $H_1$  (Leuba, 1998a ; Leuba, 1998b ; Carruthers et Hansen, 2000) sont des champs de la biologie cellulaire peu consensuels. Deux modèles d'organisation de la fibre de 30 nm ont le plus les faveurs de la littérature.

Le premier modèle est le modèle de la « fibre solénoïde de 30 nm » (Klug, 1985, cf. Figure V.8-A). Dans ce modèle, l'histone  $H_1$  courberait l'ADN de liaison et permettrait un agencement hélicoïdal du nucléofilament. Le pas de cette hélice serait de 6 nucléosomes (Klug, 1985, cf. Figure V.8-A, à droite). Le solénoïde ainsi créé (cf. Figure V.8-A, à gauche) expliquerait l'observation par microscopie électronique de la fibre de 30 nm (cf. Figure V.8-B).

Le second modèle se nomme « crossed linker model » (van Holde et Zlatanova, 1995 ; Bednar, 1998) ou modèle zigzag de la fibre de 30 nm. Dans ce modèle, l'ADN de liaison est rigide et le nucléofilament suit une trajectoire zigzagante de façon irrégulière (cf. Figure V.8-C). Ce modèle permettrait d'expliquer les observations de la fibre de 30 nm à faible salinité (cf. Figure V.8-D) où l'on voit une fibre étendue. De plus, il expliquerait le repliement de type « accordéon » de cette fibre étendue en une fibre condensée telle qu'observée à salinité physiologique (cf. Figure V.8-B). C'est ce modèle qui a les dernières faveurs en date de la littérature.



**Figure V.8 : Modèles de structure de la fibre de 30 nm**

(A) (Partie gauche, adaptée de Grunstein, 1992, <http://www.sciam.com/> ; Partie droite, adaptée de Klug, 1985 ; <http://www-biology.ucsd.edu/classes/bimm100.WI00/images/9-50.gif>) Modèle de la fibre solénoïde de 30 nm. L'histone H<sub>1</sub> interagirait avec l'ADN de liaison et induirait une courbure. Cette courbure entraînerait la disposition en une hélice de 30 nm de diamètre du nucléofilament. (B) (Propriété de Barbara Hamkalo, [http://148.216.10.83/cellbio/chromosomal\\_dna.htm](http://148.216.10.83/cellbio/chromosomal_dna.htm)) Cliché de microscopie électronique de la fibre de 30 nm à salinité physiologique. (C) (van Holde et Zlatanova, 1995, [www.jbc.org](http://www.jbc.org)) Modèle zigzag de la fibre de 30 nm. Dans ce modèle, l'ADN de liaison est droit. La chromatine prend alors une trajectoire en zigzag. (D) (Bednar, 1998, [www.pnas.org](http://www.pnas.org)) Cliché de cryomicroscopie électronique à 5 mM d'ion monovalent.

Le rôle de H<sub>1</sub> sur la compaction de la chromatine est à relativiser. Même si tout n'est pas encore clair, il a été montré que :

- Le blocage du gène qui code pour H<sub>1</sub> n'entraîne qu'une baisse de 50 % de compaction de la chromatine du noyau (Shen, 1995 ; Shen et Gorovsky, 1996).
- L'absence de l'histone H<sub>1</sub> n'influe pas sur le positionnement des nucléosomes (Karrer et VanNuland, 1999).
- L'absence d'histone de liaison n'empêche pas la formation des chromosomes (Ohsumi, 1993 ; Dimitrov, 1994).

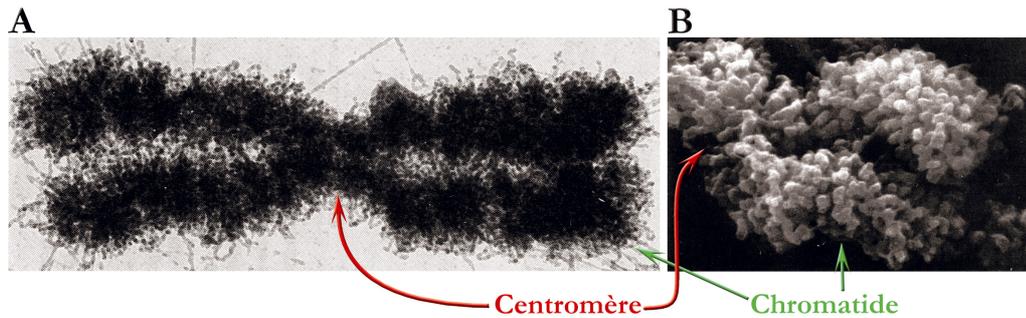
### **c. Les chromosomes**

La controverse fait rage en ce qui concerne l'organisation de la fibre de 30 nm. Mais pour ce qui concerne la structuration de la chromatine à des niveaux de compaction plus élevés, c'est le flou qui prédomine. Dans la littérature, il apparaît que le nombre de modèles d'organisation de celle-ci augmente *proportionnellement* avec le taux de compaction. Il est vrai que la complexité d'une telle structure augmente, elle aussi fortement.

#### *Problèmes techniques freinant l'étude de l'organisation des chromosomes*

Les structures les plus basses de la chromatine ont une taille et une nature mieux adaptée aux exigences de la microscopie électronique et/ou de la cristallographie. Il n'en va pas de même pour les structures plus grandes et plus denses telles que les chromosomes. Certes, il est possible d'observer par microscopie électronique le chromosome (Paulson et Laemmli, 1977 ; Marsden et Laemmli, 1979, cf. Figure V.9), mais les traitements infligés sur celui-ci pour obtenir du contraste sont très agressifs et l'interprétation des résultats peut être hasardeuse. En effet, de faibles changements de la composition ionique, par exemple, peuvent entraîner la compaction du chromosome (ex : ajout de Mg<sup>++</sup>) ou sa décompaction (Strick, 2001 ; Poirier, 2002b).

Les microscopies de lumière blanche et de fluorescence (y compris confocale) ne disposent pas d'une résolution suffisante pour permettre d'étudier les détails de l'organisation des chromosomes. Les structures les plus compactes, comme le chromosome mitotique ou le sperme, possèdent une telle densité de protéines et d'ADN que, quelle que soit la manière dont elles sont observées, il est impossible d'en visualiser l'intérieur.



**Figure V.9 : Clichés de microscopie électronique de chromosomes métaphasiques**

(Adaptée de Marsden et Laemmli, 1979, © Cell Press, [www.cell.com](http://www.cell.com), [http://148.216.10.83/cellbio/the\\_global\\_structure.htm](http://148.216.10.83/cellbio/the_global_structure.htm)) Ces deux images, (A et B), sont des clichés de microscopie électronique de chromosomes métaphasiques. Sur le cliché (A) les deux chromatides qui constituent le chromosome sont bien visibles. Elles sont reliées l'une à l'autre au niveau du centromère, une zone agrandie sur le cliché (B).

### *La fibre de 30 nm dans les niveaux d'organisation supérieurs*

Nous ne connaissons pas de structure intermédiaire entre la fibre de 30 nm et le chromosome interphasique ou mitotique. Quel que soit le modèle d'organisation du chromosome, la fibre de 30 nm est conservée dans la structure. Ces modèles expliquent la manière dont cette fibre s'agence pour former des niveaux de structuration supérieurs.

Une chose récurrente dans les modèles d'organisation des chromosomes, est la présence de grandes boucles (30 à 240 kb, taille variable selon les modèles et la phase du cycle cellulaire) constituées de chromatine sous la forme de fibre de 30 nm. Comme le laisse supposer le cliché B de la Figure V.9, le chromosome semble être formé de boucles ou « bulles » de chromatine. La mise en évidence de ces dernières a été possible grâce au phénomène de décompaction réversible des chromosomes lors de la diminution de la concentration en cations divalents tels que  $Mg^{++}$ . Le fait de pouvoir moduler de cette façon la compaction du chromosome permet l'observation de l'intérieur de cet objet dense au départ. Le résultat consiste en un « échevellement » du chromosome présentant ainsi de grandes boucles de chromatine.

Le chromosome mitotique (cf. Figure V.2 et Figure V.9) représente un des niveaux les plus compacts de la chromatine. Mais existe-t-il une structuration intermédiaire de la chromatine entre le niveau de la fibre de 30 nm et le niveau du chromosome mitotique ? Afin de répondre à cette question, regardons tout d'abord l'organisation à grande échelle de la chromatine dans le noyau.

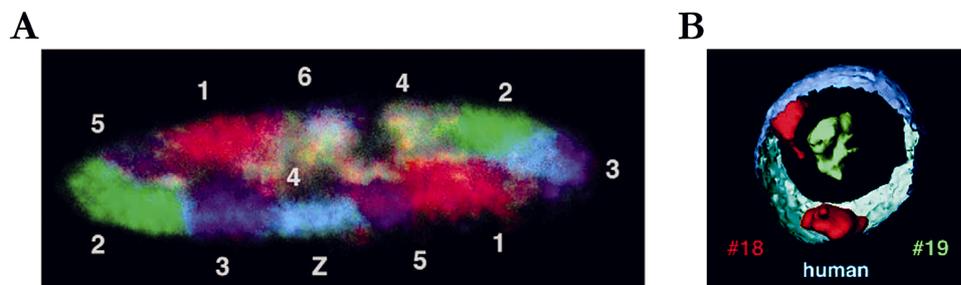
#### *Organisation à grande échelle de la chromatine interphasique*

Des expériences, notamment de microscopies (Sadoni, 1999 ; Tanabe, 2002a) ont permis de mettre en évidence qu'une structuration à grande échelle de la chromatine interphasique (cf. Figure V.2, p19) existe. La chromatine interphasique de chaque chromosome se répartit majoritairement en certaines zones précises du noyau. Ces zones sont appelées *territoires chromosomiques*. Ces territoires correspondent à des chromosomes interphasiques.

Bien que ces *masses* de chromatine soient distinctes, il semble qu'elles puissent s'interpénétrer (Cremer, 2000 ; Cremer et Cremer, 2001). Il a été montré que l'arrangement radial des territoires chromosomiques est corrélé à la séquence nucléotidique qu'ils contiennent (Sun, 2000 ; Cremer, 2001) et à leur densité de gène (Croft, 1999 ; Cremer, 2001).

Plus précisément, il a été notamment montré (Croft, 1999 ; Tanabe, 2002a) dans des lymphocytes en prolifération que le chromosome humain 18 (contenant une chromatine pauvre en gènes) se situait à la périphérie du noyau et interagissait avec les lamines nucléaires, alors que le chromosome humain 19 (chromosome humain le plus riche en gènes) était situé près du centre du noyau et n'interagissait pas avec les lamines nucléaires. Ceci est illustré dans la Figure V.10-B. Ce type de localisation a aussi été montré dans le noyau de fibroblaste de poulet (Habermann, 2001, cf. Figure V.10-A) où les chromosomes contenant le plus de gènes transcrits sont localisés au centre du noyau alors que les chromosomes qui en contiennent le moins sont en périphérie. Ceci est tout à fait en accord avec l'observation des positionnements de l'hétérochromatine et de l'euchromatine comme visible sur la Figure V.2.

Concernant l'intérêt biologique d'une telle répartition des chromosomes, il a été postulé par le passé (Hsu, 1975) que l'hétérochromatine jouait un rôle de « bouclier » protégeant l'intérieur du noyau, mais cela n'a toujours pas été confirmé (Tanabe, 2002a). Une autre explication plus récente de cette organisation des chromosomes serait que les lamines nucléaires joueraient un rôle de structuration de l'hétérochromatine (Cook, 1995).



**Figure V.10 : Organisation de la chromatine interphasique en territoires chromosomiques**

(A) (d'après Habermann, 2001, <http://www.kluweronline.com/issn/0967-3849> ). Cette image provient d'une reconstruction en 3 dimensions d'un noyau de fibroblaste de poulet dont les certains chromosomes ont été marqués par *FISH*. Le numéro ou la lettre qui définit chaque chromosome est indiqué à côté de la zone colorée respective dudit chromosome. (B) (d'après Tanabe, 2002b, [www.elsevier.com/locate/molmut](http://www.elsevier.com/locate/molmut)). Reconstruction en 3 dimensions des territoires chromosomiques des chromosomes humains 18 (en rouge) et 19 (en vert) de noyau de lymphocyte en prolifération.

A la vue de ces résultats, il semble évident qu'une structuration de la chromatine entre la fibre de 30 nm et le chromosome mitotique existe. Quels sont donc les détails de l'organisation de telles structures ?

### *Modèles d'organisation des chromosomes interphasiques*

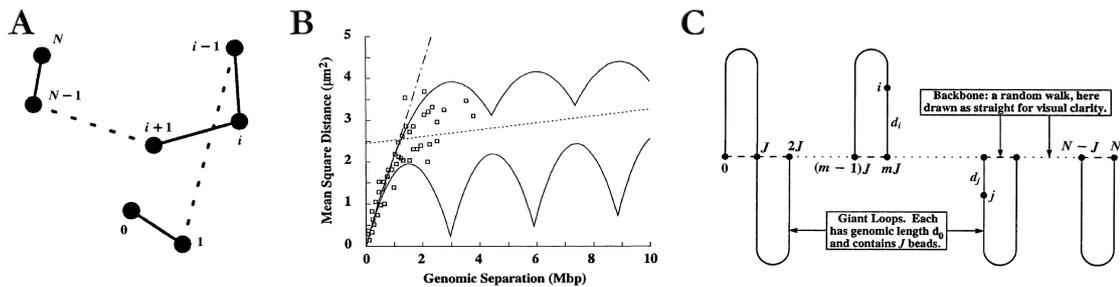
Durant l'interphase, la chromatine est plus ou moins condensée selon les régions du noyau (cf. V.2.b et c). L'hétérochromatine, qui est de la chromatine très compacte, environ 1 000 fois plus compacte que l'ADN nu, est visible mais sa structuration est impossible à observer en détail du fait de sa densité. L'euchromatine, la chromatine présentant une activité transcriptionnelle relativement importante, est moins compacte. Mais la quantité de matière qui y est présente est toujours suffisamment grande pour ne laisser apparaître qu'un enchevêtrement inextricable de fibres dont il est impossible de voir finement la structuration à l'échelle du chromosome interphasique. Il existe un grand nombre de modèles d'organisation du chromosome interphasique. Tous ne seront pas présentés en détail au cours de ce chapitre.

*Modèle de « marche au hasard / boucles géantes » du chromosome interphasique*

Ce modèle (Ostashevsky et Lange, 1994 ; Sachs, 1995) est basé sur l'observation générale de la disposition de la chromatine durant les phases  $G_0/G_1$ . Les observations effectuées sont à l'échelle de 0,1 à 300 Mb. Ce modèle étudie le positionnement relatif de différents marqueurs fluorescent de séquences d'ADN (cf. Figure V.11-A). La statistique est effectuée en prenant ces mesures sur un grand nombre de noyaux et la moyenne des carrés des distances qui séparent les marqueurs est obtenue (cf. Figure V.11-B). A l'issue de ces mesures, les auteurs observent deux régimes de déplacement des marqueurs les uns par rapport aux autres :

- Un régime aux faibles distances (0,1 Mb), où les zones du chromosome interphasique se déplacent aléatoirement les unes par rapport aux autres. Ceci indiquant que la chromatine à cette échelle serait un empilage aléatoire.
- Un régime aux grandes distances (2 à 200 Mb), où les zones du chromosome interphasique ne semblent plus bouger aléatoirement les unes par rapport aux autres, suggérant la présence d'une superstructure.

L'explication la plus simple de ces résultats suggérée par les auteurs est que le chromosome serait formé de grandes boucles de chromatine (~ 3 Mb) fixées les unes aux autres par des protéines de liaison (cf. Figure V.11-C). Ces mesures sont tout à fait en accord avec l'existence de territoires chromosomiques dans le noyau (cf. p31).



### Figure V.11 : Modèle d'organisation de marche au hasard/boucles géantes du chromosome interphasique

(Adaptée de Sachs, 1995, [www.pnas.org](http://www.pnas.org))

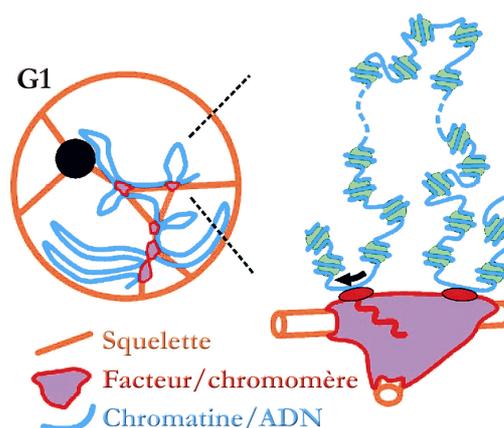
(A) Illustration de la technique de mesure. Les boules noires (« beads ») représentent les points marqués par le colorant. Les points 0 et  $N$  correspondent aux télomères du chromosome. Les segments de chromatine qui relient deux points sont représentés schématiquement par des traits (s'ils sont successifs) ou par des pointillés (si la distance est supérieure à deux marqueurs). (B) Résultat des mesures de distance entre marqueurs. Sur ce graphique est représentée la moyenne des carrés des distances entre marqueurs en fonction de la longueur d'ADN qui les sépare. La droite en pointillés représente les valeurs d'un modèle de marche au hasard et les deux courbes en trait plein représentent les valeurs pour un modèle de chromosome formé de grandes boucles de chromatines. Les mesures sont représentées par des carrés creux. (C) Modèle de « marche au hasard / boucles géantes » du chromosome interphasique. Les boucles de chromatines (en formes de U) sont reliées les unes aux autres par l'intermédiaire de protéines. Ce schéma montre que les boucles sont reliées à un seul axe mais cela est totalement arbitraire.

*Modèle « chromomérique » du chromosome interphasique*

Il a été montré (Jackson et Cook, 1988 ; Hozak, 1995) que les lamines, des protéines membres de la famille des filaments intermédiaires qui semblent soutenir la membrane nucléaire (Gerace et Burke, 1988), font partie du squelette interne du noyau. Il a été aussi montré que des boucles de chromatine se fixaient sur ce *nucléo-squelette* (Jackson, 1990). De plus, il a été montré que ces boucles sont reliées par l'intermédiaire de facteurs de transcription et du complexe de transcription de l'ADN, au *nucléo-squelette* (Jackson et Cook, 1985 ; Hozak, 1993 ; Jackson et Cook, 1993).

L'auteur (Cook, 1995) a utilisé une technique d'encapsidation dans l'agarose, lui permettant ainsi de piéger les constituants nucléaires tout en détruisant la membrane plasmique. Des coupes ont ensuite été réalisées dans la matrice d'agarose. Le matériel nucléaire devient ainsi accessible à des sondes fluorescentes. Ces coupes ont été aussi observées par microscopie électronique. Il résulte de ces observations que le chromosome interphasique serait ancré au *nucléo-squelette* par l'intermédiaire de facteurs de transcriptions et d'ARN polymérase (= chromomères) : c'est le modèle chromomérique du chromosome interphasique.

Contrairement à certains modèles dans lesquels la structure du squelette semble figée, ce modèle-ci propose une vision plus dynamique de la charpente du chromosome. En effet, les zones non transcrites seraient compactées de manière permanente, alors que les zones transcrites seraient associées à l'ARN polymérase et à des facteurs de transcriptions.



**Figure V.12 : Modèle chromomérique du chromosome interphasique**

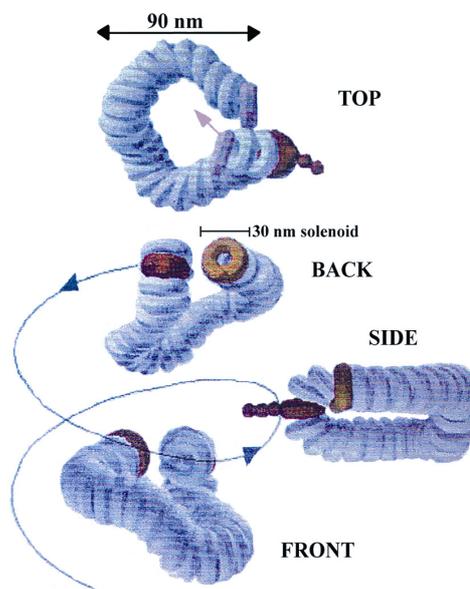
(Adaptée de Cook, 1995, <http://jcs.biologists.org/>)

Au cours de la phase G1, les lamines nucléaires formeraient un squelette. Au niveau des nœuds de ce *nucléo-squelette*, se fixeraient les facteurs de transcription et l'ARN polymérase. La transcription aurait lieu au niveau de ces nœuds (partie droite de la figure). Les zones trop éloignées de ces nœuds seraient de l'hétérochromatine.

#### *Modèle de « repliement hiérarchisé de l'ADN » du chromosome interphasique*

Les dimensions des gènes et de la fibre de 30 nm (Finch et Klug, 1976 ; van Holde, 1989) sont le point de départ de ce modèle de repliement hiérarchisé de l'ADN. Un tour de fibre solénoïde de 30 nm (cf. Figure V.8-A, p28) fait environ 1,2 kb, ce qui représente moins que les plus petits cadres de lecture de la transcription. Les gènes fonctionnels ont une taille comprise entre 30 kb et plus de 1 Mb. L'auteur (Manuelidis, 1990) indique que ces plus petits domaines (30 kb) correspondraient aux boucles et que les domaines plus grands (0,3 à plus de 3 Mb) correspondraient aux bandes colorables des chromosomes. Selon l'auteur, l'observation par microscopie du noyau interphasique de la cellule montre la présence d'une fibre de 250 nm de diamètre dans l'hétérochromatine (Sedat et Manuelidis, 1978).

Dans ce modèle, la fibre solénoïde de 30 nm formerait des boucles d'environ 30 à 60 kb (cf. Figure V.13 « Top »). Ces boucles s'agenceraient de façon hélicoïdale et seraient ainsi à la base d'une fibre de 250 nm de diamètre (cf. Figure V.13 « Back, Side & Front »). Un tour de boucle aurait donc une épaisseur de 60 nm. Cette fibre de 250 nm, ancrée à une matrice protéique (Nelson, 1986), serait à l'origine de l'hétérochromatine, c'est-à-dire de la chromatine peu ou pas transcrite. L'euchromatine serait formée d'une forme moins condensée de la chromatine, comme des boucles de 30 kb. L'ensemble formerait le chromosome interphasique.



**Figure V.13 : Modèle de repliement hiérarchisé du chromosome interphasique**

(Adaptée de Manuelidis, 1990, [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org))

Dans ce modèle, la fibre de 30 nm s'agencerait de manière hélicoïdale et formerait des boucles de 90 nm de long (« Top »). Ces boucles de 90 nm seraient, elles-mêmes, disposées hélicoïdalement (« Back-Side-Front ») et constitueraient ainsi une fibre de 250 nm de diamètre.

### *Modèles d'organisation des chromosomes métaphasiques*

Au cours de la mitose, toute la chromatine interphasique se condense en chromosomes mitotiques (= chromosomes métaphasiques). Les chromosomes mitotiques sont des structures extrêmement denses dans lesquelles l'ADN est compacté environ 10 000 fois. Cette partie, tout comme la précédente, n'a pas vocation à être un catalogue exhaustif des modèles car il en existe aussi une multitude. Le but de cette partie est de présenter diverses hypothèses sur ce sujet.

#### *Le modèle « loops + scaffold » du chromosome mitotique*

Ce modèle (Saitoh et Laemmli, 1994, cf. Figure V.14-A) est principalement basé sur le résultat de l'expérience suivante (Paulson et Laemmli, 1977) : les histones sont progressivement enlevées des chromosomes mitotiques par compétition en présence d'un excès de polyanions (sulfate de dextrane et héparine) dans un tampon de basse force ionique. Au cours de ce processus, les histones chargées positivement se décrochent de l'ADN pour s'associer aux très nombreux polyanions fortement chargés négativement. Le résultat de cette expérience est présenté dans la Figure V.14-B.

Malgré l'enlèvement de toutes les histones et d'une grande partie des protéines non-histones, l'ADN chromosomique ne devient pas linéaire : le chromosome devient un squelette filiforme entouré d'un halo d'ADN. Des boucles d'ADN (« loops ») de 50 à 100 kb (Laemmli, 1978b ; Laemmli, 1978a) semblent être accrochées à un squelette protéique (« scaffold ») formé de protéines non-histones. Une chose est importante : les boucles apparaissent également dans cette expérience, tout comme dans l'expérience décrite dans le chapitre « *La fibre de 30 nm dans les niveaux d'organisation supérieurs* » (p30), laissant supposer que cette méthode d'extraction des histones n'est pas artéfactuelle.

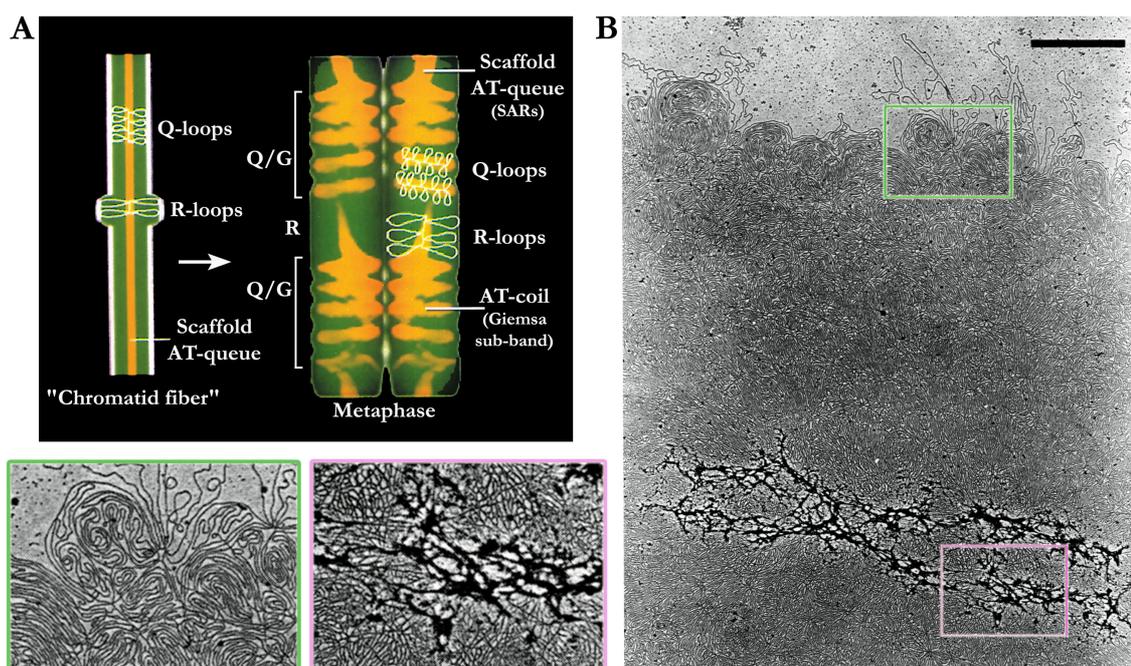
Deux protéines ont pu être identifiées comme membres possibles du squelette :

- La topoisomérase II (Earnshaw, 1985 ; Earnshaw et Heck, 1985 ), une enzyme nécessaire à la formation des chromosomes. Elle sera présentée plus longuement chapitre V.4.a (p52).

- SCII (Saitoh, 1994), une protéine avec une activité ATPasique, deux sites (A et B) de liaison aux NTP. Elle a une structuration similaire à une protéine de *S. cerevisiae* nommée SMC1p et dont l'activité semble être d'assurer une bonne ségrégation des chromosomes (Strunnikov, 1993). Les protéines SMC seront décrites plus longuement au cours du chapitre V.4.b (p56).

Les segments d'ADN liés au squelette ont été nommés SARs pour **Scaffold Associated Regions** (Gasser, 1986 ; Laemmli, 1992 ; Saitoh, 1994 ; Paul et Ferl, 1999 ). Les séquences SARs ont une longueur d'environ 1 kb et sont riches en nucléotides A et T, avec de courtes répétitions de A ou T nommées *A-tracts*. L'interaction spécifique des SARs avec les protéines du squelette est due non pas à une séquence spécifique mais à la structure de l'ADN affectée par ces *A-tracts* (sillon mineur très étroit et courbure de l'ADN). En colorant spécifiquement ces segments SARs, les auteurs observent par microscopie optique confocale et reconstruction d'image que ces séquences semblent être disposées radialement selon une hélice irrégulière le long du chromosome, et suggèrent que les boucles fixées au squelette sont à l'origine de cette apparence hélicoïdale (Saitoh et Laemmli, 1994).

Dans ce modèle, le chromosome mitotique dériverait d'un chromosome interphasique (donc moins dense que le mitotique) dont l'ADN serait lié à des protéines du squelette. Ces protéines ne seraient pas, lors de l'interphase, liées les unes aux autres pour former un squelette cohérent.



**Figure V.14 : Modèle « loops + scaffold » d'organisation du chromosome**

**(A)** (Adaptée de Saitoh et Laemmli, 1994, [www.cell.com](http://www.cell.com)) Modèle d'organisation « loops +scaffold » du chromosome. La chromatide (à gauche) serait formée d'un squelette protéique sur lequel se fixeraient des boucles de chromatine plus (bandes R) ou moins (bandes Q) grandes. Ces boucles se fixeraient sur le squelette par l'intermédiaire de séquence SARs riches en A et T. **(B)** (Adaptée de Paulson et Laemmli, 1977, [www.cell.com](http://www.cell.com)) Cliché de microscopie électronique d'un chromosome mitotique dont les histones ont été enlevées. Taille de la barre d'échelle : 2  $\mu\text{m}$ . Des boucles d'ADN d'environ 50 à 100 kb sont reliées à une structure d'apparence squelettique formée de protéines non-histones. Les zones, encadrées en vert et en rose en bas à gauche de la figure, correspondent à des agrandissements des zones de mêmes couleurs de la figure (B).

Le problème de ce modèle est que les chromosomes utilisés dans l'expérience de remplacement des histones, sont des chromosomes extraits de la cellule à l'aide de protocoles biochimiquement agressifs. Ils ont donc été *au minimum* partiellement dépliés.

De plus, la présence d'une faible force ionique diminue l'écrantage des charges. Ainsi, des interactions protéines/protéines ou protéines/ADN qui n'existent pas dans le chromosome natif peuvent être créées, d'où la probabilité non nulle d'une précipitation de certaines protéines. L'observation, par microscopie confocale et reconstruction d'image de la disposition des séquences SARs, montre une disposition hélicoïdale de ces dernières (Saitoh et Laemmli, 1994). Mais la résolution de la microscopie confocale et le risque d'artefact, lors de la reconstruction d'image, rendent cette information peu sûre.

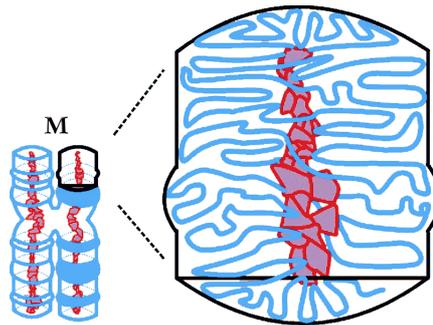
A noter aussi que les auteurs montrent que la topoisomérase II est localisée selon la même trajectoire hélicoïdale (Saitoh et Laemmli, 1994) et pensent ainsi que cette dernière fait partie du squelette. Il a été montré plus tard que la topoisomérase II ne jouait aucun rôle dans la morphologie du chromosome (Hirano et Mitchison, 1993), mettant en doute son rôle dans le squelette. Il est aussi possible que cette localisation de la topoisomérase II ne soit qu'un pur artefact de reconstruction d'image.

Il faut noter que la présence de ces boucles radiales liées à un squelette protéique ont été confirmées par d'autres équipes à l'aide d'autres techniques telles que l'hybridation *in situ* (Bickmore et Oghene, 1996), le « banding » (Saitoh et Laemmli, 1994) ou l'immunofluorescence (Earnshaw et Laemmli, 1983 ; Boy de la Tour et Laemmli, 1988). Mais le problème reste que les structures sont observées par microscopie et visualiser les détails de l'organisation réclame une technique à plus haute résolution spatiale.

#### *Modèle « chromomérique » du chromosome mitotique*

Ce modèle chromomérique du chromosome mitotique (Cook, 1995) est le pendant « métaphasique » du modèle chromomérique du chromosome interphasique (cf. p36 et Figure V.12).

Dans ce modèle (cf. Figure V.15), lors de l'entrée en mitose, la transcription cesse. Les nucléosomes et les chromomères s'agrègent ensemble pour former une sorte de cylindre nucléosomale entourant un axe chromomérique (Cook, 1995). En dépit de ce réarrangement, les boucles de chromatine restent fixées aux facteurs/chromomères. Il résulte donc de ce réarrangement une linéarisation du chromosome interphasique qui devient alors un chromosome métaphasique.



**Figure V.15 : Modèle chromomérique du chromosome mitotique**

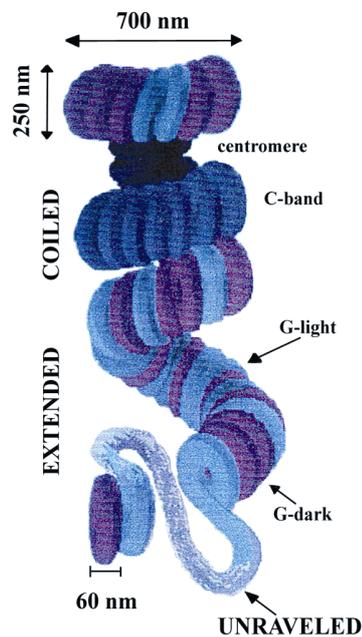
(Adaptée de Cook, 1995, <http://jcs.biologists.org/>)

La chromatine est représentée en bleu et l'ensemble facteurs/chromomères en rouge/violet. *Voir texte pour légende.*

*Le modèle de « repliement hiérarchisé de l'ADN » du chromosome mitotique*

Ce modèle de « repliement hiérarchisé de l'ADN » du chromosome mitotique (Manuelidis et Chen, 1990 ; Manuelidis, 1990) est le pendant « métaphasique » du modèle de « repliement hiérarchisé de l'ADN » du chromosome interphasique (cf. p37 et Figure V.13).

Lors de l'entrée en mitose et selon ce modèle, l'euchromatine (cf. Figure V.13) se condenserait en hétérochromatine. Le chromosome mitotique serait issu du repliement hélicoïdal de la fibre de 250 nm constituant l'hétérochromatine (Manuelidis, 1990 ; Rattner, 1992, cf. Figure V.16). Le diamètre de cette nouvelle hélice serait de 700 nm, soit approximativement le diamètre d'une chromatide. L'existence des différentes bandes de coloration observables sur le chromosome mitotique serait expliquée, selon ce modèle, par des zones de surenroulement plus ou moins fort de cette fibre de 250 nm (cf. Figure V.16 « C-band », « G-light » et « G-dark ») sur elle-même.



**Figure V.16 : Modèle d'organisation en « repliement hiérarchisé de l'ADN » du chromosome mitotique**

(Adaptée de Manuelidis, 1990, [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org))

Cette fibre de 250 nm serait, elle aussi, disposée hélicoïdalement et formerait une hélice de 700 nm de diamètre qui constituerait une chromatide du chromosome mitotique.

Le problème de ce modèle est qu'il découle pour beaucoup d'observations effectuées par microscopie de fluorescence de structures de taille inférieure à la résolution optique. L'extrapolation de ce genre de résultat, comme expliqué précédemment, est plutôt hasardeuse. Un autre problème de ce modèle est que cette succession d'enroulements hélicoïdaux impose de très fortes contraintes sur la fibre de 30 nm ce qui le rend peu probable (Cook, 1995).

*Le modèle « axes rigides + gaine molle de chromatine » du chromosome mitotique*

Ce modèle (Houchmandzadeh et Dimitrov, 1999) est basé sur des mesures d'élasticité de chromosomes. Chaque mesure est effectuée sur chromosome unique. Le but de ces mesures directes est d'observer les propriétés du chromosome dans son entier et d'en déduire l'organisation sous-jacente générale. Ce type de mesures ne permet pas de donner la structure exacte de l'objet, mais il permet d'étudier sa cohésion, son maintien. Ainsi, il est possible de mettre à l'épreuve les différents modèles proposés dans la littérature et d'obtenir diverses informations sur l'organisation générale du chromosome. Ceci permettant l'ébauche d'un modèle très général du chromosome.

Dans un premier temps, l'observation des fluctuations du chromosome à température ambiante permet d'obtenir la résistance à la courbure de ce dernier. Ce paramètre élastique permet de savoir si le chromosome mitotique peut se plier facilement ou pas. Ce paramètre élastique peut être exprimé par la longueur de persistance  $\mathcal{L}_p$ , qui représente la longueur au bout de laquelle l'effet d'une force ne sera plus ressenti (cf. chapitre V.5.e). La valeur obtenue est de  $2,7 (\pm 0,1) \mu\text{m}$ , soit environ  $\frac{1}{4}$  de la longueur totale du chromosome.

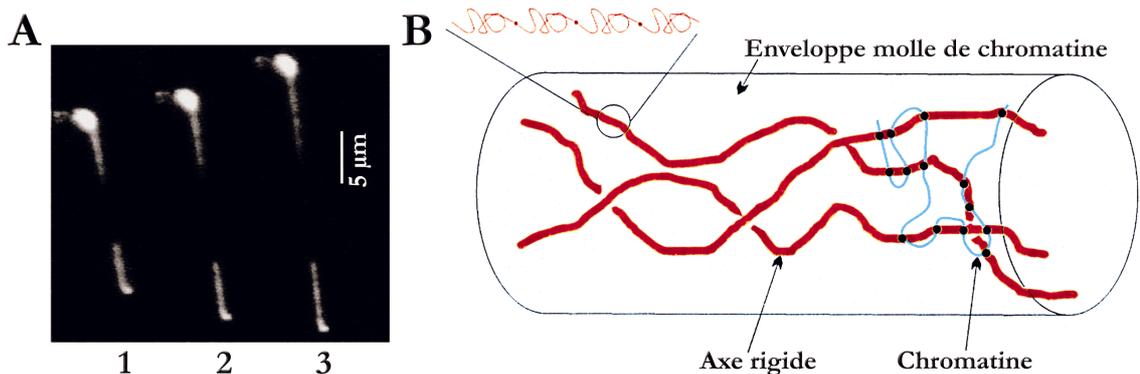
Le chromosome est ensuite saisi des deux côtés à l'aide de deux micropipettes, et la force nécessaire pour l'étirer est mesurée. Le module de Young ( $\mathcal{Y}$ ) représente la force nécessaire pour doubler la longueur d'un chromosome de section donnée dans des conditions réversibles. La valeur obtenue est de 1 100 Pa. Le chromosome est un objet extrêmement flexible : Il peut être étiré plus de 1 000 fois sa longueur sans se casser.

Comme expliqué plus en détail dans le chapitre V.5.e,  $\mathcal{Y}$  et  $\mathcal{L}_p$  sont reliés pour un objet homogène par la relation :  $\mathcal{L}_p = \frac{c \cdot \mathcal{Y} \cdot r^4}{k_B \cdot T}$ , où  $r$  est le rayon de l'objet et  $c$  un coefficient de forme de l'ordre de à 1 dans le cas du chromosome.

Or les valeurs obtenues expérimentalement pour  $\mathcal{Y}$  et  $\mathcal{L}_p$  montrent que le chromosome est environ 2 000 fois plus souple qu'il ne devrait l'être s'il était homogène. La façon la plus simple que propose les auteurs pour expliquer cette différence de trois ordres de grandeur, est que le chromosome serait un objet formé de deux parties (cf. Figure V.17-B) :

- Un ou plusieurs axes fins ( $r_{total} \leq 10$  nm) résistants à l'étirement et facilement pliables. Ces axes seraient capables de libérer de la longueur sous la contrainte.
- Une gaine molle de chromatine, facilement pliable et très peu résistante à l'étirement. Cette gaine serait reliée en certains points aux axes fins.

Parfois, au cours d'un étirement, une partie du chromosome devient invisible car trop fine. Ce qui est un argument en faveur de l'existence d'axes fins (cf. Figure V.17-A). A noter que la présence dans les chromosomes d'une protéine nommée titine (présentée plus longuement p76) a été mise en évidence récemment (Machado, 1998). Notre laboratoire s'est procuré auprès des auteurs de Machado, 1998 l'anticorps qui a permis la mise en évidence de la présence de titine dans les chromosomes. Nous n'avons pas pu reproduire ce résultat en suivant leur protocole. Notons que l'anticorps fourni ne marquait même pas des cellules musculaires.



**Figure V.17 : Modèle « axes rigides + gaine molle de chromatine » du chromosome mitotique**

(Houchmandzadeh et Dimitrov, 1999, [www.jcb.org](http://www.jcb.org))

**(A)** Cette figure montre 3 images successives (1, 2 et 3) d'un même chromosome au cours d'un étirement. Le chromosome est attrapé par chacune de ses extrémités. L'image est prise en fluorescence et c'est l'ADN qui est visualisé grâce à la présence d'Hoechst 33258. Une zone non visible en fluorescence et en contraste de phase apparaît lors de l'étirement. Elle augmente d'autant plus que le chromosome est étiré (1 → 2 puis 2 → 3). Pourtant le chromosome ne casse pas. Ce qui indique qu'un lien matériel résistant, peu dense et/ou très fin, présent dans le chromosome, est mis à jour. **(B)** Schéma explicatif du modèle « axes rigides + gaine molle de chromatine » du chromosome mitotique. Le chromosome mitotique serait formé d'axes fins entourés d'une gaine molle de chromatine. La chromatine se lie aux axes en divers points. Les axes contiendraient des domaines susceptibles de fournir de la longueur sous la contrainte.

Concernant ce modèle, il faut noter que les chromosomes utilisés pour ces expériences sont des chromosomes embryonnaires. C'est-à-dire des chromosomes qui doivent se faire et se défaire presque toutes les heures. Il est possible d'imaginer que ces chromosomes ne soient pas encore « mûrs ». Mais il est nécessaire de préciser que les chromosomes utilisés au cours des expériences ne peuvent plus se décompacter une fois formés car le système de chromosomes mitotiques assemblés *in vitro* de *Xénopus* permet de figer les chromosomes dans un état proche de celui de l'anaphase II (Smythe et Newport, 1991). Ce système d'étude est présenté plus longuement au cours du chapitre V.5.

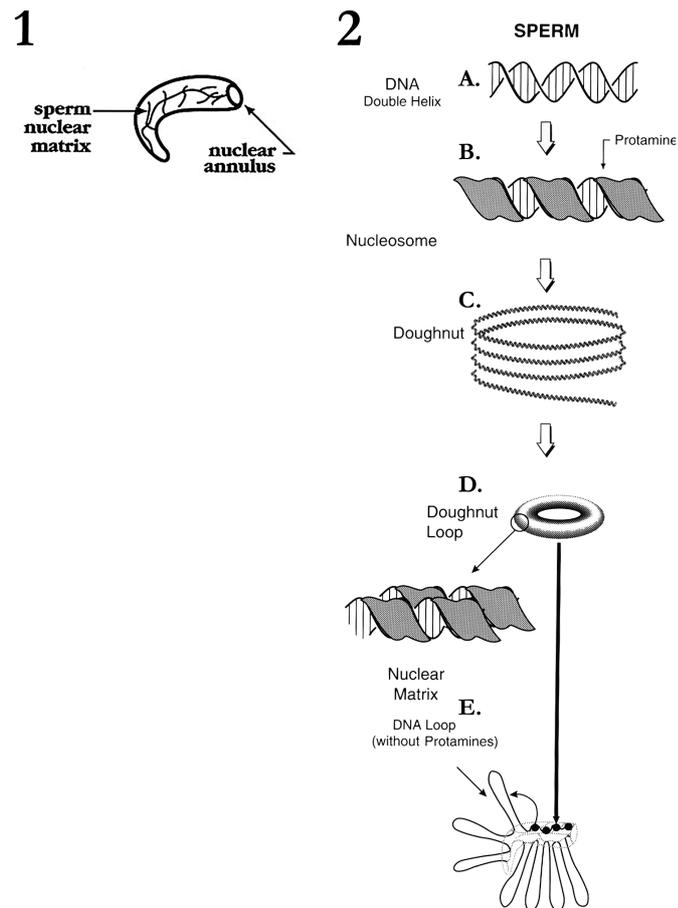
Ce modèle ne préjuge en rien de la nature ou du nombre des axes. Ces axes peuvent être protéiques, nucléiques ou nucléoprotéiques. Il peut y en avoir un seul ou plusieurs. De plus, ces axes peuvent être ou ne pas être liés les uns aux autres. Il n'est pas possible également de savoir si ces axes ont une grande longueur et parcourent ainsi le chromosome dans toute sa longueur. Ces expériences ne peuvent pas dire si la chromatine se lie plus ou moins souvent aux axes. A noter que la présence d'axes est une notion purement élastique. Il est tout à fait possible physiquement que ces axes soient des boucles d'ADN reliées les unes aux autres par des protéines.

Ces mesures d'élasticité sont incompatibles avec un modèle d'organisation du chromosome mitotique en « repliement hiérarchisé de l'ADN » (Manuelidis, 1990 ; Rattner, 1992) ou un modèle de chromosome sous la forme d'un gel (Marko et Siggia, 1997 ; Ostashevsky, 1998).

### *Le noyau de sperme*

Il existe d'autres modèles d'organisation du noyau de sperme, mais la structure du sperme n'étant pas le propos de ce travail, je n'en présente qu'un seul. Le noyau de sperme est une structure au moins aussi dense que ne l'est le chromosome mitotique. Le taux de compaction de l'ADN dans le noyau de sperme est d'environ 10 000 à 15 000. Le noyau de sperme des mammifères ne contient qu'une seule structure : l'annulus nucléaire (cf. Figure V.18-1). L'ADN nucléaire semble y être ancré. Au cours de la spermatogenèse, les histones sont remplacées par des protamines spécifiques du sperme. Ces protamines se lient covalamment les unes aux autres par l'intermédiaire de groupements soufrés. Lors de la décondensation du sperme, le glutathion sera utilisé pour détruire ces ponts disulfures (Perreault, 1984 ; Perreault, 1988). Ce remplacement des histones par les protamines entraîne une compaction de l'ADN. L'ADN ainsi compacté prend la forme de tore ou plutôt d'un « beignet » ou « *doughnut* » (cf. Figure V.18-2).

Selon le modèle présenté ici (Ward, 1993), ces beignets de chromatine s'agenceraient en une grande boucle. Ce sont ces boucles qui se fixeraient sur l'annulus nucléaire.



**Figure V.18 : Schéma explicatif d'un modèle de compaction de sperme**

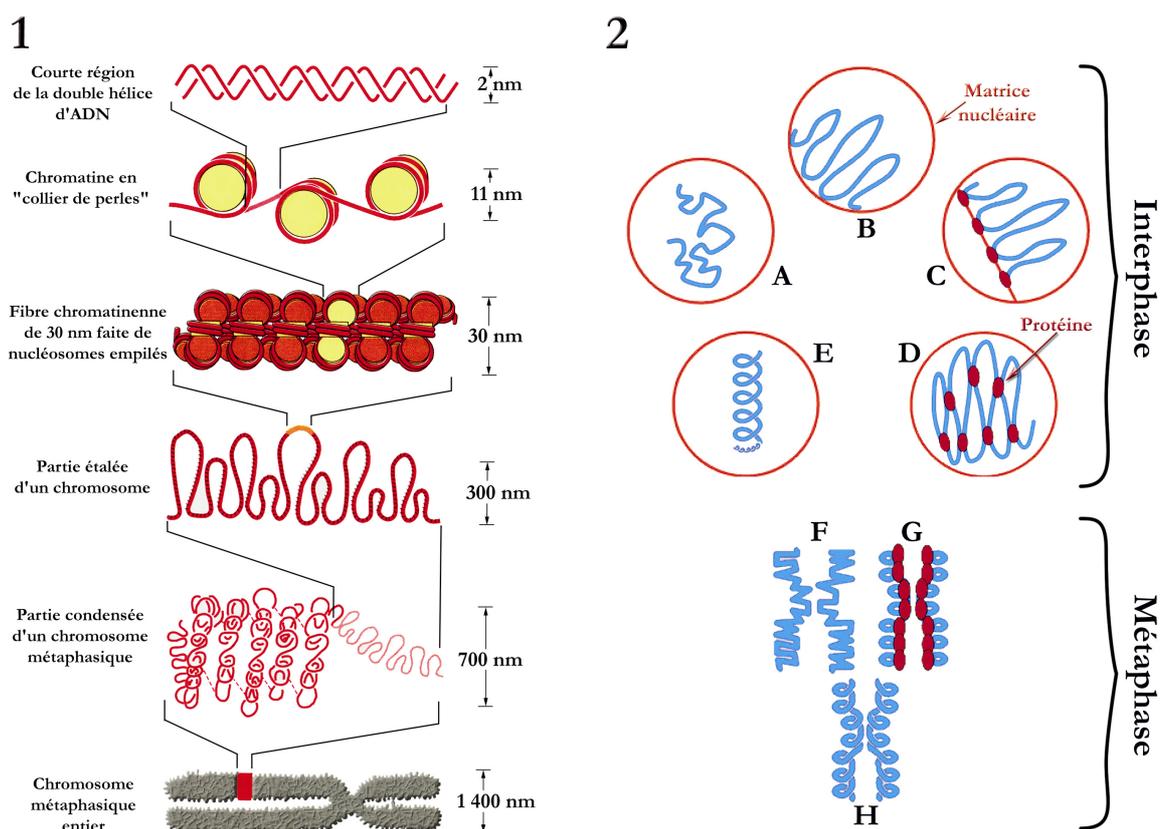
(Ward, 1993, [www.biolreprod.org](http://www.biolreprod.org))

**(1)** Description schématique du noyau de sperme et de l'annulus nucléaire. **(2)** Schéma explicatif d'un modèle de compaction de sperme : voir texte pour légende.

#### **d. Vue d'ensemble des niveaux d'organisation de la chromatine**

Comme cela a été montré dans les chapitres V.3.b et c, le consensus ne règne pas au sein de la communauté scientifique en ce qui concerne la compaction de la chromatine chromosomique. Néanmoins, l'ensemble de ces modèles d'organisation montrent certains points communs (cf. Figure V.19-1). Tout d'abord, l'existence de la fibre de 30 nm n'est pas vraiment remise en cause quel que soit le modèle. Ensuite l'existence de boucles de chromatine formées par cette fibre semble être aussi un consensus. Certes, les tailles de boucles varient, mais le concept même des boucles n'est pas remis en cause. Il semble aussi que l'existence de boucles d'une taille d'environ 200 - 300 nm soit aussi un point commun à plusieurs modèles. Le passage de la chromatine interphasique à la chromatine mitotique dépend du modèle et est donc forcément soumis à controverse. A noter qu'hormis le modèle de repliement hiérarchisé, il semble que le concept de squelette protéique sur lequel s'ancre la chromatine soit une idée assez récurrente.

La chose la plus surprenante est que tous ces modèles, à peu de chose près, sont basés sur des informations obtenues par les *mêmes techniques* (« *banding* », immunofluorescence ou microscopie électronique, etc.). Si les différences entre modèles se limitaient à des détails, il serait compréhensible qu'il y ait controverse. Mais c'est loin d'en être le cas (cf. Figure V.19-2) ! Par exemple, les modèles de « repliement hiérarchisé de l'ADN » et « loops + scaffold » n'ont fondamentalement rien à voir. Et pourtant ils parlent du même objet. Le problème de l'observation des structures chromosomiques est que le chromosome est très grand en comparaison des petites structures facilement étudiables qui le composent. Si l'on souhaite répondre à la question « Comment est donc structuré le chromosome ? », il faut être capable de visualiser « l'aiguille dans la botte de foin ». Mais la biologie bute sur ce problème depuis près d'un siècle.



**Figure V.19 : Récapitulatif des niveaux d'organisation de la chromatine**

(1) (Adaptée de Alberts *et al.*, 1998) L'hélice d'ADN a un diamètre d'environ 2 nm. En présence des histones de cœur, l'ADN s'enroule autour des nucléosomes et se compacte ainsi en une fibre d'environ 11 nm de diamètre. En présence de l'histone H<sub>1</sub>, la succession de nucléosomes s'agence sur elle-même afin de former une fibre de 30 nm de diamètre. Cette fibre de 30 nm est présente dans des boucles d'environ 300 nm, qui sous forme plus ou moins condensée, constituent le chromosome.

(2) (Adaptée de Sachs, 1995, [www.pnas.org](http://www.pnas.org)) Différents modèles d'organisation de la chromatine interphasique : (A) Organisée de façon aléatoire (ex : Sachs, 1995) ; (B) Ancrée à la matrice nucléaire (Gerace et Burke, 1988) ; (C) Ancrée par l'intermédiaire de chromomères au *nucléo-squelette* (Zatsepina, 1983) ou a un *scaffold* (Paulson et Laemmli, 1977) ; (D) Condensée par l'action de protéines ; (E) En repliement hiérarchisé (Rattner, 1992).

Différents modèles d'organisation de la chromatine mitotique : (F) Disposée aléatoirement (DuPraw, 1966) ; (G) Autour d'un squelette protéique (Saitoh et Laemmli, 1994) ; (H) En repliement hiérarchisé (Rattner et Lin, 1985).

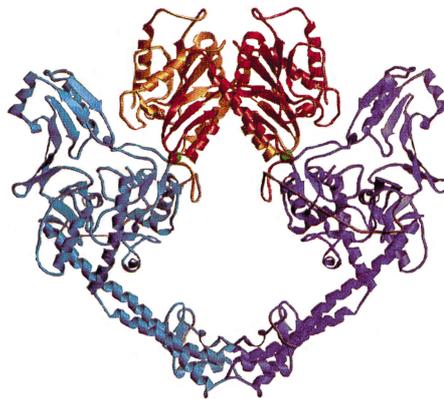
#### **4. Protéines suspectées d'avoir un rôle dans le maintien du chromosome.**

Un certain nombre de modèles proposent que certaines protéines participent à la condensation des chromosomes mitotiques. Les deux protéines les plus souvent citées sont la topoisomérase II et la famille des protéines SMC.

##### **a. La topoisomérase II**

###### *Structure de la topoisomérase II (Berger, 1996)*

Récemment, une grande partie de la structure de la topoisomérase II de levure a été étudiée par cristallographie. Cette enzyme de 180 kDa a une structure dimérique en forme de cœur (cf. Figure V.20), qui ménage un espace vide en son centre. Les données cristallographiques ont permis d'établir un modèle de l'enzyme qui la présente comme une pince double modulée par l'ATP, avec deux mâchoires diamétralement opposées et reliées par des joints multiples.



**Figure V.20 : Structure cristallographique d'un fragment du dimère de la topoisomérase II**

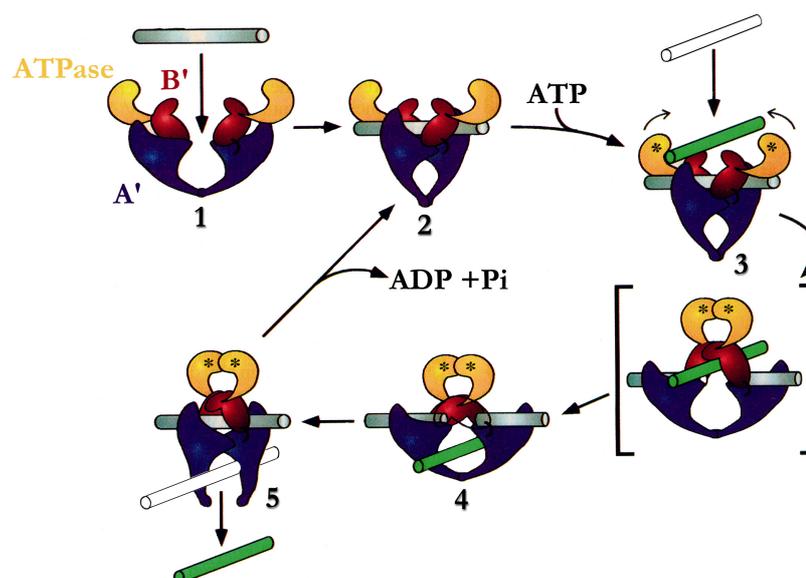
(Berger, 1996, [www.nature.com](http://www.nature.com))

*Voir texte pour légende.*

### ***Mécanisme et fonction de la topoisomérase II***

La topoisomérase II est une enzyme abondante au sein du noyau. Elle catalyse la relaxation de molécules d'ADN surenroulées et le passage d'une double hélice d'ADN à travers une autre double hélice (Berger, 1996 ; Berger, 1998 ; Nitiss, 1998) grâce à la formation d'une coupure double brin transitoire (cf. Figure V.21). L'enzyme se lie à l'ADN sous forme d'un homodimère. Après clivage des deux brins de l'ADN, un monomère reste fixé de façon covalente à l'extrémité 5' de chacun des brins. La ligation qui suit ce clivage transitoire, résulte en une modification du nombre d'enlacements ( $L_k$ ) de la molécule d'ADN par incrémentation de deux unités.

L'action de l'enzyme peut être inhibée par différents types de drogues (ex : VM26 (Newport et Spann, 1987), m-AMSA (Lin et Castora, 1991), anthracyclines (Chow, 1988)), dont plusieurs sont utilisées en chimiothérapie.



**Figure V.21 : Mécanisme d'action supposé de la topoisomérase II**

(adaptée de Berger, 1996, [www.nature.com](http://www.nature.com))

Différents domaines de l'enzyme sont désignés par les lettres A' (en bleu), B' (en rouge). Le domaine ATPasique est en jaune. Les deux segments de doubles brins d'ADN impliqués dans la réaction sont représentés par des axes tubulaires (en gris et en vert). A noter que ces segments peuvent être une partie de segments, beaucoup plus longs, d'ADN (linéaire ou entrecroisé). Dans l'étape 1, la topoisomérase II se lie à un segment d'ADN, induisant un changement de conformation (étape 2). Après liaison de l'ATP (représenté par un astérisque (\*) dans le domaine ATPasique) et de l'autre segment d'ADN (étape 3), l'enzyme subit une série de changements de conformation : Les deux parties A' de l'enzyme se repoussent, sectionnant le premier brin d'ADN (en gris) tout en le gardant attaché au complexe. Au même instant, le second segment d'ADN (en vert) est poussé au travers du sectionnement du premier ADN pour rejoindre l'espace au centre des deux parties A'. Dans le même temps, les deux parties B' se rejoignent, mettant face à face les deux extrémités sectionnées du premier ADN (étape 4). A noter que l'intermédiaire entre crochets est hypothétique. Au cours de l'étape 5, les parties A' s'écartent et laissent ainsi s'échapper le brin translaté. L'enzyme se décroche ensuite.

## *La topoisomérase II et les chromosomes*

### *Rôle de la topoisomérase II dans la condensation et la séparation des chromosomes*

Les résultats d'études réalisées sur différents systèmes expérimentaux suggèrent que la topoisomérase II joue un rôle essentiel lors de la formation des chromosomes et lors de la séparation des chromatides sœurs. Il a été supposé qu'en phase G2, la topoisomérase II catalyse le remodelage des chromatides sœurs entrelacées à la fin de la phase de réplication. Cette enzyme semble également jouer un rôle important lors de la condensation des chromosomes, probablement grâce à sa capacité à éliminer des contraintes topologiques qui pourraient empêcher un fort surenroulement des fibres chromatiniennes. Finalement, au début de l'anaphase, les liens qui relient les chromatides sœurs doivent être éliminés par l'action de l'enzyme pour permettre la ségrégation des chromatides. La topoisomérase II est la seule enzyme connue pouvant séparer deux brins circulaires d'ADN enchevêtrés sans avoir à en linéariser un (Berger, 1998 ; Nitiss, 1998).

Il a été montré très récemment que la topoisomérase II, qui est aussi nécessaire pour l'assemblage des chromosomes, interagissait directement avec d'autres enzymes : les histones déacétylases HDAC1 et HDAC2 (Tsai, 2000). Les histones déacétylases jouent dans plusieurs niveaux de régulation de la cellule, notamment dans la transcription génétique (Grunstein, 1997 ; Ng et Bird, 2000 ; Wolffe et Guschin, 2000 ; Khochbin, 2001 ). Elles sont aussi impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, dans la différenciation et ainsi que dans la transformation cellulaire (cf. chapitre « *Mécanisme et fonction de la topoisomérase II* » p53 et Cress et Seto, 2000).

### *Rôle structural de la topoisomérase II*

Des études de localisation de la topoisomérase II par immunofluorescence ont révélé une distribution sur l'axe central des chromosomes (Earnshaw et Heck, 1985 ; Saitoh et Laemmli, 1993 ; Hendzel, 1997), ainsi qu'une accumulation au niveau des régions centromériques (Rattner, 1996 ; Cobb, 1999). Cette distribution axiale pourrait être le reflet d'une localisation à la base de boucles d'ADN, au niveau de séquences d'attachement au squelette chromosomique (séquences SARs, cf. V.3.c *Le modèle « loops + scaffold »*).

Ces études suggèrent également que la topoisomérase II est un des principaux composants du squelette des chromosomes mitotiques (Earnshaw, 1985). Cependant, d'autres études, réalisées sur des chromosomes décondensés de cellules HeLa ou de drosophile, montrent une distribution plus générale de l'enzyme sur les bras des chromosomes. Ces résultats contradictoires pourraient être dus aux différents protocoles de préparation et de fixation utilisés. En effet, l'utilisation de certains types de fixateurs peut conduire à une réorganisation de la chromatine et/ou à une redistribution de l'enzyme.

Des résultats obtenus dans notre laboratoire avaient montré que, dans les chromosomes assemblés *in vitro* dans des extraits de *Xénope*, la topoisomérase II n'est pas localisée uniquement au niveau de l'axe central du chromosome, mais se distribue de façon plus ou moins homogène sur la totalité du chromosome.

Des expériences menées sur des chromosomes mitotiques assemblés *in vitro* de *Xénope* ont montré que l'aspect du chromosome n'était pas modifié par l'enlèvement de la topoisomérase II (Hirano et Mitchison, 1993). Néanmoins, même si l'aspect est conservé, l'imagerie n'est pas une technique qui permet de savoir si le maintien du chromosome est affecté.

### **b. Les protéines SMC**

La famille des protéines SMC (**S**tructural **M**aintenance of **C**hromosomes) est à l'origine de trois complexes protéiques (Hirano, 2002) :

- Les condensines, c'est-à-dire les complexes protéiques suspectés de permettre la condensation des chromosomes. Les condensines seront décrites plus amplement par la suite (p58).
- Les cohésines sont des complexes protéiques dont on pense qu'ils jouent un rôle dans la cohésion entre les deux chromatides du chromosome. Les condensines seront décrites page 63.
- Un troisième complexe protéique (qui ne porte pas encore de nom) encore peu connu. Ce complexe semble jouer un rôle dans la réparation des dommages que peut subir l'ADN et dans la signalisation lors de la mitose (cf. p65).

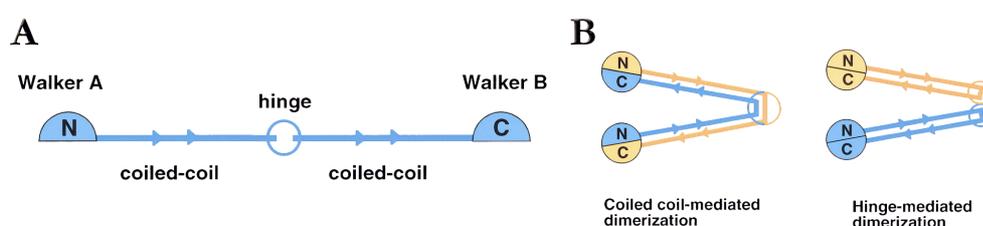
L'identification des protéines SMC date d'une dizaine d'années (Strunnikov, 1993). Condensines et cohésines ont été très largement étudiées depuis leur identification (Hirano et Mitchison, 1994). Néanmoins les recherches n'ont pas encore permis une compréhension claire de leur rôle. Voici dans les grandes lignes ce que la littérature présente d'elles.

### Structure et classification des protéines SMC

La structure primaire des protéines SMC (cf. Figure V.22-A) est très conservée depuis les bactéries jusqu'à l'homme (Cobbe et Heck, 2000). Les protéines SMC possèdent 5 domaines distincts (Melby, 1998) :

- Deux domaines de liaison à des nucléotides, nommés « *Walker A* » (extrémité N-terminale) et « *Walker B* » (extrémité C-terminale). Ces deux domaines sont fortement conservés au cours de l'évolution.
- Le domaine central, nommé « *hinge* » (= charnière, gond), est un domaine moyennement conservé au fil de l'évolution.
- Deux domaines « *coiled-coil* » entourant le *hinge* et délimités par les domaines *Walker A* et *B*.

Il est fortement suspecté que deux monomères SMC s'associent pour former un dimère. La manière de s'associer des monomères en un dimère n'est pas encore connue (cf. Figure V.22-B). Néanmoins, le dimère possède deux couples « *Walker A* + *Walker B* » en vis-à-vis (Lowe, 2001), et chaque couple possède une activité ATPasique (Hirano, 2001). Le domaine *Walker A* présente un site de liaison à l'ATP et le domaine *Walker B*, un site d'hydrolyse de l'ATP. Ces protéines ont une structure très proche de celles des kinésines (moteurs moléculaires).



**Figure V.22 : Structure primaire et dimérisation des protéines SMC**

(Hirano, 2002, <http://www.genesdev.org/cgi/content/full/16/4/399>)

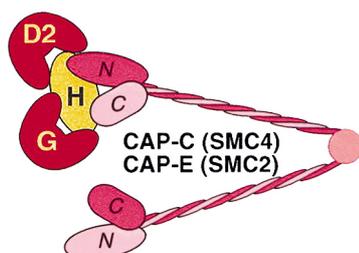
(A) Structure primaire des protéines SMC. *Voir texte pour légende.* (B) Dimérisation des protéines SMC. Deux protéines SMC (jaune et bleue) pourraient s'associer, soit de façon antiparallèle (à gauche), soit par une interaction au niveau du *hinge* (à droite).

La plupart des organismes archaïques ne contiennent qu'un seul gène qui code pour une seule protéine SMC qui forme un homodimère. Chez les eucaryotes, au moins 6 types de protéines SMC sont présents dans un seul et même organisme. Chacune de ces protéines n'a qu'un seul partenaire et les couples formés sont : SMC1/SMC3, SMC2/SMC4 et SMC5/SMC6.

### *Les condensines*

#### *Composition*

Le complexe de condensines actif nommé condensine 13 S (cf. Figure V.23) est composé de 5 sous-unités : 2 sous-unités SMC (SMC2 nommée aussi CAP-E et SMC4 nommée aussi CAP-C), et 3 sous-unités non-SMC (CAP-D2, CAP-G et CAP-H). CAP est l'abréviation pour **C**hromosome **A**ssembly **P**rotein. Ce complexe a été initialement découvert chez le *Xénope* puis chez d'autres organismes (Hirano, 1997 ; Sutani, 1999 ; Freeman, 2000 ; Schmiesing, 2000 ). Le complexe formé uniquement des protéines SMC se nomme la condensine 8 S (Hirano, 1997).



**Figure V.23 : La condensine 13 S (eucaryote)**

(Hirano, 2002, <http://www.genesdev.org/cgi/content/full/16/4/399> )

*Voir texte pour légende.*

### *Activité des condensines*

Le complexe 13 S se lie aux chromosomes spécifiquement en mitose. Ce complexe complet (sous-unités SMC et non-SMC) est nécessaire pour le démarrage de l'élaboration des chromosomes et leur assemblage. Les organismes, dont une des protéines du complexe est mutée, présentent un défaut sévère de ségrégation des chromosomes durant l'anaphase (Hirano, 2002). La cellule tente en vain de séparer des « masses » de chromatine mitotique sans réussir, induisant ainsi un blocage en anaphase. A noter que ce phénotype est très similaire aux phénotypes observés chez des organismes dont la topoisomérase II est mutée (Koshland et Strunnikov, 1996 ; Hirano, 2000). Ce qui laisse penser que le rôle des condensines est de faciliter la tâche de la topoisomérase II dans le travail de résolution des chromatides sœurs.

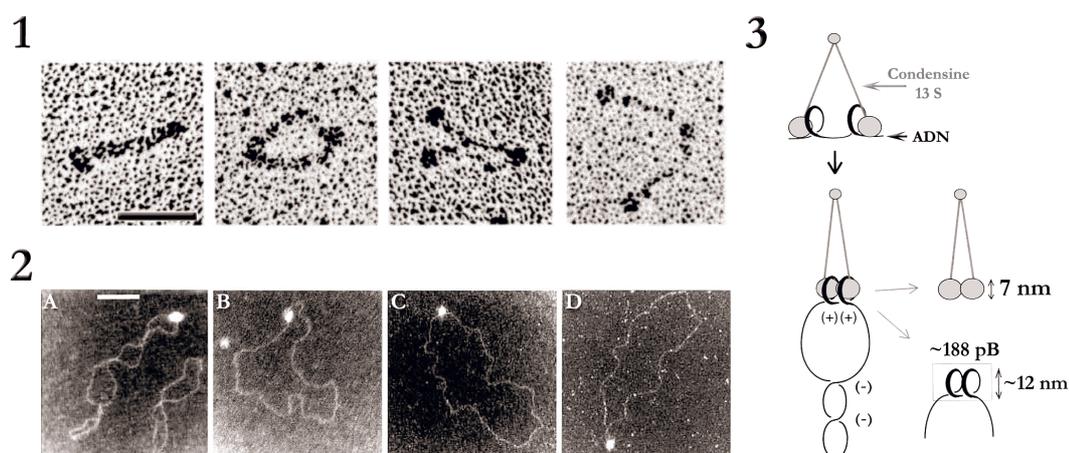
Dans les extraits d'œufs de *Xénopus* ne contenant pas de condensine, au lieu de chromosomes, des masses informes et « pelucheuses » de chromatine se forment (Hirano et Mitchison, 1994 ; cf. Figure V.25-B, p62). Chez la drosophile, une mutation de SMC4 produit des masses informes incluant les deux chromatides non résolues (Steffensen, 2001).

Il a été aussi montré que les condensines jouent également un rôle dans la régulation des gènes. Par exemple chez *C. elegans* (Meyer, 2000), l'équivalent chez cet organisme de SMC2/SMC4 s'associe à deux facteurs (DPY-26 et DPY-28) pour réprimer d'environ 50 % le niveau d'expression des deux chromosomes X de l'individu hermaphrodite (Lieb, 1998). Chez la drosophile, il a été montré qu'une protéine analogue à CAP-H colocalise avec des répresseurs de la transcription (Lupo, 2001). Chez *S. cerevisiae*, des expériences laissent présumer que les condensines jouent aussi un rôle dans l'organisation de zones hétérochromatiques (Freeman, 2000).

### *Mode d'action supposé des condensines*

Ce complexe a été étudié notamment par microscopie électronique. Il est possible de voir que le complexe de deux protéines SMC bactériennes (pas de sous-unité non-SMC nécessaire pour être fonctionnel) peut avoir deux états (Melby, 1998) : « Bras ouverts » ou « bras fermés » (cf. Figure V.24-1).

Un certain nombre de travaux récents ont été effectués dans le but de comprendre le mécanisme d'action de la condensine 13 S. Le tout dernier travail en date (Bazett-Jones, 2002) apporte de très intéressantes informations sur le mécanisme d'action du complexe 13 S. Les auteurs ont observé par imagerie spectroscopique électronique l'activité du complexe 13 S sur un ADN circulaire double brin nu (dénué d'autres protéines). L'imagerie spectroscopique électronique (Bazett-Jones, 1999) est une technique qui permet d'observer directement la molécule (sans marquage ou coloration) et de connaître sa stœchiométrie. Les auteurs ont observé qu'en présence d'ATP, le complexe 13 S était capable d'induire au moins deux surenroulements de l'ADN (cf. Figure V.24-2). De précédentes expériences avaient montré que ces surenroulements étaient dans le sens positif (Kimura, 1999). Environ 188 pb sont saisies par les deux extrémités *Walker* pour faire ce surenroulement (cf. Figure V.24-3). Le mécanisme par lequel ce surenroulement est réalisé est encore inconnu. Les auteurs ont montré que l'ATP est nécessaire à l'activité de l'enzyme.



**Figure V.24 : Mode d'action supposé des condensines**

(1) (Adaptée de Melby, 1998, [www.jcb.org](http://www.jcb.org)) Clichés de microscopie électronique (ombrage métallique) d'une protéine bactérienne de la famille des SMC nommée MuKB. Taille de la barre d'échelle : 30 nm. Sur ces images il est possible de voir que cette protéine subsiste sous différents états allant d'une forme où ses deux bras sont repliés (à gauche) à une forme où ils sont dépliés (à droite).

(2) (Adaptée de Bazett-Jones, 2002, [www.molecule.org](http://www.molecule.org)) Images obtenues par imagerie par spectroscopie électronique (ESI), taille de la barre d'échelle : 130 nm, résolution de 2 nm. Un ADN circulaire double brin (3 kb) et le complexe de condensine 13 S (point très brillant) sont mis en présence : (A) D'ATP ; (B) D'AMP-PNP ; (C) Pas de nucléotide. L'image (D) représente le résultat des expériences (A), (B) ou (C) en présence cette fois-ci d'un ADN double brin dont un des brins possède au moins une cassure.

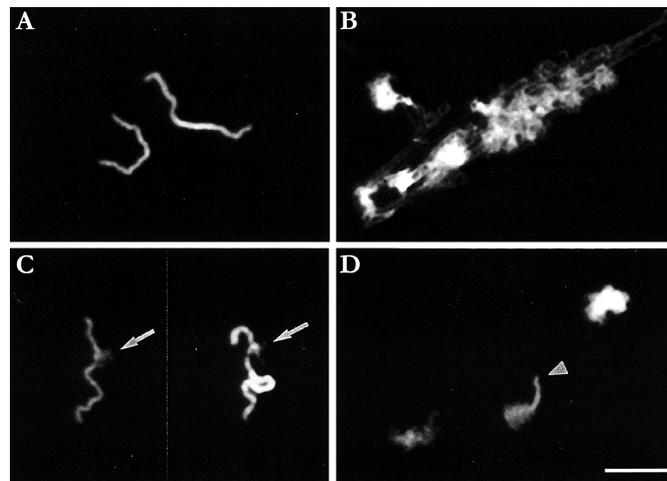
(3) (Adaptée de Bazett-Jones, 2002, [www.molecule.org](http://www.molecule.org)) Modèle d'action de la condensine 13 S. Une fois que la condensine 13 S a capté l'ATP, elle se lie à l'ADN et forme deux boucles d'environ 12 nm de diamètre (~188 pb) autour de ses 2 domaines *Walker* en ses extrémités. Les deux domaines *Walker* se rapprochent et permettent ainsi la formation d'au moins deux surenroulements positifs de l'ADN.

Ces expériences montrent l'activité du complexe 13 S sur de l'ADN nu. Mais dans la cellule, l'ADN n'est jamais nu : le substrat des condensines est la chromatine. De plus, le substrat peut être le nucléofilament ou la fibre de 30 nm. Ce qui entraînerait un effet de compaction par les condensines plus important (Bazett-Jones, 2002).

### *Rôle structural des condensines*

Lors de la purification des protéines du squelette chromosomique (cf. p39), deux protéines ont été identifiées : la topoisomérase II et SCII (Mirkovitch, 1984). Après plusieurs années d'études, il s'avère que la protéine SCII est une protéine participant au complexe 13 S de condensine (Saitoh, 1994). Le rôle structural présumé des condensines est donc de faire partie du squelette protéique sur lequel viennent s'ancrer des boucles de chromatine. De plus, des expériences d'immunofluorescence montrent que les condensines sont principalement distribuées sur l'axe central du chromosome (Hirano et Mitchison, 1994 ; Hirano, 1997).

Comme cela a été expliqué deux paragraphes auparavant, la résolution des chromatides sœurs est impossible en absence du complexe 13 S. Mais il est aussi possible d'enlever le complexe d'un chromosome déjà formé (Hirano et Mitchison, 1994). Dans ce cas-ci, un anticorps capable de séquestrer une des protéines SMC du complexe est ajouté. Comme dit auparavant, il est nécessaire que le complexe soit complet pour être fonctionnel. Au bout de quelques minutes, une désorganisation locale du chromosome est observée (cf. Figure V.25-C). Après un laps de temps plus long, l'ensemble du chromosome prend l'aspect d'une masse informe (cf. Figure V.25-D).



**Figure V.25 : Protéines SMC et organisation du chromosome mitotique**

Ces images sont des clichés de microscopie de fluorescence où l'ADN a été marqué. Barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$ . (A) Chromosomes mitotiques assemblés *in vitro* de *Xénope* dans leur état natif. (B) Avant formation des chromosomes, l'extrait d'œuf a été « immuno-dépourvu » en XCAP-C (SMC 4 de *Xénope*). A des chromosomes déjà formés est ajouté de l'anticorps XCAP-C : (C) Image prise 10 minutes après ajout ; (D) Image prise 30 minutes après ajout.

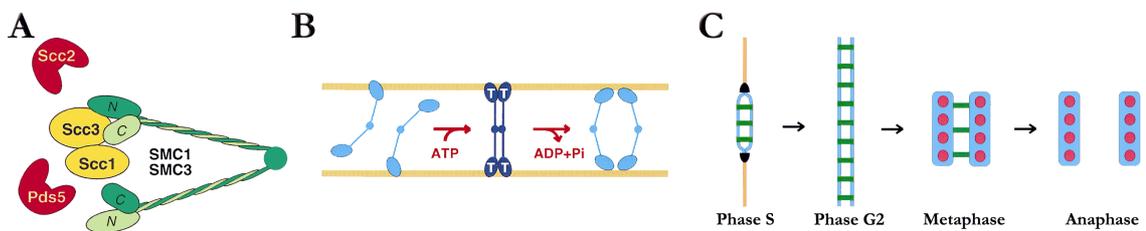
Cette activité « d'emmêlement » de l'ADN est exactement l'opposé de celle de la topoisomérase II qui est de relaxer les contraintes afin de permettre une bonne séparation des chromosomes et des chromatides (Hirano, 2002). Il est possible d'imaginer qu'au sein du chromosome un équilibre d'enchevêtrement/dés-enchevêtrement s'instaure entre la topoisomérase II et les condensines. Mais il faut noter que les effets des condensines peuvent se faire ressentir à grande échelle par la création de surenroulements très espacés, créant ainsi de grandes boucles (Bazett-Jones, 2002). Ces grandes boucles ne permettant pas d'avoir suffisamment de gênes stériques pour que la topoisomérase II puisse venir désenchevêtrer les brins.

### *Les cohésines*

Le complexe protéique eucaryote (cf. Figure V.26-A) qui forme la cohésine active est un hétérodimère de 2 protéines SMC (SMC1/SMC3) et d'au moins deux sous-unités non-SMC (par exemple SCC1 et SCC3 chez *S. cerevisiae*) (Hirano, 2002). Chez les cellules eucaryotes supérieures, différentes isoformes des sous-unités non-SMC existent.

Les cohésines s'associent à des régions spécifiques proches du centromère et le long des chromatides sur des séquences riches en A-T chez *S. cerevisiae* (Blat et Kleckner, 1999). A noter que ces séquences riches en A-T sont différentes des séquences SARs évoquées au chapitre V.3.c. Au niveau des chromatides, la périodicité des cohésines est estimée à environ une toutes les 9 à 15 kb (Blat et Kleckner, 1999 ; Laloraya, 2000). Le mode d'action de ces protéines n'est pas encore bien connu. Il est supposé, dans la littérature, que chacun des deux couples *Walker A* + *Walker B* se lient chacun à une chromatide différente en présence d'ATP (Hirano, 2002, cf. Figure V.26-B).

Il a été montré que l'absence des cohésines provoquait une mauvaise cohésion des chromatides sœurs lors de la formation des chromosomes mitotiques assemblés *in vitro* de *Xénope* (Losada, 1998), et lors de la mitose chez *S. cerevisiae* (Michaelis, 1997). Par contre, une différence existe entre ces deux systèmes d'étude : la condensation des chromosomes mitotiques est possible dans l'extrait d'œufs de *Xénope* sans cohésine alors qu'elle ne l'est pas chez la levure. Ceci laisse présager que condensation et cohésion sont deux processus différents dans les chromosomes mitotiques assemblés *in vitro* de *Xénope* (Hirano, 2002). Ce qui semble normal car chez la levure, la cohésine reste accrochée aux chromosomes mitotiques alors qu'elle est enlevée au cours de la métaphase/anaphase (cf. Figure V.26-C) chez les vertébrés (Hirano, 2002). Ce qui laisse présager que les processus de cohésion et de condensation sont deux processus différents chez le *Xénope*.



### Figure V.26 : Composition et rôle des cohésines eucaryotes

(Hirano, 2002, <http://www.genesdev.org/cgi/content/full/16/4/399>)

(A) Composition de la cohésine de *S. cerevisiae*. Deux protéines SMC (SMC1 et SMC3) forment un hétérodimère sur lequel se fixent deux sous-unités non-SMC (SCC1 et SCC3). SCC2 et Pds 5 sont des protéines qui permettent la fixation à la chromatine de la cohésine en phase G<sub>1</sub>. (B) Mode d'action présumé des cohésines. Deux cohésines (en bleu) sont représentées. En présence d'ATP les cohésines se fixeraient aux deux brins d'ADN (en jaune) et l'hydrolyse de l'ATP permettrait de bloquer le complexe cohésine + ADN. (C) Rôle des cohésines eucaryotes. Lors de la duplication des chromatides sœurs en phase S jusqu'à la fin de la phase G<sub>2</sub>, les cohésines (en vert) maintiendraient les deux brins (en bleu) à proximité l'un de l'autre. En métaphase, ces liens se rompent peu à peu afin de permettre la compaction des chromosomes par les condensines. Ces liens disparaissent totalement en anaphase.

**Réparation et signalisation : SMC5/SMC6.**

Des analyses phylogénétiques ont révélé que les cellules eucaryotes avaient deux autres protéines de la famille des SMC (Cobbe et Heck, 2000) : SMC5 et SMC6. Des expériences menées chez *S. pombe* (Fousteri et Lehmann, 2000) et l'homme (Taylor, 2001) montrent que ces deux protéines forment un complexe avec des sous-unités encore inconnues.

Chez *S. pombe* notamment, la mutation du gène qui code pour SMC6 entraîne une hypersensibilité aux rayons UV et  $\gamma$  (Lehmann, 1995). Il a aussi été montré chez *S. pombe* (Fousteri et Lehmann, 2000) que les protéines SMC5 et SMC6 étaient nécessaires à la croissance en mitose. Il semble que ces protéines SMC soient nécessaires aux réparations de l'ADN et à la signalisation des différentes phases de la mitose.

**5. Comment apporter de nouvelles informations pertinentes sur l'organisation du chromosome mitotique ?**

**a. Problématique**

Comme cela a été montré dans le chapitre V.3.c, la structure des chromosomes porte à controverse. Que ce soit dans le cas de la structure des chromosomes interphasiques (ex : « marche au hasard » et « modèle chromomérique ») ou dans le cas de la structure des chromosomes mitotiques (ex : « *loops* + *scaffold* » et « repliement hiérarchisé de l'ADN »), les modèles d'organisation du chromosome n'ont que peu de choses en commun. Le problème est que ces modèles sont basés sur des résultats obtenus par des techniques d'étude quasi-identiques. A technique équivalente, résultat équivalent « normalement ». Mais ce n'est pas le cas car le chromosome, de par ses dimensions, sa composition, sa densité et sa fragilité vis-à-vis des protocoles biochimiques, est un objet extrêmement difficile à étudier. A chaque expérience, le risque d'artefact est grand. Ces problèmes techniques pèsent lourdement sur la connaissance.

Comme montré aussi dans le chapitre V.4, le rôle des différentes protéines suspectées de jouer un rôle dans le maintien des chromosomes est, lui aussi, soumis à controverse. La topoisomérase II joue-t-elle un rôle dans le maintien du chromosome ? Et qu'en est-il des protéines SMC ? Là aussi, il y a carence d'informations.

Si nous souhaitons apporter de nouvelles informations pertinentes sur l'organisation du chromosome, le « cahier des charges » est simple et tient en une seule phrase : *ne pas appliquer de protocoles biochimiques agressifs sur le chromosome tout en obtenant des informations sur son organisation et les protéines nécessaires à son maintien.*

Au cours des chapitres suivants vont vous être présentées les méthodes expérimentales que nous avons choisies dans le but d'apporter de nouvelles informations « fiables » sur l'organisation du chromosome mitotique.

### ***b. Notre modèle d'étude : les chromosomes mitotiques assemblés in vitro de Xénope.***

#### *Pourquoi techniquement les avoir choisis ?*

Nous souhaitons étudier l'organisation des chromosomes mais ces derniers sont enfermés à l'intérieur de la membrane plasmique (la membrane nucléaire disparaît au cours de la mitose) et sont donc inaccessibles. Il y a deux techniques qui permettraient de les sortir de la cellule.

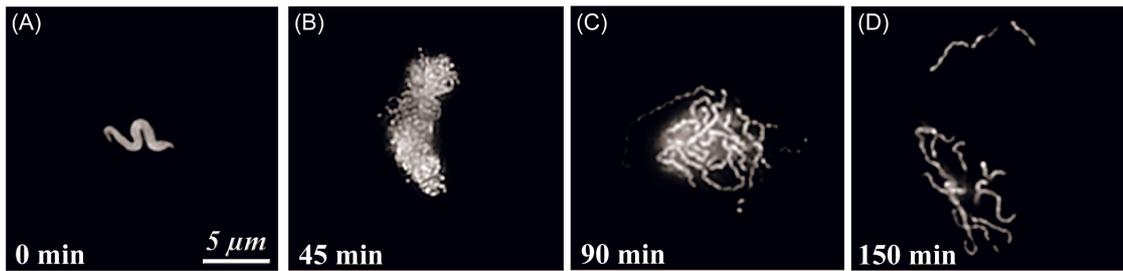
Premièrement, il est possible d'utiliser divers protocoles biochimiques pour percer ou faire disparaître la membrane plasmique. Mais ces protocoles sont évidemment agressifs et les risques de redistribution des protéines à l'intérieur du chromosome et le risque d'artefacts structuraux tels que la formation de boucles de chromatine sont extrêmement grands. Cette méthode est donc à exclure.

Deuxièmement, il est possible d'utiliser des moyens mécaniques pour sortir le chromosome du bouclier qu'est la membrane plasmique. Dans ce dessein, il est possible, à l'aide d'une pipette, de venir attraper une extrémité d'un chromosome et de le sortir de la cellule (Poirier, 2000). Mais le problème est que le sortir risque de l'endommager car les chromosomes sont toujours fixés à quelque chose dans la cellule (matrice nucléaire ou fuseau mitotique). Sans oublier que la sortie nécessite le passage de la membrane plasmique, une zone hydrophobe et mécaniquement résistante. Lors de la sortie, il y a donc des risques mécaniques pour le chromosome.

L'alternative à ces deux possibilités est que le chromosome n'ait jamais été à l'intérieur de la cellule, c'est-à-dire de le former *in vitro*. Les œufs de *Xénope* permettent de faire 3 types d'extraits : les extraits interphasiques, les extraits cycliques et les extraits mitotiques. Ce sont les extraits mitotiques qui nous intéressent plus précisément. Il a été montré que dans l'extrait mitotique il était possible de former des chromosomes métaphasiques en incubant du sperme démembré (cf. Figure V.27) dans des extraits d'œufs d'amphibiens (Lohka et Masui, 1983), et plus précisément dans des extraits d'œufs de *Xénope* (Smythe et Newport, 1991 ; Hirano et Mitchison, 1994).

Ceci est rendu possible par l'action du *Mitotic Promoting Factor* (MPF) qui permet leur maturation ainsi qu'à la très grande réserve de matériel génétique et protéique présente dans l'œuf d'amphibien. Notamment dans celui du *Xénope* qui contient une réserve suffisamment importante pour permettre à l'embryon de se développer jusqu'au stade de la transition mid-blastulienne (~ 4 000 cellules). L'ADN femelle ayant été éliminé lors de la purification de l'extrait d'œufs, ces chromosomes ne seront donc que les chromosomes provenant du père et ils n'auront donc que la chromatide paternelle.

De plus ce système est figé en métaphase de la méiose II (Smythe et Newport, 1991), ce qui nous permet de nous affranchir de manière relative de l'évolution du système au cours du temps.



**Figure V.27 : Cinétique de formation des chromosomes mitotiques assemblés *in vitro* de *Xénope***

(© Stefan Dimitrov, Institut Albert Bonniot, France.)

Ces images sont des clichés traités de microscopie de fluorescence où l'ADN est marqué par du Hoechst 33258. (A) Initialement du sperme (en forme de S) est incubé dans un extrait d'œufs de *Xénope*. Au bout d'environ 45 minutes (B), la chromatine du sperme commence à être remodelée par l'extrait d'œufs. Des fibres chromatiniennes sont visibles à ce stade. Au bout d'environ 90 minutes (C), les 18 chromosomes présents dans le noyau de sperme de *Xénope* commencent à s'individualiser jusqu'à être complètement individualisés au bout de 150 min approximativement (D).

*Les chromosomes mitotiques assemblés in vitro de Xénope sont-ils de bons modèles ?*

Le grand nombre de découvertes et la haute reproductibilité des résultats que permettent ces extraits nous ont fait nous intéresser à ce système d'étude *in vitro*, donc hors de la cellule. Tout d'abord, l'aspect général de ces chromosomes est identique à celui observé pour des chromosomes *in vivo*. De plus, leur composition biochimique semble être identique à celle des chromosomes *in vivo*. Leur utilisation, comme montré au cours de ce chapitre V, a permis de découvrir et d'élucider certains mécanismes cellulaires. Notamment, l'identification et l'isolement des protéines SMC (Hirano et Mitchison, 1994) et des complexes condensines (Hirano, 1997) et cohésines (Losada, 1998). A noter que certains mécanismes importants ont pu être identifiés chez l'humain, la levure ou la drosophile grâce aux travaux sur ces chromosomes mitotiques assemblés *in vitro* de *Xénope* (cf. paragraphes précédents).

Malgré qu'ils ne soient formés que d'une seule chromatide, des expériences de mesures de résistance à l'étirement (Houchmandzadeh et Dimitrov, 1999) ont permis de mesurer que leur cohésion était de l'ordre de grandeur de celle des chromosomes *in vivo* de salamandre (Poirier, 2000) et de sauterelle (Nicklas, 1983).

### ***c. Les mesures de force en biologie : un nouvel outil.***

Depuis les vingt dernières années, les mesures de force à l'échelle du piconewton ont été révolutionnées par l'apparition de nouveaux instruments issus pour la plupart de la physique. Cette échelle de force est de l'ordre des forces qui régissent les interactions entre *deux* molécules. Une nouvelle « ère » s'est donc ouverte dans la compréhension des phénomènes d'interactions au sein du vivant. Auparavant, les mesures étaient effectuées sur une collection d'objets. Il est maintenant possible d'observer directement les interactions à l'intérieur d'un même objet aussi petit qu'une protéine.

Avant, lorsque les mesures étaient effectuées sur toute une population d'objets en même temps, il était nécessaire de, tout d'abord, comprendre quelle était leur réponse collective, ce qui n'avait rien d'évident. Ensuite, le fait que ces mesures soient effectuées sur une population, donc une faible probabilité que chacun des objets soit dans le même état, gommait en quelque sorte les détails des mesures de chacune des molécules.

Beaucoup d'expériences ont été effectuées et beaucoup de techniques ont été mises au point depuis les deux dernières décennies. Le but de cette partie n'est pas de donner une liste exhaustive des techniques utilisées, de leurs différents modes et de tous les résultats obtenus. Le but est d'illustrer, au travers de quelques exemples de techniques et de résultats, ce qu'il est possible de faire et d'apprendre en biologie par ce moyen. De plus, nous expliquerons ainsi pourquoi nous avons choisi une technique plutôt qu'une autre pour réaliser nos expériences.

## **Les techniques de mesure de force (Shao, 2001)**

### *Les pinces optiques*

La technique des pinces optiques (ou piège optique) est basée sur le fait que la lumière peut exercer une force sur la matière diélectrique (Mehta, 1999 ; Shao, 2001) : c'est-à-dire l'immense majorité des objets biologiques. Le plus souvent, l'objet biologique est attaché d'un côté par une bille (par exemple en polystyrène). Un faisceau laser est focalisé en un point du volume qui contient l'objet. Ce faisceau laser crée un puits de potentiel. Lorsque la bille s'approche suffisamment du faisceau laser, elle « tombe » dans le puits : elle est ainsi piégée (Ashkin, 1997). La force avec laquelle le piège la retient (*i.e.* sa constante de ressort) est fonction de l'intensité du laser, ce qui la rend modulable par simple rotation du bouton de réglage de puissance du laser. L'autre extrémité de l'objet est fixée, par exemple, à une autre bille prise dans un autre piège ou à la platine du microscope. Ensuite, les deux extrémités de l'objet sont éloignées l'une de l'autre et l'objet est ainsi étiré. La détection de la force consiste à détecter les mouvements de la bille : plus elle sera déplacée dans le piège, plus la force sera grande. Cela peut se faire par imagerie, où l'on détecte la position de la bille sur une image (mesures de quelques Hz à ~ 30 kHz), mais elle se fait le plus souvent à l'aide d'un diode, ce qui permet des mesures à plus de 100 kHz. Afin d'atteindre des forces élevées, il est possible d'augmenter la constante de ressort du piège, mais augmenter la puissance du laser entraîne un échauffement au sein du piège, ce qui peut entraîner la dénaturation de l'objet que l'on souhaite étudier. En pratique, les forces que l'on peut atteindre sont dans la gamme de 1 à 100 pN.

### *Les pinces magnétiques*

Cette technique est, en de nombreux points, identique à celle des pinces optiques. Le principe des pinces magnétiques (Smith, 1992 ; Strick, 1996 ; Heinrich et Waugh, 1996) est plus facile à comprendre car nous connaissons tous les aimants. Au cœur d'un dispositif entouré d'électroaimants est confinée une bille paramagnétique. Cette fois-ci, ce sera donc la force magnétique qui permettra l'éloignement des deux extrémités de l'objet. Cette technique présente deux avantages par rapport aux pinces optiques : les forces les plus faibles mesurables par cette technique sont d'environ 10 femto-Newtons ( $10^{-14}$  N) ; il est possible de faire tourner la bille sur elle-même et ainsi de mesurer les forces de surenroulement d'un objet. Mais cette technique a trois inconvénients : La difficulté de sa mise en œuvre, les faibles forces qu'elle permet d'atteindre (< 100 pN, pour les montages les plus performants actuellement) et le fait que chaque bille a une susceptibilité magnétique différente, d'où une calibration du piège lors de chaque expérience. La détection peut se faire pareillement aux pinces optiques.

### *La machine de forces*

Le principe de la machine de forces ou « machine Israelachvili » du nom de son inventeur, est basé sur la mesure de la force d'interaction entre une surface plane et une surface cylindrique (Leckband, 1992 ; Leckband, 2000). Evidemment ces deux surfaces peuvent être fonctionnalisées et ainsi permettre la mesure de force. Il est possible de faire bouger ces surfaces l'une par rapport à l'autre ou d'imposer des oscillations de faibles amplitudes. La précision des mesures est d'environ 10 nN.

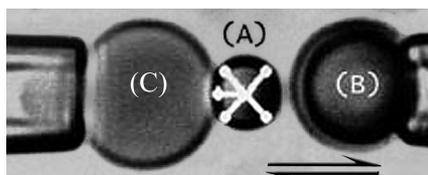
### *La chambre à flux*

Ce système de mesure utilise la force hydrodynamique (Goldman, 1967). Dans une chambre de dimensions parfaitement connues, s'écoule un flux laminaire (Lawrence, 1987 ; Cozens-Roberts, 1990). Des objets (par exemple des anticorps ou des cellules) circulent avec le flux. Les parois de la chambre sont recouvertes du substrat de l'objet circulant. Pour un anticorps, ce sera la protéine qu'il reconnaît et pour une cellule, une protéine avec laquelle on pense que sa partie externe interagit. En modulant le flux, il est possible de moduler la force nécessaire pour obtenir un équilibre d'association et dissociation des objets circulant avec leur substrat. De là, il est possible de déterminer la force qui unit objet et substrat. L'inconvénient de cette méthode est que, pour les objets dont on ne connaît pas bien la forme (comme une cellule par exemple), l'obtention du résultat nécessite parfois des calculs qui ne sont pas forcément évidents à mettre en œuvre.

### *La membrane biologique comme capteur de force*

La technique d'utilisation de membrane biologique comme capteur de force ou BFP (**B**iomembrane **F**orce **P**robe) consiste à aspirer partiellement par exemple un érythrocyte à l'extrémité d'une pipette (Berk et Evans, 1991 ; Evans, 1991a ; Evans, 1991b ; Evans, 1995, cf. Figure V.28-C). La rigidité de la membrane de cet érythrocyte va dépendre de la dépression appliquée à l'intérieur de la pipette de contention. Une microbille de verre recouverte d'un ligand, portant par exemple une protéine, est fortement collée à la membrane (cf. Figure V.28-A). Une seconde pipette, portant par exemple sur une bille l'anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt (cf. Figure V.28-B), vient au contact de la bille de verre. La liaison anticorps/antigène se forme et la bille portant l'anticorps est ensuite éloignée jusqu'à ce que la liaison se rompe. La force qui unit la liaison anticorps/antigène fait que la bille (A) est attirée par la bille (B) qui s'éloigne. Ceci entraîne la déformation de la membrane (C). A partir de la mesure des déformations de la membrane, il est possible de déterminer la force à chaque instant.

L'avantage de cette technique est qu'il est possible d'appliquer des forces dans la gamme de 0,5 pN à 1000 pN. De plus il est possible de faire varier facilement le taux de variation de force (= quantité de force par unité de temps) sur 7 ordres de grandeur compris entre  $10^{-1}$  pN.s<sup>-1</sup> à  $10^6$  pN.s<sup>-1</sup> (Evans, 1999). Mais cette technique est très compliquée à mettre en place car aspirer une petite languette d'érythrocyte en appliquant une dépression constante au cours du temps n'a rien d'évident.



**Figure V.28 : La technique d'utilisation de la membrane biologique comme capteur de force**

(Adaptée de Evans, 2001b, [www.pnas.org](http://www.pnas.org))

*Voir texte pour légende.*

### *La microscopie à force atomique*

La microscopie à force atomique, ou AFM (Binnig, 1986), est basée sur la mesure de la déflexion d'une pointe dont on connaît la constante de ressort. Un faisceau laser est reflété par la pointe et récupéré par une diode. La déflexion de la pointe peut ainsi être mesurée par détection du mouvement du faisceau. Il est possible de fonctionnaliser la pointe avec un anticorps et venir ensuite accrocher une protéine d'intérêt fixée à une platine. Ensuite la platine bouge et les forces nécessaires, par exemple pour déplier cette protéine, sont mesurées.

De par son industrialisation et la possibilité de pouvoir imager la topographie de surfaces, l'AFM est devenu un instrument relativement courant. La meilleure précision de mesure que l'on puisse atteindre est, pour l'instant, de l'ordre de 0,1 pN (Tokunaga, 1997). La force maximale mesurable et la résolution disponible dépendent de la constante de ressort de la pointe. Plus la pointe sera rigide, plus haute sera la force maximale atteignable, mais moins bonne sera la résolution, et vice-versa si la pointe est plus souple.

### *Les micropipettes comme capteurs de force*

Les micropipettes sont des pipettes dont l'extrémité a été rendue fine. La mesure de force à l'aide de micropipettes utilise le même principe que la microscopie à force atomique : la mesure de déflexion d'un objet alors que l'on connaît sa constante de ressort. La technique est relativement simple à comprendre. L'objet d'intérêt est pris entre deux pipettes. Une pipette bouge, l'autre pas. La déflexion de la pipette qui ne bouge pas permet de mesurer la force appliquée sur l'objet. Les mouvements des pipettes sont contrôlés par des micromanipulateurs et la détection peut se faire sur l'image de l'expérience (Houchmandzadeh et Dimitrov, 1999).

C'est cette technique que nous avons choisie car :

- Il est possible d'ajuster les constantes de ressort des pipettes pour mesurer des forces inférieures à 5 pN avec une erreur absolue de l'ordre de 10 %. Il est aussi possible d'avoir des pipettes de constantes de ressort plus élevées permettant de mesurer des forces plus grandes. La gamme de forces offerte par cette technique est tout adaptée à l'étirement de chromosomes.
- Il est possible de faire varier le taux de variation de force de plusieurs ordres de grandeur.
- Il est possible de fonctionnaliser les pipettes.
- Elle est ergonomique : il est possible de facilement modifier le montage pour l'adapter aux besoins de chaque expérience (par exemple, ajouter une troisième pipette à un montage qui en contient deux à l'origine).
- Elle est relativement simple et peu onéreuse à monter.

## *Quelques résultats obtenus à l'aide de ces techniques*

### *Etude de la liaison biotine/streptavidine*

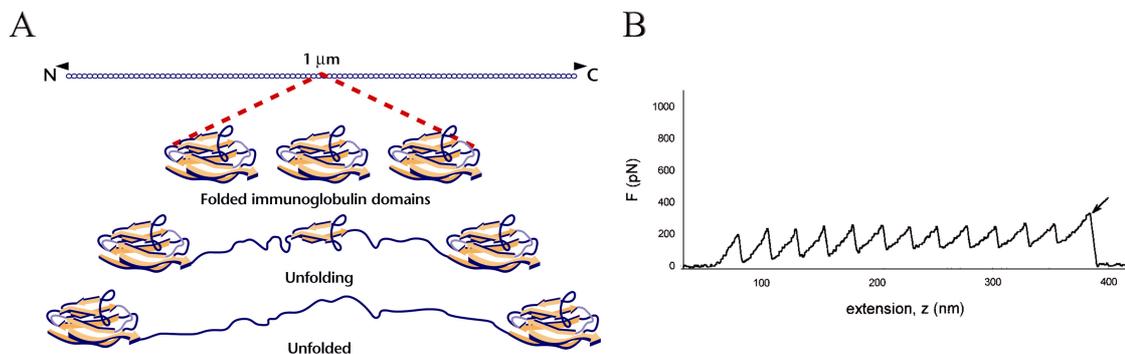
La technique utilisée dans ce cas est la BFP (= membrane biologique utilisée comme capteur de force). Les auteurs (Merkel, 1999) ont mesuré la force nécessaire pour séparer ces deux protéines qui ont une très forte affinité l'une pour l'autre. D'ailleurs, ils sont à l'origine, et plus précisément le Dr. Evan Evans, de l'observation expérimentale et du développement de la théorie du Dr. Bell concernant la modification du potentiel d'interaction lors des expériences de mesures d'élasticité (cf. « *Les mesures de force en biologie ne sont pas seulement un outil* » un peu plus loin au cours de ce chapitre).

Les auteurs ont pu relier la structure des deux protéines (obtenues par cristallographie) aux mesures de forces. Ils ont pu corrélérer des relaxations brusques à certaines distances caractéristiques et à des ruptures de liaisons hydrogènes par exemple, ou à un mouvement d'une partie de la protéine. Les mêmes mesures ont été effectuées avec des protéines mutées qui ont permis de montrer que certaines interactions disparaissent et que ceci est observable par la technique BFP. Cet exemple montre bien que structure et mesures d'élasticité sont corrélées.

Il faut bien noter que la mesure d'élasticité ne permet pas de résoudre systématiquement la structure. Elle peut néanmoins permettre de vérifier des hypothèses comme, par exemple, « cette boucle permet la stabilisation de l'interaction » ou « cet acide aminé est vital pour le maintien de la structure ».

### Dépliage de protéines

La titine (aussi appelée connectine) est une protéine aux proportions titanesques (Higuchi, 1993 ; Labeit et Kolmerer, 1995 , cf. Figure V.29-A) : 250 domaines immunoglobulines (Ig) en série, 1  $\mu\text{m}$  de long et une masse de 3 500 000 Da. Cette protéine est présente dans les cellules musculaires au niveau des sarcomères. Elle s'étend sur la moitié du sarcomère, depuis la bande Z jusqu'à la bande M. Le rôle supposé de cette protéine est de restaurer l'état initial d'un muscle après élongation. Pour déduire cela, plusieurs travaux de mesures d'élasticité ont été réalisés (Kellermayer, 1997 ; Tskhovrebova, 1997). Il a été montré que les domaines Ig de la titine sont déplaçables (cf. Figure V.29-B) puis repliables.



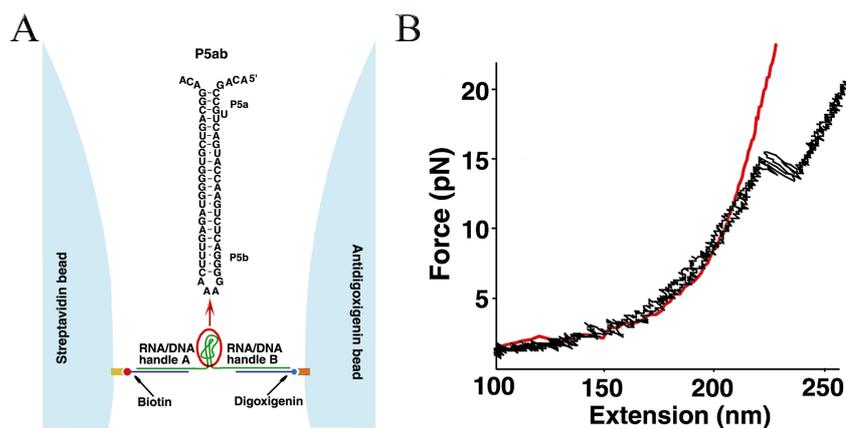
**Figure V.29 : Illustration et mesures du dépliage de domaines Ig de titine**

(A) (Keller, 1997, [www.nature.com](http://www.nature.com)) Organisation générale de la titine. Voir texte pour légende. (B) (Adaptée de Oberhauser, 2001, [www.pnas.org](http://www.pnas.org)) Dépliage de 12 domaines Ig similaires à ceux de la titine. Ce graphique exprime la force en fonction de l'extension de cette protéine. Chacun des 12 pics de gauche représente le dépliage d'un des 12 domaines. Le 13<sup>ème</sup> pic (marqué par une flèche) correspond au détachement de la protéine de la pointe AFM qui a permis l'étirement.

Dans ce cas-ci, les mesures de forces ont permis de clarifier le rôle de la titine : ce sont les domaines Ig qui contiennent la réserve de longueur afin de supporter l'élongation, et leur tendance à se replier, après ouverture, permet le retour à l'état initial du muscle. Là aussi, il est visible que les mesures de forces ne permettent pas de voir la structure de la protéine, mais de voir son organisation, sa composition structurale (domaines identiques déplaçables).

### *Étirement d'ARN*

Il est connu que l'ARN doit être replié dans les trois dimensions pour permettre certaines catalyses (ex : ARN ribosomal). Le dépliement d'un ARN possédant une structure en « épingle à cheveux » (Liphardt, 2001, cf. Figure V.30-A.P5ab) a été effectué à l'aide de pinces optiques. L'étirement de l'épingle à cheveux (cf. Figure V.30-B) montre que cette épingle est bien présente et donne une signature élastique sous la forme d'un plateau de force (*i.e.* il ne faut plus forcer pour étirer). De plus, cette structure se replie d'elle-même lorsque la contrainte n'est plus appliquée. Ce qui prouve que l'existence de cette épingle à cheveux est directement liée à la séquence. Ces expériences ont aussi pu clarifier le rôle que les ions  $Mg^{++}$  peuvent avoir dans ce type de structure (données non présentées ici).



**Figure V.30 : Élasticité d'une molécule d'ARN**

(Adaptée de Liphardt, 2001, [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org))

(A) Description du matériel expérimental. L'ARN P5ab : sa structure et sa séquence sont présentées en haut de la figure. En bas de la figure est présenté le montage expérimental utilisé : deux billes fonctionnalisées, l'une par de la biotine, l'autre par de l'antidioxigénine, sont mises en présence de deux brins d'ADN fonctionnalisés avec les substrats spécifiques de chacune des billes. Ces brins d'ADN se lient donc à leurs billes respectives. Ils ont une séquence homologue à une des deux parties permettant d'attraper l'épingle à cheveux (*handle A* et *handle B*). Un hybride ADN/ARN se forme et permet ainsi de saisir l'épingle entre deux billes. (B) Résultat de l'étirement d'ARN. Ce graphique représente la force appliquée à l'ARN en fonction de son extension. Les courbes d'étirement se superposent aux courbes de relaxation. La courbe rouge représente l'étirement des *handles* seuls, et la courbe noire représente l'étirement de l'ensemble « *handles* + P5ab (épingle) ». Un plateau de force correspondant à la présence de l'épingle à cheveux est mis en évidence.

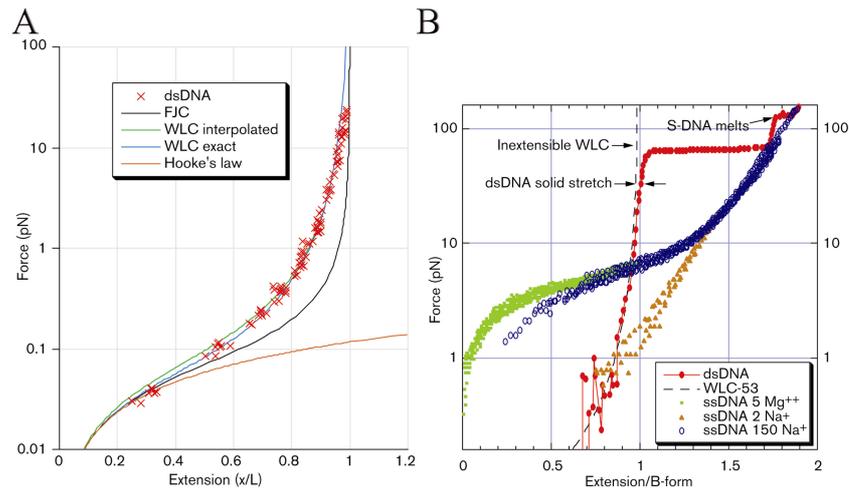
Cette expérience montre que l'élasticité apporte des informations différentes et originales par rapport à celles qu'auraient pu fournir, par exemple, la microscopie électronique sur cette structure en épingle à cheveux. La mesure de force étant un processus dynamique, destructif seulement si l'opérateur le choisit. Il a pu être montré que cette structure était liée à la séquence et que même une fois dépliée, elle se reformait spontanément.

### *Étirement d'ADN*

L'ADN fait partie des premières molécules biologiques sur lesquelles ont été effectuées des mesures de force. Il a aussi été utilisé comme un polymère modèle par la physique des polymères. La structure de l'ADN est relativement bien connue, alors pourquoi tirer sur ce polymère ? Tout d'abord, comme cela a été montré au cours du chapitre V.3, l'ADN fait partie de toutes les structures de la chromatine, vu qu'il en est la base. Pour pouvoir mieux comprendre les structures plus compactes et plus complexes de la chromatine, par des mesures d'élasticité, il faut d'abord bien connaître l'élasticité de l'ADN. Une fois cette élasticité bien connue, il est ainsi possible de mieux comprendre, par exemple, comment une protéine (un nucléosome, un facteur de transcription, etc.) interagit avec l'ADN.

Un grand nombre d'expériences d'étirement d'ADN ont été effectuées depuis les 10 dernières années (Smith, 1992 ; Cluzel, 1996 ; Smith, 1996 ; Rief, 1999). Les résultats présentés ci-dessous (cf. Figure V.31) permettent de caractériser l'ADN sous sa forme simple ou double brin (forme B) et de voir l'effet des ions mono- et divalents sur l'élasticité de l'ADN simple brin (Bustamante, 2000a).

Le but de la première expérience (cf. Figure V.31-A) est de comparer l'élasticité de l'ADN double brin à celle que prévoiraient différents modèles de prédiction de l'élasticité. Les données expérimentales sont relativement bien modélisées par les modèles WLC exact et WLC modifié (Marko, 1995 ; Wang, 1997, *Worm Like Chain*). Ces modèles physiques permettent de mieux comprendre le comportement de l'ensemble du polymère. Les auteurs (Bustamante, 2000a) ont aussi cherché à voir si la résistance à l'étirement de l'ADN simple brin était affectée par la présence de  $Mg^{++}$ , ce qui n'est pas le cas (cf. Figure V.31-B). Comme le montrent les résultats présentés dans cette expérience (mais cela avait été mis en évidence par d'autres équipes), les mesures d'étirement d'ADN montrent qu'au-delà de 65 pN, l'ADN passe de sa forme B à une forme présumée étirée (ou forme S). Après ce plateau, les liaisons entre les deux brins se rompent. Certaines équipes (Essevaz-Roulet, 1997) ont montré qu'utiliser cette technique dans un but de séquençage été vain car la rupture d'une liaison forte (par exemple une liaison G-C) entraîna la rupture de toutes les liaisons faibles suivantes jusqu'à la rencontre d'une autre liaison forte.



**Figure V.31 : Élasticité de l'ADN**

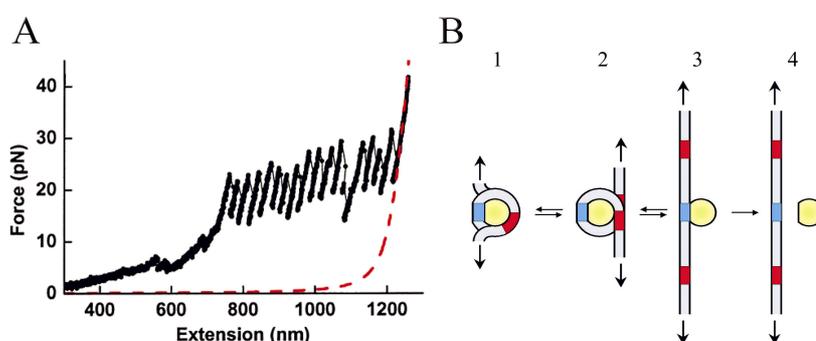
(Adaptée de Bustamante, 2000b, [www.bmn.com](http://www.bmn.com))

Les axes des ordonnées de ces deux graphiques sont en échelle logarithmique. **(A)** Comparaison entre modèles d'élasticité et mesures expérimentales d'étirement d'ADN. Les mesures expérimentales (dsDNA) sont bien modélisées par le modèle WLC. Le modèle FJC modélise correctement les faibles et les très grandes extensions. La loi de Hooke ne permet que de modéliser les très faibles extensions. **(B)** Effet d'ions mono et divalents sur l'élasticité de l'ADN simple brin (ssDNA) et passage de la forme B de l'ADN double brin à la forme étirée.

### *Dépliage de nucléosomes*

Par rapport à l'étirement d'ADN, l'étirement de nucléosomes permet d'étudier une structure beaucoup plus proche de celles observées dans la cellule. Il a été montré notamment que les extrémités N-terminales des nucléosomes pouvaient jouer un rôle dans la régulation de la transcription. Cette régulation semble être possible grâce à l'interaction (ou l'absence d'interaction) entre ces extrémités N-terminales et l'ADN. Il est donc important de comprendre comment, physiquement, le nucléosome interagit avec l'ADN.

L'expérience présentée ici marque un pas dans la direction de cette compréhension. Les auteurs (Brower-Toland, 2002) ont étiré à l'aide de pinces optiques un fragment d'ADN (3 684 pb d'ADN 5S) comportant 17 nucléosomes (cf. Figure V.32-A) fortement positionnés. Les résultats des mesures nécessaires pour déplier les 17 nucléosomes montrent que, tout d'abord, 76 pb peuvent être enlevés de l'octamère assez facilement. Ensuite, qu'une interaction forte existe avec les bases restantes entourant l'octamère. Il est nécessaire de tirer plus fort ( $F > 15$  pN) sur le nucléosome pour que ces bases s'en décrochent. Mais, environ 11 pb interagissent toujours avec l'octamère et il est nécessaire de tirer beaucoup plus fort ( $F > 22$  pN) pour pouvoir complètement dissocier l'octamère (cf. Figure V.32-B) de l'ADN.



### Figure V.32 : Dépliage de nucléosomes

(Adaptée de Brower-Toland, 2002, [www.pnas.org](http://www.pnas.org))

(A) Graphique représentant la force appliquée sur un fragment d'ADN comportant 17 nucléosomes en fonction de son extension (courbe noire). 17 pics de force correspondant au dépliage des 17 octamères d'histones de cœur sont observés. La courbe en pointillés rouges montre en comparaison l'étirement de l'ADN sans nucléosome. (B) Modèle de dépliage en 3 étapes du nucléosome. L'octamère d'histone de cœur est représenté en jaune, 147 pb d'ADN font 1,65 tour autour du nucléosome de cœur. Les marques rouges et bleues correspondent à des repères visuels. L'étape 1 correspond à l'état initial du nucléosome. Une force est appliquée sur l'ADN (représentée par deux flèches opposées). L'étape 2 du dépliage indique que 76 pb ont été enlevés du nucléosome. L'étape 3 indique qu'ensuite 80 pb se déplient du nucléosome mais que 11 pb interagissent encore avec le nucléosome. Finalement l'étape 4 montre l'enlèvement total de l'octamère de l'ADN.

### ***Les mesures de force en biologie ne sont pas seulement un outil***

Les quelques exemples de techniques et de résultats présentés ici ne doivent pas laisser croire que les mesures de force en biologie se limitent à un catalogue de techniques utilisables pour répondre à des questions que se posent les biologistes. Les résultats obtenus par ces techniques, même s'ils le sont à partir d'objets biologiques, sont intéressants dans plusieurs domaines comme la physique des polymères ou la physique en général. La complexité même des objets biologiques (dimensions, composition hétéroclite, etc.) et/ou leur sensibilité à la force ionique permettent de produire des résultats intéressants pour beaucoup de domaines.

### ***Un exemple : le paysage énergétique***

Les travaux effectués sur la liaison biotine/streptavidine, réalisés entre autres par Evan Evans (Merkel, 1999), ont démontré en biologie que la force nécessaire pour séparer deux objets dépendait de leurs propriétés viscoélastiques. Ces expériences montrent entre autres que le résultat d'une mesure de force dépend de la façon dont cette force est appliquée (Evans, 1998, 2001a). Plus précisément, appliquer une force sur un objet déforme le potentiel d'interaction des  $n$  éléments qui le composent. Le potentiel d'interaction d'un objet décrit l'énergie du système lorsque, par exemple, deux objets se trouvent à une distance  $X$  l'un de l'autre. Une fois le potentiel déformé, par exemple en étirant un objet de 1 % de sa taille initiale, l'objet devient différent : les molécules de cet objet ne « voient » pas le même paysage énergétique autour d'elles qu'auparavant. Les interactions entre molécules changent (cf. Figure V.33-A et B).

Prenons un exemple pour décrire cette propriété. Au temps 0, l'objet est dans son état énergétiquement le plus stable. Ensuite une force  $\mathcal{F}$  est appliquée lentement sur l'objet. Donc au temps 1 s, l'objet a été étiré d'une distance  $\varepsilon$ . Le fait que le système soit contraint entraîne une modification du paysage énergétique vu par chacune des molécules du système. Or, la vitesse à laquelle la force est appliquée est très lente : cela laisse le temps aux molécules du système de trouver le passage le moins coûteux énergétiquement parlant pour passer de l'état initial vers l'état étiré. Le résultat de cette expérience est donc qu'une faible force a été nécessaire pour pouvoir allonger l'objet d'une distance  $\varepsilon$ .

Changeons maintenant les conditions de l'expérience. Au temps 0, le système se trouve dans son état le plus stable. Au temps 0,01 s le système a été étiré d'une même distance  $\varepsilon$  : la vitesse d'étirement est donc plus grande. La force appliquée au système est toujours la même ( $\mathcal{F}$ ). Ce qui diffère de l'expérience précédente, c'est le temps au bout duquel la force  $\mathcal{F}$  sera atteinte : un temps bien plus court. Nous parlons alors d'un taux de variation de force  $\left(\frac{\mathcal{F}}{\text{temps}}\right)$  plus grand. Lorsque le taux de variation de force est suffisamment élevé, le potentiel d'interaction se déforme rapidement. Or, les molécules mettent un certain temps pour passer de l'état le plus stable vers l'état étiré. Au cours de ce laps de temps, le potentiel d'interaction continue à se déformer et les molécules n'ont pas le temps de toutes passer vers l'état déplié. Le fait que nous ne laissons pas au système le temps de réagir à la contrainte implique qu'il est nécessaire de fournir plus de force par unité de temps pour atteindre cet état. Ceci, en comparaison de la force par unité de temps nécessaire pour atteindre le même état, mais à une vitesse plus faible. Le taux de variation de force nécessaire pour passer de l'état le plus stable vers l'état déplié dépend donc du temps que le système met pour réagir à la contrainte.

Nous avons vu que le taux de variation de force dépendait de la vitesse, mais il dépend aussi de la constante de ressort de l'objet (la membrane d'érythrocyte par exemple) qui permet l'étirement. En effet, plus la constante de ressort de la membrane sera grande par rapport à celle de la liaison biotine/streptavidine par exemple, plus la force de rappel exercée par la membrane sera grande. La membrane sera donc peu déformée au cours de l'étirement. Ce sera donc à la liaison biotine/streptavidine de « s'allonger » plutôt qu'à la membrane de se déformer. L'inverse est aussi vrai.

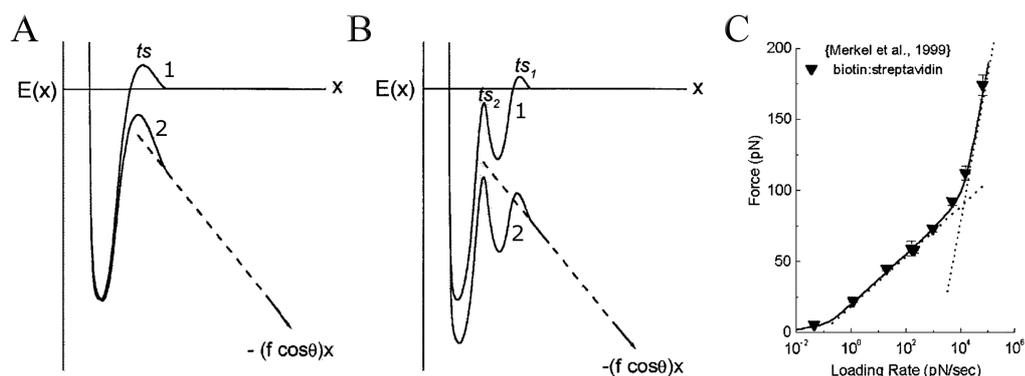
A noter que dans le cas de l'étirement de chromosome, c'est donc le produit de la vitesse d'étirement ( $v$ ) par la constante de ressort ( $\mathcal{K}$ ) de la pipette la plus souple permettant l'étirement qui donne le taux de variation de force.

$$\text{Taux de variation de force} = \mathcal{K} \cdot v$$

#### **Équation V.1 : Définition du taux de variation de force dans le cas de l'expérience d'étirement de chromosome**

Le taux de variation de force a la dimension d'une force par unité de temps et son unité est le  $\text{N} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Comme cela est montré dans la Figure V.33-C, le taux de variation de force influe effectivement sur la force nécessaire pour casser la liaison biotine/streptavidine. Plus le taux de variation de force est élevé, plus la liaison résiste : il faut plus de force pour l'allonger. Dit autrement, à constante de ressort de l'instrument de mesure égale, si l'on souhaite casser la biotine/streptavidine, il faut moins de force pour la casser lentement qu'il ne faut de force pour la casser rapidement.



**Figure V.33 : Déformation du potentiel d'interaction par application d'une force**

(A) (Evans, 2001a, <http://biophys.annualreviews.org/cgi/content/abstract/30/1/105>) Ce graphique représente l'énergie du système en fonction de la distance  $X$  entre deux objets. La courbe (A)-1 représente le potentiel d'interaction du système dans son état normal. Lorsqu'une force  $F$  est appliquée avec un angle  $\theta$  sur l'objet, la courbe (A)-1 est modulée par la droite  $-F(\cos\theta)x$  et devient ainsi la courbe (A)-2. On observe que la barrière énergétique qui sépare l'état le plus stable du système de l'état de transition vers le déplieement ( $t_s$ ), est plus grande dans le cas du système natif que dans le cas du système subissant une contrainte.

(B) (Evans, 2001a, <http://biophys.annualreviews.org/cgi/content/abstract/30/1/105>) Idem à la figure (A), hormis que cette fois-ci un état intermédiaire  $t_{s2}$  a été représenté et la barrière vers l'état déplié se nomme  $t_{s1}$ . On observe que la barrière de transition entre l'état stable et l'état de transition diminue tout comme la barrière à franchir pour la séparation des 2 objets. Mais il est aussi visible que le passage de l'état  $t_{s2}$  vers l'état  $t_{s1}$  n'est plus énergétiquement défavorable dans le cas où le système subit une contrainte.

(C) (Merkel, 1999, [www.nature.com](http://www.nature.com)) Graphique représentant la force nécessaire pour séparer une streptavidine d'une biotine en fonction du taux de variation de force (= *loading rate*). L'échelle des abscisses est logarithmique. On observe clairement deux régimes.

Et cela est lourd de conséquences. Cela signifie qu'une force mesurée pour étirer un objet viscoélastique dépend du taux de variation de force, *donc de la manière dont l'expérience est réalisée*. Une simple valeur de force n'a donc de sens que dans des conditions précises. Afin de bien définir l'élasticité d'un objet viscoélastique, il est donc nécessaire de mesurer sa signature élastique (ou paysage énergétique), c'est-à-dire la manière dont sa résistance à l'étirement évolue en fonction du taux de variation de force. Ceci dans le but de clairement définir la résistance à l'étirement de l'objet.

A noter que la notion de « temps nécessaire au système pour passer d'une configuration à l'autre », introduite auparavant, demande quelques explications plus précises. Le temps nécessaire par exemple pour une molécule, pour passer d'un état à l'autre, est de l'ordre de la nanoseconde. Un temps qui est bien plus court que tous les temps caractéristiques de l'expérience. Le « temps nécessaire au système pour passer d'une configuration à l'autre » est directement fonction de la hauteur de la barrière énergétique qui sépare les deux états. Plus cette barrière est grande, plus il faudra de temps pour qu'une fluctuation thermique permette au système de passer de façon déterministe d'un état à l'autre (et vice-versa).

A noter aussi que les travaux d'E. Evans montrent que le paysage énergétique des objets biologiques n'est pas quelque chose de statique. E. Evans propose plutôt le terme de « spectroscopie de force ». Un terme qui introduit une notion cinématique (puisqu'il contient la fréquence) à la notion de paysage énergétique.

#### ***d. Résistance à l'étirement***

##### ***Quelques définitions***

Au cours de ces quelques définitions, nous nous contenterons de ne traiter que le cas de l'élasticité longitudinale (selon l'axe  $xx$ ) car l'élasticité selon les autres axes est négligeable au cours de nos expériences.

**La contrainte longitudinale** ( $\sigma$ ) appliquée sur un objet représente la force ( $F$ ) appliquée sur l'objet par unité de surface (section  $s$ ), soit :

$$\sigma = \frac{F}{s}$$

**La déformation longitudinale** ( $\varepsilon$ ) représente le rapport de l'allongement (ou de la compression) sur la longueur initiale de l'objet ( $l_0$ ), soit :

$$\varepsilon = \frac{l - l_0}{l_0} = \frac{\Delta l}{l_0}$$

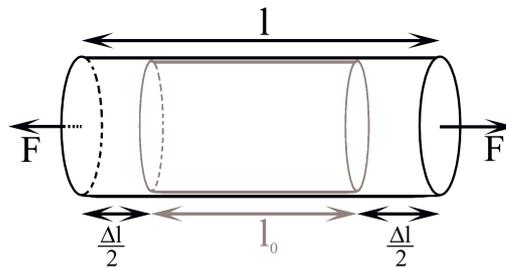
où  $l$  est la longueur après allongement.

**Le module de Young** ( $\mathcal{Y}$ ) représente la force nécessaire pour allonger (ou comprimer) un objet de section donnée (cf. Figure V.34). Il a la dimension d'une pression et son unité est le Pascal.  $\mathcal{Y}$  est le facteur de proportionnalité entre la contrainte et la déformation, soit :

$$\sigma = \mathcal{Y} \cdot \varepsilon$$

ou bien :

$$\frac{F}{s} = \mathcal{Y} \times \frac{\Delta l}{l_0}$$



**Figure V.34 : Illustration du module de Young**

(© Sébastien Almagro, 2003)

Une force  $\vec{F}$  longitudinale est appliquée sur un cylindre de longueur initiale  $l_0$  et de section  $s$ . Le cylindre s'allonge ainsi d'une longueur  $\Delta L$ . Le module de Young représente le facteur de proportionnalité entre l'allongement dudit cylindre et la force à fournir pour l'allonger.

Il y a deux restrictions au module de Young : il n'est mesurable que pour de faibles déformations et l'allongement doit être parfaitement réversible. De plus, le module de Young est valable pour une section donnée. Si au cours de l'étirement la section de l'objet est modifiée de façon inhomogène, le module de Young n'est pas utilisable. Afin de s'affranchir de ces inconvénients, nous utilisons le module d'étirement ou **stretch modulus** ( $\mathcal{SM}$ ). Le stretch modulus représente la force nécessaire pour allonger un objet, indépendamment de sa section. Il a donc la dimension d'une force et son unité est le Newton.  $\mathcal{SM}$  est donc le rapport de proportionnalité entre la force et l'allongement.

Il est défini comme suit :

$$F = \mathcal{SM} \times \frac{\Delta l}{l_0}$$

### **Équation V.2 : Définition du stretch modulus**

Une autre grandeur intéressante est le **coefficient de Poisson** ( $\nu$ ). Le coefficient de Poisson représente l'allongement transversal provoqué par l'allongement longitudinal. Dit en d'autres termes, le coefficient de Poisson représente la manière dont évolue le rayon de l'objet en fonction de l'allongement.

$\nu$  est défini par :

$$\nu = \frac{\varepsilon_r}{\varepsilon}$$

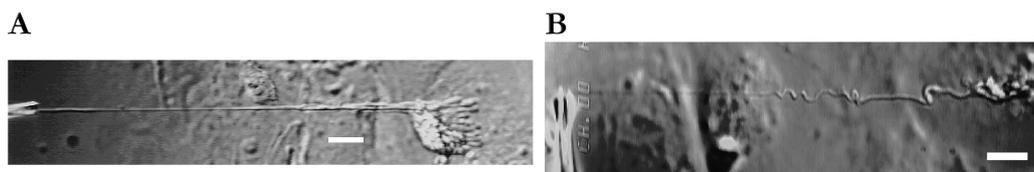
### **Equation V.3 : Définition du coefficient de Poisson**

Où  $\varepsilon_r$  représente l'allongement radial. A noter que  $\nu$  est borné :  $-1 < \nu \leq \frac{1}{2}$

### *Etirements de chromosomes déjà effectués*

La toute première expérience de mesure d'élasticité de chromosomes a été réalisée en 1983 par le Dr. Nicklas (Nicklas, 1983). Les mesures avaient donné un module de Young pour les chromosomes de sauterelle d'environ 500 Pa. Les premières expériences de mesure de l'élasticité des chromosomes, dans le but d'étudier leur structure, datent quant à elles, de 1997 (Houchmandzadeh, 1997). Ces mesures ont été effectuées sur des chromosomes *in vivo* de salamandre. A l'aide d'une seule micropipette, les auteurs venaient attraper l'extrémité d'un chromosome et tentaient de le tirer vers l'extérieur de la cellule. Ces résultats ont montré tout d'abord que le chromosome métaphasique est extrêmement étirable : Il peut être étiré 10 fois sa longueur initiale ( $\varepsilon \leq 10$ ) puis reprendre son aspect original. A partir de plus grandes déformations ( $\varepsilon \cong 30$ ), le chromosome s'amincit d'environ un facteur 15 et présente des ondulations d'apparences hélicoïdales qui sont irréversibles. Il casse pour  $\varepsilon \sim 100$ . A noter que l'amincissement est irrégulier le long du chromosome. Ces mesures ont montré que les chromosomes métaphasiques de salamandre ont un module de Young  $\mathcal{Y} = 1\ 000 (\pm 200)$  Pa, et un coefficient de Poisson  $\sigma = 0,20 (\pm 0,05)$ . Chose très intéressante, les auteurs ont aussi mesuré le module de Young juste après la disparition de l'enveloppe nucléaire en prométaphase ( $\mathcal{Y} = 5\ 000 (\pm 1\ 000)$  Pa).

De ces résultats, les auteurs ont conclu que seule une structure repliée/enroulée pouvait prétendre à de telles caractéristiques mécaniques. La diminution de la résistance à l'étirement entre prométaphase et métaphase est supposée être due à un remodelage de la chromatine.



**Figure V.35 : Étirement de chromosomes de salamandre *in vivo***

(Adaptée de Houchmandzadeh, 1997, [www.jcb.org](http://www.jcb.org))

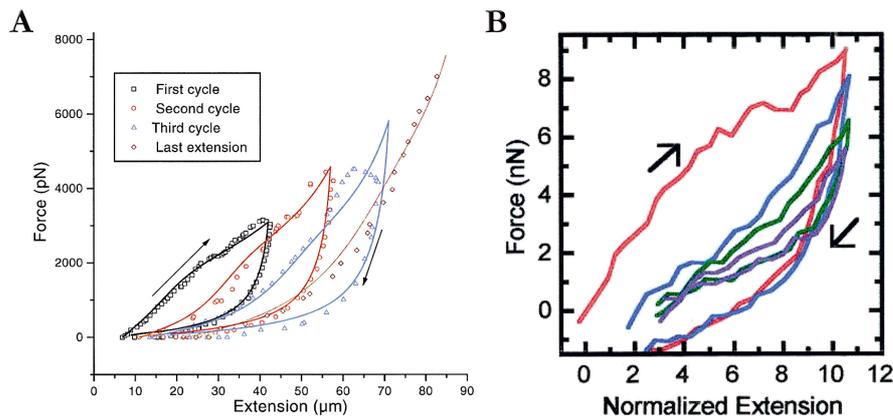
Ces deux images de microscopie de contraste interférentiel différentiel montrent l'étirement d'un chromosome métaphasique (barres d'échelle = 10  $\mu\text{m}$ ). Une pipette (à gauche) tire depuis l'amas de chromosomes de la cellule (à droite) un seul chromosome. **(A)** Étirement d'un chromosome au régime des faibles déformations ( $\epsilon < 10$ ). **(B)** Un chromosome après étirement au régime des grandes déformations ( $\epsilon > 30$ ). On observe que le chromosome très étiré présente des ondulations d'apparence hélicoïdales lors du relâchement de la contrainte.

La technique d'étirement a été modifiée par la suite. Ce n'est plus un chromosome extirpé d'un amas chromosomique qui est étiré, mais un chromosome individuel et ce, toujours à l'aide de micropipettes. Pouvoir attraper un chromosome par ses deux extrémités, en l'aspirant à l'aide de micropipettes, permet de mesurer relativement précisément les forces appliquées sur ce dernier. Ce genre d'expériences a été effectué à peu près à la même époque par deux équipes sur deux systèmes biologiques différents :

- Les chromosomes *in vivo* de salamandre, mais une solution de détergent est projetée sur l'amas de chromosomes afin d'en individualiser un (Poirier, 2000).
- Les chromosomes mitotiques assemblés *in vitro* de *Xénope* (Houchmandzadeh et Dimitrov, 1999), des chromosomes assemblés selon la technique décrite dans le chapitre V.5.b.

Un certain nombre de résultats sont identiques entre les deux systèmes. Il a été montré que les chromosomes mitotiques assemblés *in vitro* de *Xénope* avaient un module de Young à peu près égal à ceux précédemment mesurés pour la salamandre *in vivo* (~ 1 000 Pa). Notez que les chromosomes mitotiques assemblés *in vitro* de *Xénope* ne possèdent qu'une seule chromatide contrairement à ceux *in vivo* de salamandre qui en possèdent deux. Des expériences menées par la nouvelle technique d'étirement sur les chromosomes de salamandre ont montré par la suite un module de Young de l'ordre de 250 Pa. Mais la variabilité des mesures sur les deux systèmes biologiques est relativement importante. Le coefficient de Poisson des chromosomes de salamandre a aussi été remesuré et donne  $\nu = 0,069 (\pm 0,005)$ . Ce résultat montre que le chromosome peut être fortement allongé sans qu'il s'amincisse trop. L'amincissement du chromosome est d'ailleurs une fonction linéaire de l'allongement (Poirier, 2000).

Les deux équipes ont toutes deux mis en évidence que, lors d'étirements au régime des faibles déformations ( $\varepsilon > 3$ ), le chromosome relaxait de la longueur de manière réversible, *i.e.* qu'il retrouvait sa longueur initiale après l'étirement. Les deux équipes ont aussi montré que des étirements à de plus grandes déformations entraînaient l'apparition d'une hystérésis (cf. Figure V.36-A et B). C'est-à-dire qu'une partie de la longueur que le chromosome libère sous tension ne revient pas dans son état initial : Après chaque étirement, le chromosome devient plus long qu'il ne l'était avant l'étirement. Il a été montré que la répétition de cycles successifs d'étirement/relaxation de mêmes amplitudes entraînait une diminution de l'hystérésis observée (cf. Figure V.36-B) et que l'augmentation de l'amplitude de l'étirement augmentait l'hystérésis (cf. Figure V.36-A).



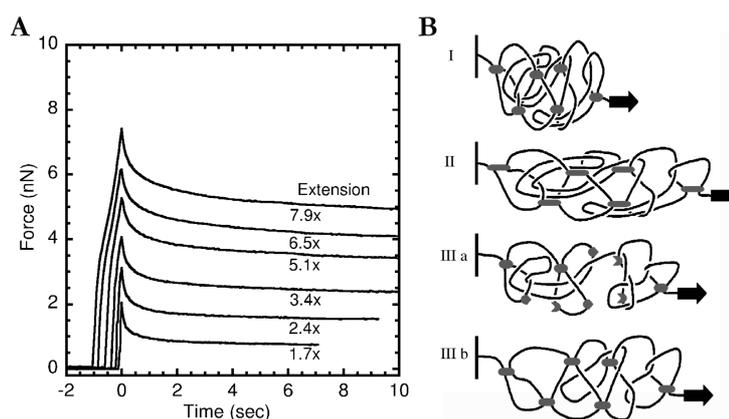
**Figure V.36 : Régime hystérétique de l'étirement de chromosomes**

Sur ces deux graphiques sont représentées des flèches montantes, indiquant la phase de mise sous tension du chromosome et des flèches descendantes, indiquant le relâchement de la contrainte. **(A)** (Houchmandzadeh et Dimitrov, 1999, [www.jcb.org](http://www.jcb.org) ) Augmentation de l'hystérésis avec la déformation. Sur ce graphique sont représentés des cycles successifs d'étirements d'un seul et même chromosome. On observe que l'hystérésis (surface interne des courbes) augmente avec l'extension. **(B)** (Adaptée de Poirier, 2000, <http://www.molbiolcell.org/cgi/content/full/11/1/269> ) Diminution de l'hystérésis à déformation égale. 4 cycles d'étirements d'un même chromosome sont représentés. Dans l'ordre : Cycle 1 en rouge, cycle 2 en bleu, cycle 4 en vert et cycle 6 en bleu. On observe que cette hystérésis décroît au fil des cycles, indiquant qu'une partie du dépliement du chromosome est irréversible.

Il a aussi été montré que les chromosomes de salamandre (Poirier, 2000), lorsqu'ils sont étirés à de faibles vitesses, prennent un aspect « gonflé » en certains points du chromosome. Ce qui n'a pas été montré chez les chromosomes mitotiques assemblés *in vitro* de *Xénope* car selon l'auteur, l'étirement est trop rapide. Par contre chez le *Xénope*, est observée l'apparition d'un chromosome « fantomatique » (Houchmandzadeh et Dimitrov, 1999, cf. Figure V.17-A, p47). Dans ce cas-ci, le chromosome sous tension semble posséder un ou plusieurs axes trop fins pour être visibles. Ces axes fins ( $r \leq 10$  nm) sont capables de supporter toute la contrainte.

Des expériences ont ensuite été menées dans le but d'étudier comment le chromosome relaxait de la longueur (Poirier, 2001). Dans ce but, les auteurs appliquent une contrainte rapide et laissent le chromosome sous tension. Le chromosome s'allonge sous la contrainte et les auteurs mesurent la décroissance de la force au cours du temps (cf. Figure V.37-A). La viscosité mesurée est de l'ordre de  $100 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ , soit  $10^5$  fois celle de l'eau. L'explication la plus plausible de ces mesures est que le chromosome mitotique serait formé de boucles de chromatine reliées entre elles par des protéines (cf. Figure V.37-B-I) permettant le maintien du chromosome. Ces boucles sont emmêlées les unes dans les autres. Lors de l'application d'une force, l'ensemble du système est contraint (cf. Figure V.37-B-II).

Il y a donc deux possibilités pour le chromosome mitotique de relaxer de la longueur. Soit des protéines se décrochent de la chromatine (cf. Figure V.37-B-IIIa), soit les boucles se désenchevêtrent (cf. Figure V.37-B-IIIb).



**Figure V.37 : Relaxation dynamique des chromosomes de salamandre**

(Poirier, 2001, <http://prl.aps.org/>)

(A) Mesure de la dynamique de relaxation de longueur du chromosome de salamandre. Le chromosome est très rapidement tendu puis laissé sous contrainte. Le chromosome réagit à la tension en relaxant de la longueur jusqu'à une valeur d'extension indiquée à droite de la figure. C'est cette réaction qui est étudiée en fonction du temps. La viscosité mesurée est de l'ordre de  $100 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ . (B) Modèle de relaxation de la contrainte du chromosome mitotique. Les protéines de liaison entre boucles de chromatine sont représentées par des points gris et la direction de la contrainte par des flèches noires. Voir texte pour légende.

D'autres expériences dont le but étaient de quantifier l'effet des différents ions sur la compaction des chromosomes mitotiques ont été effectuées sur des chromosomes de salamandre (Poirier, 2002b). Les résultats sont présentés dans le Tableau 1. L'expérience se présente de la manière suivante : un chromosome est attrapé entre deux pipettes. Il est ensuite légèrement tendu (*initial force constant*) et une troisième pipette remplie d'une solution ionique projetée pendant un certain temps (*exposure time*) la solution. L'effet de chaque ion sur la compaction du chromosome mitotique est mesuré par la différence de tension appliquée sur les pipettes avant et au bout d'un certain temps d'injection (*% change in force constant*).

Ces résultats montrent tout d'abord que la force ionique peut influencer de manière importante la compaction. Cette compaction est réversible si l'injection d'ion est de courte durée. L'effet du  $Mg^{2+}$  à faible concentration est assez important, confirmant le fait que le  $Mg^{2+}$  est un ion capable de participer à la chromatine. Mais ce qui est intéressant c'est que la chromatine du chromosome mitotique, les boucles de chromatine plus exactement, ont suffisamment de degrés de liberté pour pouvoir être remodelées par les ions. La compaction étant isotrope, ces résultats excluent des modèles de structuration des chromosomes du type « loops + scaffold ». Les résultats vont plutôt dans le sens du modèle de la Figure V.37-B.

Ion	Maximum concentration (mM)	Exposure time (s)	Initial force constant (nN)	Final force constant (nN)	Change in force constant (nN)	% Change in force constant
$Na^+$	30	60	0.43	0.54	+0.11	+26
$Na^+$	300	20	0.32	0.49	+0.17	+53
$Na^+$	600	20	0.37	0.67	+0.30	+80
$Na^+$	2,000	30	0.55	0.65	+0.10	+27
$Na^+$	2,000	270	0.55	0.26	-0.29	-53
$Mg^{2+}$	20	60	0.75	1.39	+0.64	+85
$Mg^{2+}$	100	60	0.42	0.38	-0.04	-10
$Mg^{2+}$	300	20	0.67	0.72	+0.05	+07
$Ca^{2+}$	10	60	0.94	1.14	+0.20	+21
$Co(NH_3)_6^{3+}$	200	40	0.54	0.38	-0.16	-30

**Tableau 1 : Effet de la salinité sur des chromosomes mitotiques de salamandre**

(Poirier, 2002b, [www.jbc.org](http://www.jbc.org))

### e. Mesure des fluctuations d'un objet

La mesure de la résistance à l'étirement n'est pas le seul paramètre élastique intéressant dans le cas du chromosome. Un autre paramètre élastique nommé module de courbure ( $\mathcal{B}$ ) est, lui aussi, pertinent.  $\mathcal{B}$  est relié à l'énergie nécessaire pour modifier la courbure d'un objet. La mesure directe du module de courbure du chromosome est difficile expérimentalement car la force nécessaire pour le flamber (*i.e.* le plier) est très faible.

Mais  $\mathcal{B}$  peut être obtenu de manière indirecte par la mesure de la longueur de persistance ( $\mathcal{L}_p$ ).  $\mathcal{L}_p$  représente la longueur au bout de laquelle l'effet d'une force ponctuelle ne sera plus ressenti par un objet (cf. Figure V.38). Dit autrement,  $\mathcal{L}_p$  est la longueur au bout de laquelle les tangentes à l'objet ne sont plus corrélées. Intuitivement, il est évident que  $\mathcal{L}_p$  et  $\mathcal{B}$  sont reliés l'un à l'autre car l'action d'une force ponctuelle sur une barre par exemple, provoque une modification de la courbure de cette barre. Physiquement,  $\mathcal{L}_p$  et  $\mathcal{B}$  sont reliés par :

$$\mathcal{B} = k_{\mathcal{B}} \cdot \mathcal{T} \cdot \mathcal{L}_p$$

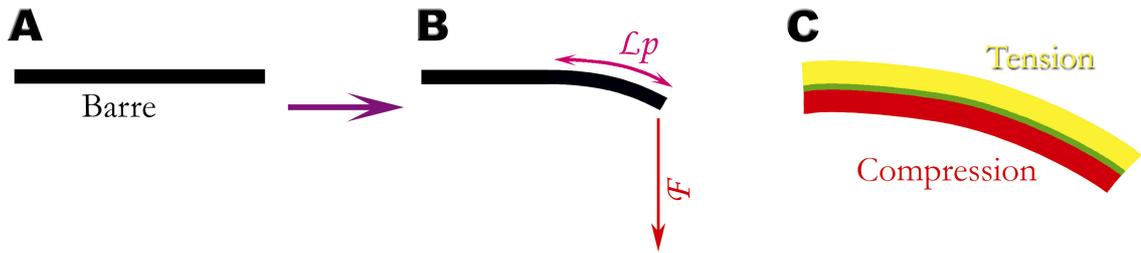
#### Équation V.4 : Relation entre module de courbure et longueur de persistance

Module de Young ( $\mathcal{Y}$ ) et longueur de persistance sont aussi reliés. Lorsqu'une barre est flambée (cf. Figure V.38-B), des zones de tension et de compression apparaissent à l'intérieur de la barre (cf. Figure V.38-C). Tension et compression sont des grandeurs quantifiées notamment par  $\mathcal{Y}$ . La relation qui unit  $\mathcal{B}$  et  $\mathcal{Y}$  est la suivante :

$$\mathcal{B} = c \cdot \mathcal{Y} \cdot r^4$$

#### Équation V.5 : Relation entre module de courbure et module de Young

Où  $r$  est le rayon de l'objet et  $c$  est un coefficient de forme de l'ordre de 1 dans le cas du chromosome (Houchmandzadeh et Dimitrov, 1999). A noter que cette dernière relation n'est valable que pour un objet homogène.



**Figure V.38 : Schéma explicatif de la relation entre longueur de persistance et module de Young**

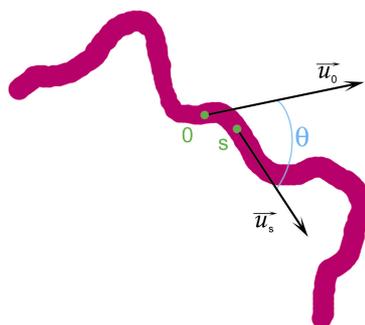
(© Sébastien Almagro, 2003)

A l'extrémité d'une barre au repos (A) est appliquée une force ponctuelle  $\vec{F}$  (B). La barre se défléchit. La courbure due à la force se propage le long de la barre d'une longueur  $L_p$ . La figure (C) représente les zones de tension (en rouge), de compression (en jaune) ou sans contrainte (l'axe central de la barre, en vert).

#### *Mesure de la longueur de persistance d'un objet à partir du calcul de sa fonction d'autocorrélation*

Comme expliqué auparavant,  $L_p$  représente la longueur au bout de laquelle une force ponctuelle appliquée sur un objet se fera ressentir le long de l'objet. Dans le cas d'un polymère de longueur  $l$  en solution, il n'y a pas une seule force ponctuelle mais un ensemble de chocs aléatoires qui « secouent » le polymère au cours du temps. L'amplitude des mouvements du polymère provoqués par ces chocs est fonction de la température. Conséquence, si  $L_p \gg l$ , alors deux points éloignés de l'objet ne changeront pas ou peu de position l'un par rapport à l'autre au cours du temps. Inversement, si  $L_p \ll l$ , alors ces deux mêmes points changeront rapidement de position l'un par rapport à l'autre.

Dans le but de mesurer la longueur de persistance, il est donc possible de mesurer la corrélation (ou l'absence de corrélation) entre les différents points qui constituent le polymère. Deux points (0 et s) de l'objet sont pris (cf. Figure V.39). Les tangentes au chromosome en ces points sont tracées et l'angle entre les deux tangentes est mesuré. La même mesure est effectuée pour tous les points de l'objet.



**Figure V.39 : Illustration de la fonction d'autocorrélation des tangentes dans le cas d'un chromosome**

(© Sébastien Almagro, 2003).

Voir texte pour légende.

Lors de la mesure de la fonction d'autocorrélation des tangentes, la valeur moyennée dans le temps de l'angle entre ces deux points arbitraires 0 et s peut être écrite de la manière suivante dans le cas d'un système à deux dimensions<sup>2</sup> (Ott, 1993) :

$$\langle \cos(\widehat{\vec{u}_0, \vec{u}_s}) \rangle = \langle \cos \theta \rangle = e^{\left( -\frac{s}{2L_p} \right)}$$

#### Équation V.6 : Définition de la fonction d'autocorrélation des tangentes

Où s est l'abscisse curviligne.

En traçant la courbe  $\langle \cos \theta \rangle = f(s)$ , une modélisation de la courbe par une équation de la forme  $y = e^{\left( -\frac{s}{2L_p} \right)}$  nous permet donc d'obtenir la longueur de persistance. Le facteur  $\frac{1}{2}$  dans l'exponentielle découle du fait que le système est à 2 dimensions<sup>2</sup>.

Même si cela ne découle pas directement du calcul de la fonction d'autocorrélation des tangentes, il existe une autre méthode de mesure de  $L_p$  qui est *techniquement* assez proche. A partir la variation angulaire moyenne au cours du temps ( $\langle \Delta \theta \rangle$ ) entre deux segments (de longueur totale  $\ell$ ) du chromosome, il est possible d'obtenir la longueur de persistance :

<sup>2</sup> Landau et Lifchitz, « *Physique statistique (première partie)* ».

$$\langle \Delta\theta^2 \rangle = \frac{\mathcal{K}_B \cdot T \cdot l}{\mathcal{B}} \quad (\text{Poirier, 2002a})$$

$$\text{d'où } \langle \Delta\theta^2 \rangle = \frac{l}{L_p}$$

### **Équation V.7 : Obtention de la longueur de persistance à partir de la mesure de la variation angulaire de deux segments du chromosome**

La démonstration de cette relation est dans Poirier, 2002a. A noter qu'il existe beaucoup d'autres méthodes de mesure de la longueur de persistance comme par exemple l'étude de la variation de la longueur bout à bout de l'objet.

#### *Mesures de longueur de persistance déjà effectuées*

Des mesures de longueur de persistance ( $L_p$ ) / modules de courbure ( $\mathcal{B}$ ) ont été effectuées sur des chromosomes mitotiques assemblés *in vitro* de *Xénope* (Houchmandzadeh et Dimitrov, 1999), des chromosomes *in vivo* de *Xénope* (intracellulaires et extraits de la cellule) et d'embryons de drosophile (Poirier et Marko, 2002).

Dans le système d'étude des chromosomes mitotiques assemblés *in vitro* de *Xénope*, il s'avère que le module de courbure ( $\mathcal{B} \sim 1,2 \cdot 10^{-26} \text{ J.m}^{-1}$ , d'où  $L_p = 2,7 (\pm 0,1) \mu\text{m}$ ) est environ 2 000 fois plus petit que calculé par la relation de l'Équation V.5, p95. C'est cette différence qui est à la base du modèle « axes rigides + gaine molle de chromatine » (cf. Figure V.17, p47). Notons que ce modèle utilise des chromosomes embryonnaires dotés d'une seule chromatide.

Les mesures (Poirier, 2002a) de chromosomes de *Xénope in vivo* dans la cellule donnent  $\mathcal{B} \sim 30 (\pm 30) 10^{-24} \text{ N.m}^{-2}$ . La marge d'erreur est très grande car il est très difficile de mesurer le module de courbure du chromosome directement dans la cellule en raison des bruits de mesures créés par, notamment, le cytosquelette. Les mesures de chromosomes *in vivo* extraits de cellules de *Xénope* donnent approximativement  $\mathcal{B} \sim 5 \text{ à } 20 (\pm 25 \text{ à } 100 \%) 10^{-24} \text{ J.m}^{-1}$ . Ces mesures sur des chromosomes *in vivo* de *Xénope* sont effectuées sur des chromosomes somatiques (donc non embryonnaires). Ils ne présentent pas la différence d'un facteur 2 000 observée entre module de Young et module de courbure. Les chromosomes de salamandre *in vivo* extraits de cellules donnent  $\mathcal{B} \sim 100 \text{ à } 300 (\pm 10 \text{ à } 30 \%) \cdot 10^{-24} \text{ J.m}^{-1}$ . Dans ce cas aussi la différence importante entre module de Young et module de courbure n'est pas observée.

Des mesures récentes (Poirier et Marko, 2002) du module de courbure de chromosomes d'embryons de drosophile montrent qu'ils sont environ dix fois plus souples que les chromosomes de salamandre. Il semble que les chromosomes embryonnaires aient une organisation facilitant des divisions rapides. Ces chromosomes ont la même quantité d'ADN et le même taux de compaction que les chromosomes somatiques. Il est suggéré qu'une maturation du chromosome, lors de stades plus tardifs du développement, ait lieu.

## **VI. Matériels et méthodes.**

### **1. Préambule**

Les expériences présentées dans ce travail utilisent un certain nombre de techniques qui, pour certaines, peuvent être qualifiées de « conventionnelles » par des biologistes ou des physiciens. Or ce travail s'adresse aux deux communautés, chacune pouvant penser que certains rappels présentés dans ce chapitre sont triviaux, mais ce qui est trivial pour un physicien ne l'est pas forcément pour un biologiste et vice-versa. Je me suis donc efforcé d'être le plus descriptif possible afin d'être compris par les deux communautés.

Hormis lors des expériences d'immunofluorescence, *à aucun moment les chromosomes ne sont mis en contact de fixateur*. En présence d'une substance qui fixerait le chromosome, nos expériences d'élasticité n'auraient plus de sens.

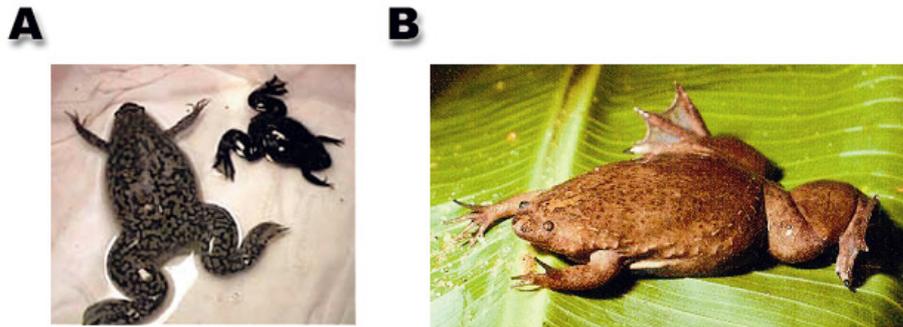
Le fluorochrome que nous utilisons (*Hoechst 33258*) interagit avec l'extérieur du sillon mineur de l'ADN double brin (Bostock-Smith, 1998) avec une préférence pour les séquences riches en A-T : *ce n'est donc pas un intercalant*.

### **2. Extraits mitotiques et sperme démembré de Xénope**

#### **a. Le Xénope**

Notre système d'étude, *Xenopus laevis* (cf. Figure VI.1), est de la classe des amphibiens, ordre des anoures, sous-ordre des pipoidés, famille des pipidés, sous-famille des dactylethrinés, du genre *Xenopus* et de l'espèce *laevis*. Au cours de ce travail, cette grenouille sera appelée par son nom vernaculaire : le *Xénope*.

Le *Xénope* est une grenouille originaire du sud-est de l'Afrique (Angola, etc.). Elle vit dans des lacs et étangs avec une eau à 20-22 °C. Elle passe la majorité de son temps dans l'eau et n'en sort que très rarement. Son comportement est plutôt nocturne et sa taille varie de 6 à 14 cm (selon le sexe et l'âge). Lors d'une période de sécheresse prolongée, elle peut se mettre en état de dormance pendant près d'un an. Elle peut vivre jusqu'à 15 ans en captivité.



**Figure VI.1 : Photographies de *Xénope***

A) ([http://www.ptichka.ru/amfib\\_11.phtml](http://www.ptichka.ru/amfib_11.phtml)) La femelle *Xénope* (à gauche) est beaucoup plus grosse que le mâle *Xénope* (à droite).

B) (<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/xenope1/>) Une autre photographie d'une femelle *Xénope*.

### **b. Obtention d'extraits d'œufs de *Xénope***

Les œufs de *Xénope* ont la particularité d'être relativement gros ( $\varnothing \cong 1,2$  mm) et contiennent suffisamment de réserve pour permettre le développement de l'embryon jusqu'au stade 4000 cellules. C'est cette grande réserve qui nous intéresse plus particulièrement. En extrayant le cytoplasme de ces œufs nous disposons de tout le matériel (protéique, facteurs de transcriptions, etc.) pour permettre la formation et la maturation de chromosomes assemblés *in vitro*. Au fil des années, les protocoles pour la formation de ces chromosomes ont évolué (Lohka et Masui, 1983 ; Smythe et Newport, 1991). Dans notre cas, nous utilisons le protocole de « de la Barre, 1999 ».

#### ***Déclenchement de la ponte et collecte des œufs***

Le *Xénope* ne pond qu'une certaine partie de l'année, nous devons donc provoquer la ponte. Le protocole utilisé est le suivant :

- i. La maturation des oocytes se fait par une première injection de 100 U de gonadotropine chorionique humaine ( $1000 \text{ U.ml}^{-1}$ , *Sigma*, # C0559) dans chaque grenouille 3 à 5 jours avant le jour choisi pour la collecte des œufs.

- ii. Afin d'induire la ponte, la veille au soir du jour choisi pour la ponte, chaque grenouille reçoit 700 à 800 U de gonadotropine chorionique humaine ( $5000 \text{ U.ml}^{-1}$ ).
- iii. Les femelles *Xénope* sont ensuite transférées chacune dans un bac individuel contenant environ 3 litres d'eau à 100 mM NaCl. Elles pondent au cours de la nuit.
- iv. Le jour de la collecte des œufs (environ 14 à 16 heures après la seconde injection de gonadotropine) les œufs (cf. Figure VI.2) sont collectés dans un récipient avec un minimum de liquide (assez pour les recouvrir). Les œufs de chaque grenouille sont mis à part des œufs des autres grenouilles car certains individus pondent des œufs de meilleure qualité que les autres. Afin de ne pas les « polluer », ils sont séparés.



**Figure VI.2 : Photographie d'œufs de *Xénope***

(© Erwin Sigel, 1987)

L'œuf de *Xénope* a la forme d'une sphère dont les deux hémisphères sont différentes. Le pôle animal (partie pigmentée de l'œuf) contient notamment le noyau alors que le pôle végétatif (partie blanche de l'œuf) ne contient que du cytoplasme.

#### ***Enlèvement du mucus qui recouvre les œufs***

Un abondant mucus recouvre les œufs de *Xénope*. Il est nécessaire de l'enlever. Voici le protocole que nous suivons :

- i. Toutes les opérations nécessaires à l'enlèvement du mucus ont lieu à une température d'environ 20-22 °C sinon les œufs peuvent entrer en apoptose très rapidement, surtout si le mucus est absent.

- ii. Une solution de cystéine à 2 % (pH 7,8) est réalisée extemporanément. Le rôle de la cystéine est de « fluidifier » le mucus pour qu'il puisse être enlevé facilement par rinçage.
- iii. Ajouter environ le double du volume d'œufs du volume de solution de cystéine dans le récipient qui contient les œufs puis agiter délicatement afin de bien enlever le mucus.
- iv. Les œufs sont laissés sans agitation pendant 30-45 s puis agités encore. Cette étape d'agitation/sédimentation est répétée plusieurs fois.
- v. Une fois les œufs sédimentés, la solution qui les recouvre est éliminée et à nouveau de la solution de cystéine est ajoutée aux œufs. L'étape d'agitation/sédimentation est aussi recommencée plusieurs fois.
- vi. Les œufs sont ensuite lavés plusieurs fois avec du tampon MMR (100 mM NaCl ; 2 mM KCl ; 1 mM MgSO<sub>4</sub> ; 2 mM CaCl<sub>2</sub> ; 0,1 mM EDTA ; 5 mM HEPES ; pH 7,8) 0,2 M puis transférés dans des boîtes de pétri.
- vii. Les œufs sont triés un à un sous binoculaire afin que ceux qui entrent en apoptose (pôles végétal et animal mal marqués) soient éliminés (à l'aide d'une pipette pasteur).

### *Préparation de l'extrait d'œufs*

Une fois les œufs lavés et triés, nous pouvons isoler le cytoplasme des œufs par le protocole suivant :

- i. Les œufs des différentes grenouilles peuvent être réunis selon un critère de qualité (marquage des pôles). Les œufs sont ensuite rincés plusieurs fois avec du tampon EB (80 mM  $\beta$ -glycérophosphate (*Sigma*)) ; 15 mM MgCl<sub>2</sub> ; 20 mM EGTA ; 1 mM DTT ; pH 7,3) en agitant délicatement. Un maximum de tampon EB est ensuite enlevé.

- ii. Les œufs sont transférés dans des tubes de centrifugation (*12 ml, SW 41 Beckman rotor centrifuge tube*). Un temps d'attente de quelques minutes est ensuite marqué dans le but que les œufs sédimentent (ce qui permet d'enlever encore du tampon EB). Les œufs sont ensuite centrifugés à 170 g (environ 1000 rpm) pendant un court laps de temps à 4 °C.
- iii. L'excès de tampon EB est doucement enlevé.
- iv. Les œufs sont ensuite broyés par une centrifugation de 20 minutes à 20 000 g (15 000 rpm) à 4 °C dans un rotor *SW 41 (Beckman instruments)*. A la fin de la centrifugation, trois différentes fractions sont visibles, respectivement du haut vers le bas du tube : lipidique, cytoplasmique et culot.
- v. Seules les fractions cytoplasmiques sont récupérées par ponction au travers du tube à l'aide d'une seringue. Des inhibiteurs de protéases (aprotinine et leupeptine, 10 µg.ml<sup>-1</sup> final, *Boehringer Mannheim*) sont ajoutés à la fraction cytoplasmique.
- vi. Cette fraction est ensuite transvasée dans des tubes Eppendorf de 2 ml puis centrifugée 15 minutes à 13 200 rpm dans une centrifugeuse de paillasse afin d'enlever encore des contaminants. Le surnageant est appelé « extrait de basse vitesse ». Cet extrait peut-être utilisé pour la formation de chromosomes mais il doit être utilisé le jour même. Afin d'obtenir un extrait conservable sur de longues périodes, nous préparons à partir de cet extrait de basse vitesse un « extrait de haute vitesse » en le centrifugeant à très grande vitesse.
- vii. L'extrait de basse vitesse est transvasé dans des tubes de polypropylène de 2 ml (utilisés pour le rotor TLS 55, Beckman Instruments). Les tubes sont ensuite centrifugés 2 heures à 250 000 g (52 000 rpm) à 4 °C. Suite à cette centrifugation, 5 fractions sont visibles, respectivement du haut vers le bas du tube : lipidique, cytoplasmique, membranaire, mitochondriale et une dernière fraction formée de glycogène et de ribosomes.

- viii. La couche de lipide est enlevée par aspiration à l'aide d'une pompe à vide. La fraction cytoplasmique (l'extrait de haute vitesse) est ensuite enlevée délicatement afin de ne pas la mélanger à la fraction membranaire.
- ix. Cet extrait de haute vitesse est ensuite centrifugé une nouvelle fois dans les mêmes conditions que dans le vii mais pendant 1 heure seulement. Cette étape permet d'éliminer des débris de membranes qui pourraient être encore présents.
- x. L'extrait de haute vitesse est ensuite aliquoté et plongé dans de l'azote liquide afin d'être gelé. Les aliquots peuvent être gardés plusieurs mois à - 80 °C. C'est cet extrait congelé qui sera l'extrait mitotique que nous utiliserons pour former les chromosomes.

*Remarque sur l'extrait d'œufs de Xénope*

Au cours des diverses centrifugations, l'ADN femelle a été éliminé. Il ne reste donc plus d'ADN dans l'extrait d'œuf.

**c. Obtention des noyaux de sperme de Xénope**

Les noyaux de sperme démembrés sont obtenus selon le protocole suivant de la Barre, 1999 :

- i. Après anesthésie du Xénope mâle en le conservant 10 minutes dans un mélange eau/glace, la grenouille est sacrifiée puis disséquée.
- ii. Les intestins sont enlevés permettant ainsi l'accès aux testicules (de forme ovale, de couleur blanche et d'une longueur d'environ 1 cm).
- iii. Les testicules sont ensuite extraits de l'animal puis placés dans une boîte de pétri contenant du tampon T (15 mM PIPES ; 15 mM NaCl ; 5 mM EDTA ; 7 mM MgCl<sub>2</sub> ; 80 mM KCl ; 0,2 M sucrose ; pH 7,4) et rincés plusieurs fois avec ce tampon.
- iv. Les testicules sont ensuite transférés sur du papier absorbant et doucement séchés manuellement. Le corps adipeux qui recouvre les testicules est ensuite enlevé à l'aide de ciseaux.

- v. Les testicules sont ensuite placés dans un tube de 20 ml contenant 2 ml de tampon T puis broyés à l'aide de forceps. Les morceaux sont ensuite centrifugés à 150 g (800 à 1000 rpm) pendant environ 10 s.
- vi. Le surnageant est ensuite placé dans un tube séparé et les débris de testicules sont ensuite recouverts de 2 ml de tampon T et l'étape v réitérée. Les surnageants sont tous réunis dans le tube de 15 ml.
- vii. Le tube est centrifugé 5 minutes à 1500 g (4000 rpm) et le surnageant est ensuite éliminé. Le culot est formé de 2 fractions : une fraction blanche supérieure (le sperme) et une fraction rouge inférieure (particules sanguines). Le sperme est isolé ; séparé du reste en faisant attention d'éviter les contaminants sanguins.
- viii. Le sperme est resuspendu dans 4 ml de tampon T et l'étape vii est répétée.
- ix. L'étape viii est répétée deux autres fois.
- x. Le sperme est resuspendu dans 100 µl de tampon T et dans 300 µl de tampon S (tampon T à 20 mM maltose et 0,05 % lysolecithine) et incubé 5 minutes à température ambiante.
- xi. Placer la suspension de sperme sur la glace. En prélever 1 µl et le mélanger à du Hoechst 33258. Observer sous microscope à fluorescence si les membranes sont bien parties suite au traitement à la lysolecithine. Normalement, si les membranes sont parties, les noyaux de sperme doivent être uniformément marqués par le Hoechst 33258. Si ce n'est pas le cas, la suspension de sperme est incubée 5 minutes de plus à 23 °C puis une vérification d'enlèvement de la membrane est refaite. Continuer cette étape jusqu'à ce que, sous microscope, tous les noyaux de sperme apparaissent démembrés.
- xii. Arrêter la réaction par ajout de 1,2 µl de tampon R (tampon T à 3 % séralbumine bovine). Après centrifugation à 500 g (2000 rpm) pendant 5 minutes, resuspendre le culot dans 1,5 ml de tampon R et le re-centrifuger dans les mêmes conditions qu'auparavant.

- xiii. Resuspendre le culot dans 50 à 100  $\mu\text{l}$  de tampon T et mesurer la concentration à l'aide d'un hémocytomètre. Des aliquots de sperme de 5  $\mu\text{l}$  sont réalisés et stockés à - 80 °C (aliquots conservables plusieurs années). Ce sont ces aliquots congelés que nous utiliserons comme sperme démembré au cours de nos expériences.

### **3. Assemblage de chromosome**

Lorsque nous disposons d'un extrait apte à remodeler des noyaux de sperme en chromosome, nous préparons le mélange suivant (Smythe et Newport, 1991) : 10  $\mu\text{l}$  de tampon EB ; 10  $\mu\text{l}$  d'extrait mitotique ; 2  $\mu\text{l}$  de phosphocréatine 200 mM (dans 10 mM de tampon phosphate de potassium, pH 7) ; 0,4  $\mu\text{l}$  créatine kinase à 0,5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  ; 0,8  $\mu\text{l}$  d'ATP 100 mM ; 0,5  $\mu\text{l}$  de solution de noyaux de sperme à une concentration approximative de 1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

La température ne doit ni être excessive (risque de cassure des chromosomes) ni trop faible (temps d'assemblage trop long). *Xenopus laevis* pond ses œufs dans une eau à environ 21 °C. Il faut donc se trouver à une température assez proche de celle-ci.

### **4. Enlèvement de la topoisomérase II**

Comme décrit dans la littérature, la topoisomérase II peut être enlevée des chromosomes assemblés *in vitro* de *Xénope* par augmentation de la force ionique, et plus précisément, par adjonction de NaCl (Hirano et Mitchison, 1993).

Il est décrit dans la littérature (Hirano et Mitchison, 1993) que la topoisomérase II est totalement enlevée des chromosomes assemblés *in vitro* de *Xénope* par l'ajout de 50 mM NaCl. Dans notre cas, pour être sûrs que toute la topoisomérase II est bien enlevée des chromosomes, nous ajoutons 150 mM NaCl aux chromosomes, soit trois fois plus.

Pour effectuer l'enlèvement de la topoisomérase II, nous ajoutons pendant 30 minutes une solution de NaCl à la solution de chromosomes :

- Pour les western blot et l'immunofluorescence, nous ajoutons un volume équivalent de solution saline deux fois concentrée dans du tampon EB. Donc si nous avons 20 µl de solution de chromosomes, nous y ajoutons 20 µl de tampon EB à 300 mM NaCl.
- Pour les étirements, le tampon de dilution des chromosomes est à 150 mM NaCl. La solution de chromosomes étant diluée environ 60 à 100 fois, nous avons bien une concentration finale de 150 mM NaCl.

A chaque fois, le délai de 30 minutes après ajout de la solution saline est respecté car la topoisomérase II met un certain temps pour être enlevée des chromosomes.

Ce temps écoulé, les tubes sont centrifugés 1 minute à 13200 rpm afin que les chromosomes s'agrègent au fond du tube. Le surnageant est ensuite enlevé délicatement et le culot est resuspendu avec un volume maximal de tampon et ce à trois reprises. Chaque lavage est suivi d'une centrifugation à 13200 rpm pendant 1 minute à température ambiante. Le culot restant est resuspendu dans du tampon de dépôt sur gel (*composition : cf. Maniatis et.al*) puis placé 5 minutes à 100 °C. La moitié du volume obtenu est ensuite déposée sur gel.

## **5. Digestion enzymatique des chromosomes**

Nous avons réalisé deux types de digestion enzymatique de chromosomes. Soit la digestion unique d'un seul chromosome attrapé entre deux micropipettes (expérience détaillée dans le chapitre VI.11), soit une digestion en volume d'un grand nombre de chromosomes (cas de *western blots*). C'est de ce deuxième cas dont je vais traiter dans ce chapitre-ci.

A un volume donné de solution de chromosomes déjà formés est ajouté un volume 12 fois plus grand d'enzyme 13 fois concentrée. Cette enzyme étant diluée dans du tampon EB. Par exemple, si nous voulons digérer 25 µl de solution de chromosomes avec de la trypsine à 50 µg.ml<sup>-1</sup>, nous y ajoutons 300 µl de trypsine à 54 µg.ml<sup>-1</sup> dans du tampon EB. L'enzyme peut être laissée un temps plus ou moins long, ces temps étant spécifiés dans la présentation des résultats.

Une fois ce temps écoulé, par exemple 1 minute, les tubes sont centrifugés 1 minute à 13200 rpm puis les culots sont rincés avec du tampon comme décrit dans le chapitre VI.4. La moitié du volume obtenu est ensuite déposée sur gel.

## **6. Electrophorèse**

L'ensemble de ce travail étant concentré sur l'étude des diverses protéines ayant un rôle ou non dans la cohésion du chromosome, les électrophorèses présentées ici ont toutes été effectuées selon le même protocole.

Brièvement, nous cherchons à détecter la présence ou l'absence de diverses protéines sans nous soucier des interactions avec l'ADN ou d'autres protéines qu'elles pourraient avoir. Ce sont donc des gels SDS de polyacrylamide (Cleveland, 1977) qui ont été réalisés. La masse de l'ensemble des protéines étudiées étant relativement grande, la concentration en acrylamide/bis-acrylamide est de l'ordre de 8 à 10 %. L'intensité du courant lors de la migration est de 18 mA par gel et la durée est d'environ une à deux heures.

## **7. Transfert sur membrane**

Afin de pouvoir accéder facilement aux protéines, ces dernières sont transférées du gel vers une membrane de nitrocellulose. Le transfert est effectué en milieu liquide (25 % tampon de migration SDS ; 16 % éthanol ; qsp 100 % H<sub>2</sub>O Δ). Le transfert est effectué à 100 V pendant une heure.

## **8. Western blot**

Le western blot est une technique qui permet de marquer une protéine présente sur une membrane de transfert permettant ainsi de montrer sa présence.

Le protocole de réalisation du western blot est le suivant :

- i. Rinçage de la membrane de transfert 5 minutes dans H<sub>2</sub>O Δ puis 5 minutes dans PBS 1 X.
- ii. La membrane est ensuite bloquée dans une solution : 10 % lait ; 0,3 % Tween 20 ; 0,02 % azide de sodium ; qsp PBS 1X.

- iii. La membrane est ensuite incubée sous agitation 30 minutes dans une solution d'anticorps primaire (10 % sérum de veau foetal ; 0,2 % Tween 20 ; 0,02 % azide de sodium ; qsp PBS 1X). L'anticorps primaire est dilué dans cette solution au 1/300<sup>ème</sup> dans le cas d'expériences concernant la topoisomérase II et au 1/1000<sup>ème</sup> pour l'anticorps anti-XCAP-E. Ces deux anticorps sont fournis par T. Hirano<sup>3</sup>. L'anticorps contre la topoisomérase II est celui de Hirano et Mitchison, 1993 et celui contre XCAP-E est celui de Hirano et Mitchison, 1994.
- iv. La membrane est ensuite lavée deux fois 5 minutes dans une solution (0,5 M NaCl ; 0,5 % Triton X100 ; qsp PBS 1X) puis rincée 5 minutes dans une autre solution (0,5 M NaCl ; qsp PBS 1X).
- v. La membrane est ensuite incubée 30 minutes dans une solution (1 % lait ; 0,02 % Tween 20 ; qsp PBS 1X) d'anticorps secondaire dilué au 1/5000<sup>ème</sup>.
- vi. La membrane est ensuite lavée (même protocole que précédemment cf. iii).
- vii. La membrane est ensuite imbibée d'un substrat permettant à l'anticorps de devenir luminescent. La visualisation du western blot se fait ensuite par apposition d'un film photographique sur la membrane puis d'une révélation de ce dernier.

## **9. Immunofluorescence sur chromosomes**

L'immunofluorescence est une technique qui permet la visualisation d'une protéine présente sur un objet fixé et ce par le même principe que celui du western blot : la reconnaissance anticorps/antigène.

### *Protocole de préparation des lames de chromosomes*

- i. Des « aliquots » de solution de chromosome sont déposés dans une solution de fixation (3 % PFA<sub>final</sub> ; qsp PBS 1X) à 4 °C pendant 15 minutes. Cette étape permet de figer la structure du chromosome.

---

<sup>3</sup> Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, USA.

- ii. Le mélange est ensuite déposé sur des lames fonctionnalisées par du *Vectabond™* (*Vector Laboratories*) selon le protocole fourni par le fabricant de ce produit. A l'aide de ce produit, les lames de verre acquièrent une très grande affinité pour l'ADN. Le mélange est déposé une heure à 4°C afin de laisser les chromosomes sédimenter et se fixer sur les lames.
- iii. L'ensemble lame + chromosomes est ensuite plongé dans une solution de fixation (4 % PFA ; qsp PBS 1X) à 4 °C pendant 15 minutes.
- iv. Le tout est ensuite rincé deux fois 5 minutes dans du PBS 1X à 4 °C.
- v. L'anticorps primaire est ensuite dilué (au 1/200<sup>ème</sup> pour la topoisomérase II et au 1/300<sup>ème</sup> pour XCAP-C) dans une solution (5 % sérum d'agneau (*sérum d'agneau, Invitrogen™, # 16070-096*); 0,1 % Triton X100 ; 0,5 % SAB ; qsp PBS 1X). La solution d'anticorps est ensuite déposée une heure à 37 °C sur les lames de manière à recouvrir complètement le précédent dépôt de chromosomes (cf. ii).
- vi. Les lames sont ensuite rincées trois fois 10 minutes à 4 °C dans une solution de même composition que celle qui sert à diluer l'anticorps (cf. v ).
- vii. L'anticorps secondaire est ensuite dilué au 1/300<sup>ème</sup> dans la même solution qu'auparavant (cf. v) et déposé sur les lames 45 minutes à 37 °C. Cet anticorps secondaire est couplé à de la fluorescéine.
- viii. Une étape de lavage identique au iv ci-dessus est ensuite réalisée.
- ix. Une solution contenant un fluorochrome (Hoechst 33258,  $5.10^{-5}$  M) spécifique de l'ADN dilué dans une solution (200 mM sucrose ; 7,4 % formaldéhyde ; 10 mM Hepes pH 7,5 ; qsp H<sub>2</sub>O Δ ) permettant de diminuer le photoblanchiment du fluorochrome est ensuite déposée sur les lames. Le Hoechst 33258 est excité à une longueur d'onde de 345 nm (UV) et il fluoresce à 450 nm.

### ***Observation sous microscope et prise d'image***

Les chromosomes fixés sur les lames et marqués conjointement par le Hoechst et la fluorescéine sont observés à l'aide d'un microscope à épifluorescence (*Zeiss, Axiophot*). Ce microscope est équipé d'une caméra CCD refroidie (- 40 °C). Cette dernière est pilotée par le logiciel *Argus 50 (Hamamatsu Photonics)*. La source lumineuse est une lampe à vapeur de mercure *HBO 100W*.

L'objectif utilisé est un objectif à immersion à huile de grossissement 63 X (NA = 1,25) mis en série avec une lentille intermédiaire (optovar) de grossissement 1,25 X. Les images acquises sont ensuite transférées sur ordinateur afin d'y être traitées et analysées à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image (*CytoFISH*) développé par Y. Usson<sup>4</sup>.

Selon le fluorochrome, Hoechst ou fluorescéine, des filtres d'excitation et d'émission sont ajoutés sur le montage.

### ***Traitement d'image***

Dans notre cas, le but de ces expériences d'immunofluorescence est de voir correctement la présence et l'emplacement sur le chromosome de certaines protéines (au cas où la localisation de ces dernières serait globalement affectée). Comme il est difficile de voir ceci sur une image native (*i.e.* sans traitement préalable), il est donc nécessaire d'effectuer un traitement d'image afin de pouvoir obtenir de manière satisfaisante ces informations.

Evidemment, lors d'un traitement d'image, une place est laissée au libre jugement de l'opérateur qui effectue le traitement. Afin de refléter au mieux la réalité, nous avons appliqué toujours le même protocole de traitement en nous attachant très fortement à ce que le résultat reproduise le plus fidèlement possible la 'réalité vue sous le microscope'.

Ce traitement d'image effectué à l'aide du logiciel *CytoFish* se déroule en trois parties successives décrites ci-dessous.

---

<sup>4</sup> Institut Albert Bonniot, La Tronche, France.

i. La suppression du bruit de fond

L'imagerie en fluorescence a pour inconvénient de présenter un rapport signal sur bruit faible. La majorité des fluorochromes habituellement utilisés en biologie présentent un faible rendement quantique. De plus, des sources d'artefacts comme le bruit de fond de l'électronique d'acquisition ou l'autofluorescence faible de certaines protéines se rajoutent et rendent nécessaire ce traitement. Ce processus de filtrage logiciel a donc été utilisé pour éliminer au mieux ces différents bruits de fond.

ii. La correction de dynamique

Les images obtenues par une caméra CCD telle que celle que nous utilisons sont codées sur 8 bits ( $2^8$  niveaux de gris), la valeur du niveau de gris étant d'autant plus haute que la luminosité de l'objet est grande. Les 256 niveaux de gris que possède ce type d'image permettent un certain étalement de la dynamique. Or, l'élimination du bruit de fond ou un faible étalement de la dynamique initiale de l'image ne permet pas de profiter pleinement de cette gamme. Une correction logicielle de ce phénomène permet donc d'améliorer grandement le contraste.

iii. Le déflouage des images

En optique, l'image d'un objet ponctuel apparaît comme une tache plus floue (taches d'Airy) en raison du phénomène de diffraction de la lumière. Une technique de traitement d'image, relativement souvent utilisée en microscopie, permet de réduire ces effets de diffraction : la déconvolution.

Cette étape permet de nettement augmenter la lisibilité de l'image, mais il est nécessaire de l'utiliser avec beaucoup de précautions car le risque de création d'artefacts est relativement grand.

Dans notre cas, nous utilisons les réglages du logiciel *CytoFish* suivant pour la phase de déconvolution des images :

- Algorithme : Meinel.
- $\sigma = 1,412$ .
- Nombre d'itérations = 7.

## **10. L'expérience d'étirement**

La technique d'étirement de chromosome est vraiment au cœur de ce travail. Quoique le principe de cette expérience soit relativement simple à comprendre (*i.e.* étirer un chromosome et mesurer la force nécessaire pour l'allonger), sa réalisation est beaucoup plus compliquée. Au cours de ce chapitre, je vais essayer d'être le plus exhaustif possible car un détail minime non respecté peut entraîner l'échec de l'expérience.

### **a. Généralités sur le montage expérimental**

Le montage est sensiblement le même que dans Houchmandzadeh et Dimitrov, 1999. Brièvement, sous un microscope inversé (*Olympus IX70*) est disposé sur une platine (*860-C2, NEWPORT*) un réservoir contenant une solution aqueuse dans laquelle des chromosomes sont en suspension. Deux micromanipulateurs sont disposés de chaque côté du réservoir et sont fixés sur la platine. Ces deux micromanipulateurs portent chacun une micropipette. Chaque micropipette est capable de saisir le chromosome soit en l'aspirant, soit en le « collant » par l'intermédiaire d'anticorps adsorbés à sa surface.

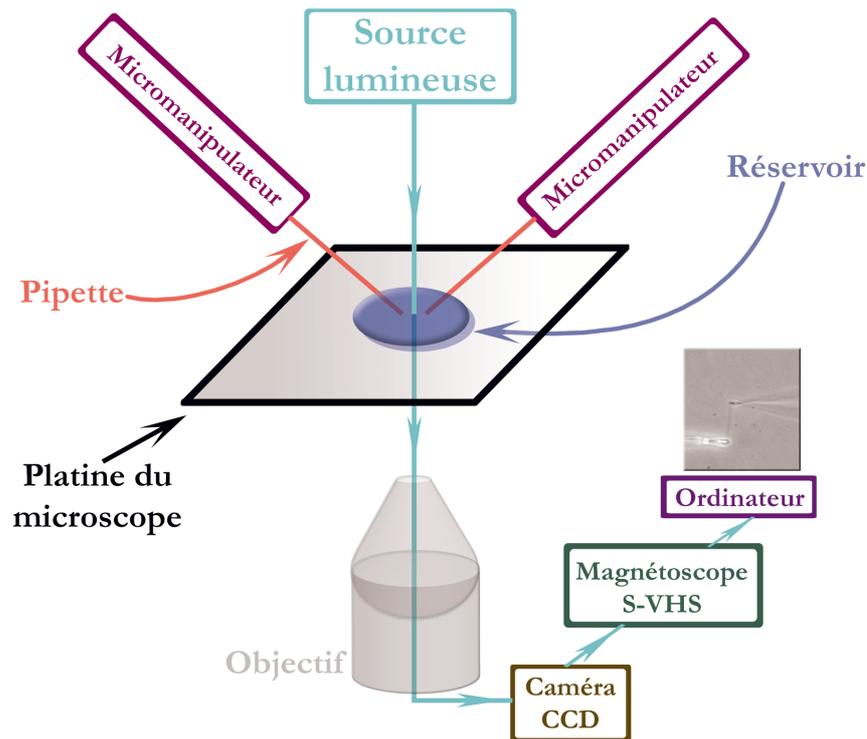
Dans le cas de l'aspiration, un dispositif de surpression (*IM-300, Narishige ; gaz vecteur : azote U*) et de dépression (pousse seringue de fabrication maison) sont ajoutés au montage. Ces dispositifs de régulation de la pression sont connectés avec l'intérieur de chacune des pipettes.

L'image obtenue par l'optique du microscope est d'abord recueillie par une lentille X1,25 (présente dans le tube latéral de branchement de la caméra) puis est collectée par une caméra CCD (*VHR-2000, Micam, 512 X 512 pixels, 8 bits, non refroidie*) qui achemine l'image jusqu'à un magnétoscope (*AG-TL700, Panasonic, S-VHS*).

Le magnétoscope achemine l'image vidéo provenant de l'expérience en cours ou d'une expérience enregistrée à un micro-ordinateur (*Gateway 2000, Gateway*). Via une carte d'acquisition (*DT-3155, Datatranslation®*) présente dans l'ordinateur et à l'aide d'un logiciel conçu par B. Houchmandzadeh<sup>5</sup>, la vidéo est numérisée. L'exploitation des résultats se fait ensuite informatiquement.

---

<sup>5</sup> Laboratoire de Spectrométrie Physique, Saint-Martin d'Hères, France.



**Figure VI.3 : Schéma général du montage expérimental**

(© Sébastien Almagro, 2003)

Sous un microscope inversé est disposé un réservoir contenant une solution de chromosome. Deux micromanipulateurs tiennent deux micropipettes qui plongent dans ce réservoir. Ces deux micropipettes permettent d'attraper le chromosome par ses deux bouts. L'expérience est filmée par l'intermédiaire d'une caméra CCD. Le film de l'expérience est enregistré sur un magnétoscope S-VHS. Le traitement des résultats (images) de l'expérience est réalisé sur un ordinateur équipé d'une carte de numérisation vidéo.

L'ensemble du montage, hormis la partie informatique et stockage de l'image, est isolé des vibrations par une table antivibratoire (*TLC, Integrated Dynamics Engineering*).

## **b. Isolation vibratoire du montage**

Comme cela va être montré plus loin dans cette thèse, nous avons décidé d'étudier l'élasticité des chromosomes avec la meilleure résolution possible (et en concordance avec nos moyens !). Ce choix est lourd de conséquences concernant la manière dont doit être disposé le montage expérimental. Pour bien se rendre compte de la sensibilité de notre expérience, si nous utilisons une pipette de constante de ressort égale à  $50 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ , une valeur assez courante dans nos expériences, une force égale à 50 pN la défléchira de 1  $\mu\text{m}$ . 50 pN représente la force exercée par la terre sur une goutte d'eau de  $5 \cdot 10^{-3} \mu\text{l}$  ( $5 \cdot 10^{-9}$  litre) !

Il est donc nécessaire d'isoler au maximum le montage des diverses vibrations présentes dans le bâtiment. Dans ce dessein, l'ensemble du montage est installé sur une table antivibratoire. Ce type de table est posé sur quatre vérins à air comprimé. La pression dans chaque vérin est la plus petite possible afin de transmettre un minimum les vibrations au montage, mais est suffisante pour assurer la suspension de la table d'un demi-centimètre environ. De plus, tous les divers câbles électriques ou autres tuyaux reliant le montage à l'extérieur de la table sont soigneusement fixés.

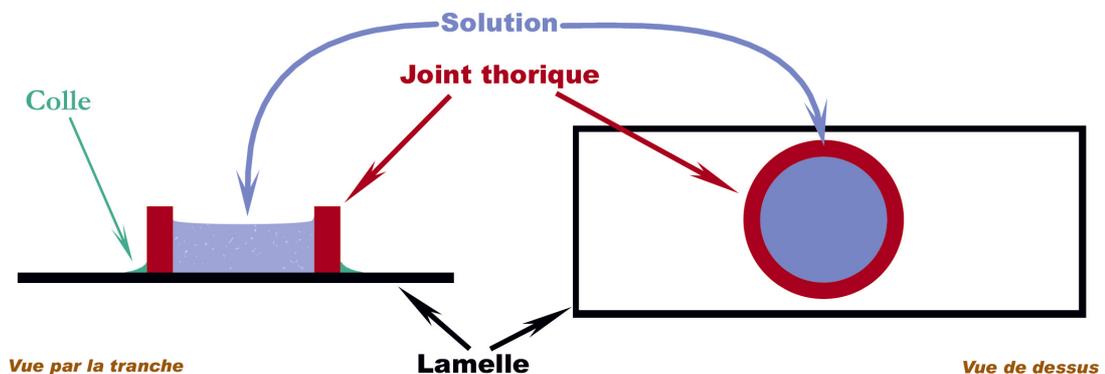
## **c. Réservoir qui accueille la solution de chromosomes**

Un moyen d'obtenir des chromosomes facilement accessibles est de les incuber dans un réservoir. La solution qui permet l'assemblage des chromosomes et qui les contient pouvant être diluée par du tampon (Houchmandzadeh et Dimitrov, 1999), nous déposons les chromosomes dans un réservoir.

Ce réservoir (cf. Figure VI.4) est construit à partir d'un joint torique ( $\varnothing_{int} = 13 \text{ mm}$ ,  $\varnothing_{ext} = 19 \text{ mm}$ ) collé (*colle Dow Corning® 732*) sur une lamelle de verre ( $50 \text{ mm} \times 26 \text{ mm} \times 170 \mu\text{m}$ ). Afin que le joint soit bien collé à la lamelle, une presse d'environ 500 g comprime le joint sur la lamelle pendant le séchage de la colle. A noter que les vapeurs de cette colle peuvent détruire les chromosomes. Il est donc impératif d'attendre que le solvant de la colle soit complètement évaporé, soit environ une à deux heures d'attente avant de déposer la solution de chromosomes dans le réservoir.

Les chromosomes sont déposés dans le réservoir selon le protocole suivant :

- i. 3,8  $\mu\text{l}$  de Hoechst 33258 à  $5 \cdot 10^{-5}$  M dans du tampon EB sont déposés dans le réservoir. A noter que lors de l'expérience d'étirement de chromosomes, *jamais* du fixateur n'est ajouté au fluorochrome.
- ii. 5  $\mu\text{l}$  de solution de chromosomes sont ajoutés au Hoechst. Le mélange chromosomes/Hoechst 33258 est laissé 5 à 7 minutes seul afin que le Hoechst marque correctement les chromosomes.
- iii. 300  $\mu\text{l}$  de tampon est ajouté au mélange. La composition du tampon peut varier : EB, EB sans  $\text{Mg}^{++}$  ou EB sans  $\text{Mg}^{++}$  à 150 mM NaCl. Si le tampon contient du NaCl, un temps d'attente de 30 minutes entre l'ajout du tampon et l'étirement est respecté. Au cours de ce temps, la topoisomérase II (entre autres) est enlevée du chromosome. De manière générale, il est nécessaire d'attendre un peu que les chromosomes sédimentent dans le réservoir car cela facilite ensuite leur localisation et leur saisie (cf. chapitre « Attraper un chromosome à l'aide d'une micropipette »).



**Figure VI.4 : Réservoir qui contient la solution de chromosomes**

(© Sébastien Almagro, 2003)

La figure de gauche est une vue par la tranche du réservoir et la droite une vue de dessus. Un joint thorique est collé à la surface d'une lamelle. Ce montage permet de créer un réservoir capable d'accueillir la solution de chromosomes.

#### **d. Les micropipettes**

Les micropipettes, c'est-à-dire des capillaires dont le diamètre à l'extrémité a été rendu très petit, jouent un rôle central dans l'expérience d'étirement de chromosomes. Elles vont non seulement permettre d'attraper le chromosome mais aussi de mesurer la force nécessaire pour l'étirer. J'emploierai au cours de ce texte de manière indifférente les termes de pipette et micropipette.

##### *Mesurer une force à l'aide d'une micropipette*

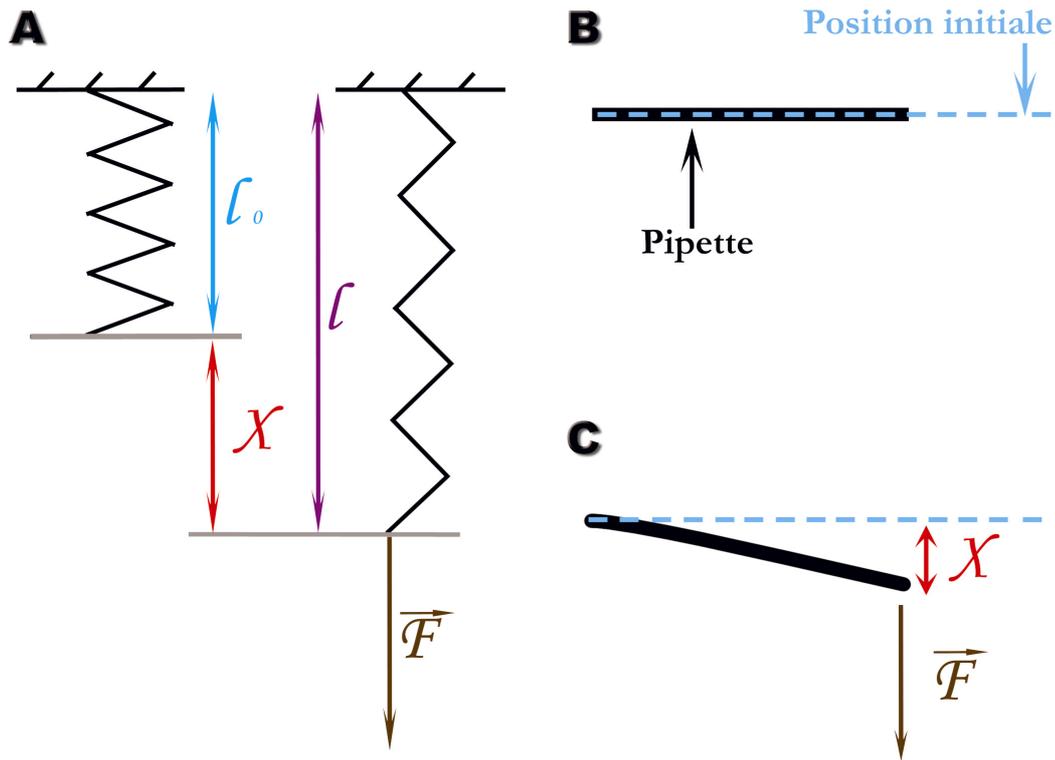
Une pipette peut être considérée comme un ressort. Si une force est appliquée sur celle-ci, elle est capable de se défléchir. Tout comme un ressort, son allongement est régi par la relation suivante :

$$F = \mathcal{K} \cdot \mathcal{X}$$

##### **Équation VI.1 : Loi de Hooke**

où  $F$  est la force appliquée au ressort (en N),  $\mathcal{K}$  sa constante de ressort (en  $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ ) et  $\mathcal{X}$  l'allongement (en m). Cette loi dans le cas du ressort est illustrée dans la Figure VI.5 A.

Une pipette peut être considérée comme un ressort. Si une force est appliquée à sa pointe alors que son autre extrémité est fixée au micromanipulateur, la pipette se défléchit. Cette déflexion suit la loi de Hooke. Plus la force est grande et moins la constante de ressort de la pipette est importante, plus la pipette est défléchie (cf. Figure VI.5 B et C). Dans le cas de l'étirement de chromosome, les ordres de grandeurs les plus appropriés sont d'environ 100 pN ( $10^{-10}$  N) pour la force, le  $\mu\text{m}$  pour l'allongement et le  $\text{pN}\cdot\mu\text{m}^{-1}$  pour la constante de ressort. Par exemple, si une pipette a une constante de ressort de  $50 \text{ pN}\cdot\mu\text{m}^{-1}$  et qu'une force de 50 pN est exercée sur elle, sa déflexion sera de 1  $\mu\text{m}$ .



**Figure VI.5 : Illustration de la loi de Hooke dans le cas d'un ressort et d'une pipette**

**A)** (Adaptée de <http://www.web-sciences.com/fiches1s/fiche15/fiche15.htm>) Sur un ressort de longueur  $l_0$  au repos (à gauche), une force  $F$  est appliquée. Le ressort s'allonge et présente ainsi une longueur  $l$ . Son allongement est égal à  $X (=l-l_0)$ . **B)** (© Sébastien Almagro, 2003) Sur une pipette dont la position initiale est marquée par des pointillés, une force  $F$  est appliquée. **C)** (© Sébastien Almagro, 2003) La force défléchit la pipette de sa position initiale d'une longueur  $X$ .

### **Mesurer la constante de ressort d'une pipette**

Une méthode simple pour mesurer la constante de ressort d'une pipette est de lui appliquer une force *connue* à son extrémité et de mesurer sa déflexion. D'après la loi de Hooke, nous pouvons retrouver sa constante de ressort. Mais dans le cas d'une pipette avec  $\mathcal{K} = 100 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ , la question est : « Comment appliquer de si faibles forces dont nous connaissons la valeur ? ». Il existe de nombreux moyens pour appliquer de manière précise ce genre de force. Par exemple appliquer un flux, utiliser des pinces optiques, mesurer les oscillations à température ambiante de l'objet, etc. Mais ces méthodes précédemment nommées sont trop approximatives car difficiles à mettre en œuvre.

Mais la loi de Hooke montre que si deux pipettes de constantes de ressort  $\mathcal{K}_1$  et  $\mathcal{K}_2$  sont pressées l'une sur l'autre, elle se défléchiront respectivement de  $X_1$  et  $X_2$ . Nous obtenons donc l'égalité suivante :

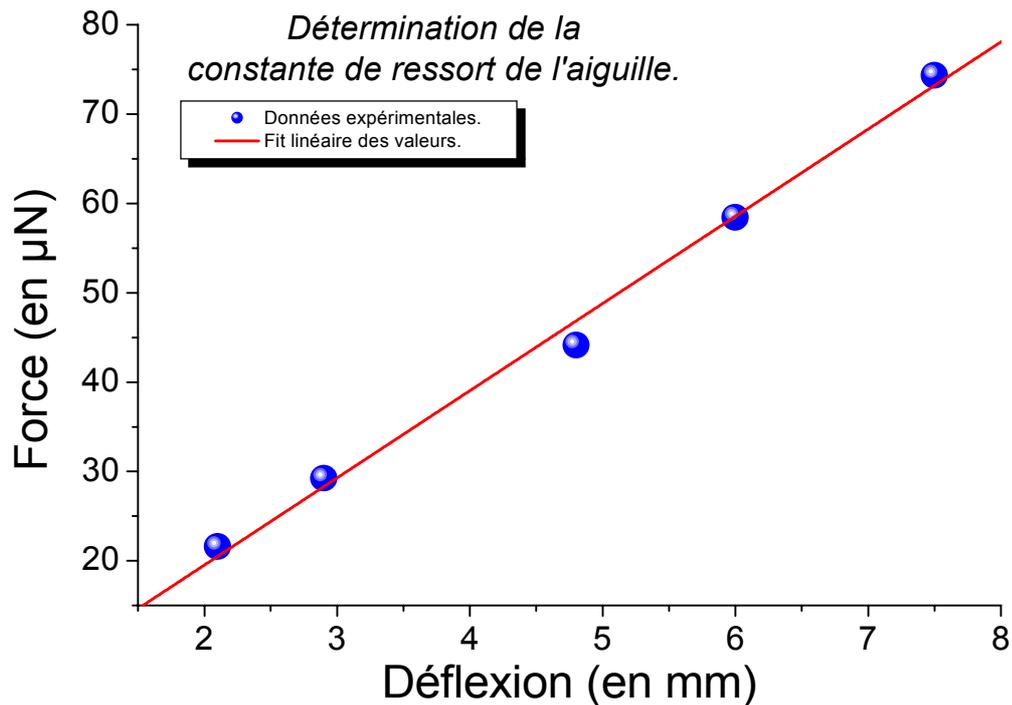
$$\mathcal{K}_1 \cdot X_1 = \mathcal{K}_2 \cdot X_2$$

Avec  $\mathcal{K}_1$  connue,  $X_1$  et  $X_2$  mesurées, nous obtenons  $\mathcal{K}_2$ .

A noter que  $\mathcal{K}_1$  et  $\mathcal{K}_2$  ne sont pas forcément égales. Si nous choisissons un objet de constante de ressort  $\mathcal{K}_1$  suffisamment grande nous pourrions utiliser la méthode de mesure de la constante de ressort utilisant la force de gravité. C'est la méthode que nous employons.

Techniquement, nous mesurons d'abord la constante de ressort d'une aiguille (*MicroFil™ MF34G, World Precision Instruments, Inc*), aiguille qui nous sert d'ailleurs à remplir de liquide les pipettes). De manière générale, l'aiguille a une constante de ressort de l'ordre de  $10 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$  ce qui est environ deux ordres de grandeurs au-dessus de la valeur de la constante de ressort moyenne d'une pipette utilisée pour l'étirement.

Des masses (= morceaux de fils de cuivre sectionnés) de quelques mg sont d'abord pesées sur une balance de précision. Une fois ces masses connues, elles sont disposées manuellement sous binoculaire à l'extrémité de l'aiguille. Un dispositif comportant un miroir et une règle nous permet de connaître la déflexion de l'aiguille sous la masse. Nous déduisons la constante de ressort du graphique suivant :



**Figure VI.6 : Graphique permettant la détermination de la constante de ressort de l'aiguille**

(© Sébastien Almagro, 2003)

Des masses sont déposées au bout de l'aiguille et la déflexion est mesurée (points bleus). Par la relation  $\mathcal{P} = mg$ , nous déduisons la force exercée sur l'aiguille. Ces résultats sont modélisés (droite rouge) par une droite de la forme  $\mathcal{Y} = a\mathcal{X}$ . La pente  $a$  de cette droite est la constante de ressort. Dans ce cas-ci, elle est de  $9,76 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ .

Mais si nous faisons presser une aiguille d'environ  $10 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$  directement contre une pipette de  $100 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ , la déflexion observée sous microscope de la pipette serait par exemple de  $100 \mu\text{m}$  alors que celle de l'aiguille serait 100 fois plus petite, c'est-à-dire  $1 \mu\text{m}$ . L'incertitude sur les mesures serait alors trop grande.

Afin de réduire l'incertitude sur la mesure, nous utilisons une autre pipette nommée « pipette intermédiaire de calibration » dont nous nous arrangeons pour qu'elle ait une constante de ressort environ 10 fois plus petite que l'aiguille ( $\sim 1 \text{ nN}$ ), et donc environ 10 fois plus grande que celle de la pipette d'intérêt (*i.e.* la pipette qui a servi à l'étirement du chromosome).

Le rapport des déflexions de l'aiguille et de la pipette intermédiaire de calibration étant de 1 pour 10, l'erreur de mesure est beaucoup plus faible. Idem pour le rapport des déflexions de la pipette intermédiaire de calibration et de la pipette d'intérêt.

#### *Linéarité de la mesure de force par une pipette*

Nous avons vérifié que dans le cas de mesure de force avec nos pipettes, nous avons la relation de Hooke quelle que soit la déflexion mesurable de cette aiguille (graphique identique à la Figure VI.6) ou de cette pipette.

#### *Note sur certains problèmes pouvant arriver lors d'une calibration de pipette*

Les pipettes, lorsqu'elles sont très souples ( $\mathcal{K} \leq 20 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ ), peuvent être sensibles aux répulsions électrostatiques. En effet, nous avons observé que dans certains cas nous ne pouvions pas approcher la pipette de calibration de ce type de pipette. Afin d'éviter ce genre d'effet pouvant empêcher ou fausser la mesure, les mesures sont effectuées dans le même tampon que celui où est fait l'expérience d'étirement. Ce type de tampon est relativement riche en ions d'où un écrantage efficace des forces de répulsions/attractions.

A noter que pour mesurer les constantes de ressort de pipettes très souples il est nécessaire d'utiliser deux pipettes de calibration intermédiaire : une avec  $\mathcal{K} \sim 1 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$  et une autre avec  $\mathcal{K} \sim 100 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$  afin que l'écart entre la pipette d'intérêt et la pipette de calibration intermédiaire ne soit pas trop grand pour les raisons énoncées auparavant.

En attendant le moment (24 heures au plus après l'étirement) où les pipettes vont être calibrées, ces dernières sont stockées à l'abri de la poussière, des courants d'air et de la chaleur. Les pipettes les plus souples peuvent se déformer semble-t-il sous la chaleur dégagée par une lampe néon placée à 30 cm. Nous observons ce phénomène mais nous ne sommes pas en mesure de l'expliquer. Il est évitable en éloignant la pipette de ladite lampe.

### *Mesurer la position d'une pipette et son déplacement à partir d'une séquence d'images*

#### *Calibration de la taille absolue du pixel*

Afin d'obtenir la correspondance « pixel de l'image/distance réelle » nous déposons une mire laser sous le microscope. Nous faisons une acquisition de l'image de cette mire grâce à la caméra CCD et nous mesurons la correspondance entre le nombre de pixels et la distance entre une ou plusieurs graduations (chacune est espacée de  $10 \mu\text{m}$ ). Pour faire une mesure correcte, nous avons pris certaines précautions :

- Pour chaque objectif. Une image prise par un objectif X 20 ne donnera pas forcément deux fois moins de pixels par microns qu'un objectif X 40. Cela est entre autres dû à la forme des pixels de la caméra.
- Certains objectifs possèdent une bague qui permet de corriger l'épaisseur de la lamelle. Ce type d'objectif est vraiment difficile à utiliser dans notre cas car une faible rotation de cette bague change de manière importante la dimension du pixel. Nous n'avons donc pas utilisé ce type d'objectif.

- La mesure de la taille du pixel doit être faite verticalement et horizontalement car la matrice CCD ne donne pas forcément des pixels carrés. Il est donc nécessaire de prendre des images de la lame déposée dans une direction sous le microscope et en reprendre avec la lame déposée avec une rotation de 90° par rapport à la précédente direction.

Nous avons calibré les divers objectifs qui ont permis nos expériences, voici les valeurs obtenues pour chacun :

- *Olympus UPLAN FI - X100 (NA=1,3 ; huile ; phase 3)* :  $0,110 \mu\text{m} \cdot \text{pixel}^{-1}_{x,y}$ .
- *Olympus PlanApo - x60 (NA=1,45 ; huile ; phase 3)* :  $0,183 \mu\text{m} \cdot \text{pixel}^{-1}_{x,y}$ .
- *Olympus LCplan FI - X 40 (NA=0,60 ; phase 2 ; air) + lentille additionnelle (X1,5)* :  $0,183 \mu\text{m} \cdot \text{pixel}^{-1}_{x,y}$ . *Ceci est le montage optique de toutes nos expériences d'étirement.*
- *Olympus LCplan FI - X 40 (NA= 0,60 ; phase 2 ; air)* :  $0,276 \mu\text{m} \cdot \text{pixel}^{-1}_{x,y}$ .
- *Olympus LCPlanFI - X 20 (NA=0,40 ; air ; phase 1)* :  $0,55 \mu\text{m} \cdot \text{pixel}^{-1}_{x,y}$ .

Comme les résultats des calibrations le montrent, notre caméra CCD nous délivre des pixels effectivement carrés. Nous sommes obligés d'utiliser un objectif à grande distance de travail sinon nous serions obligés d'approcher les pipettes du fond du réservoir, ce qui risquerait de provoquer le frottement d'une pipette sur le fond, faussant ainsi la mesure.

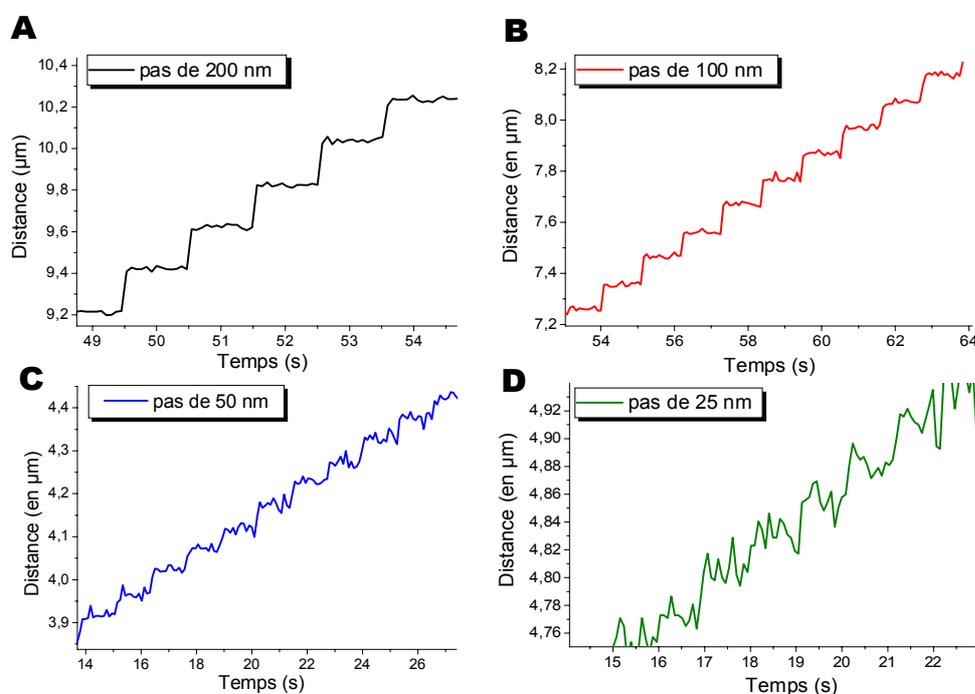
#### *Mesurer le déplacement des pipettes au cours d'un étirement*

Au cours d'un étirement, les deux pipettes permettant l'étirement restent dans le champ de la caméra. Les deux pipettes ne sont pas l'une au-dessus de l'autre mais face à face. Il serait évidemment possible de mesurer manuellement la position de chacune des pipettes, mais ce type de mesure est entaché d'erreurs dues à l'opérateur et d'une précision limitée au pixel (soit  $0,183 \mu\text{m}$ ).

Dans le but de mesurer la position des pipettes dans l'image nous utilisons un programme de corrélation d'image à 2 dimensions développé au laboratoire par le B. Houchmandzadeh<sup>6</sup>. Le programme calcule de combien de pixels il faut déplacer une zone de référence pour que la corrélation, entre cette image de référence et l'image actuelle, soit la plus grande. La mesure du déplacement de la pipette se fait donc théoriquement à une résolution *sub-pixel*.

### Mesure de la précision de mesure du programme

Afin de vérifier quelle est la précision de détection que nous avons grâce à ce programme de corrélation d'image, nous déposons une lamelle portant l'extrémité d'une pipette sur une platine de translation piézoélectrique (*platine : NPS-XY-100A, contrôleur : NPS3220, NanoPositioning - Queensgate instruments*). La précision de mouvement de cette table est de 2 nm. Dans cette expérience (cf. Figure VI.7), nous faisons bouger la pipette par sauts de tailles parfaitement connues (25, 50, 100 et 200 nm) chaque seconde. L'expérience est filmée et les images sont ensuite exploitées par le logiciel d'analyse par corrélation d'image.



<sup>6</sup> Laboratoire de Spectrométrie Physique, Saint-Martin d'Hères, France.

### **Figure VI.7 : Détermination de la précision de détection de mouvements de la pipette**

(© Sébastien Almagro, 2003)

Dans cette expérience nous déposons une lame de verre portant un type de pipette typiquement utilisé pour nos expériences. La lame de verre est mue par une table piézoélectrique d'une précision de mouvement de 2 nm. Les mouvements de la pipette sont filmés puis analysés par le programme de détection de mouvement par corrélation d'image. A), B), C) et D) la pipette est déplacée respectivement par pas de 200, 100, 50 et 25 nm toutes les secondes. Le programme détecte parfaitement les pas de 200 et 100 nm. Les pas de 50 nm restent individualisables. Les pas de 25 nm ne peuvent pas être discernés.

Cette expérience nous montre que la précision de la mesure de déplacement d'une pipette par le programme de corrélation d'image à 2 dimensions est de 50 nm, soit environ  $\frac{1}{4}$  de pixel. A noter qu'une telle résolution peut s'avérer nécessaire lors de l'emploi de pipettes relativement rigides, car elle se défléchissent peu au cours de l'étirement du fait de leur constante de ressort.

#### ***Lavage des capillaires***

Le lavage des capillaires (*GC100-T10 ; Harvard Apparatus Ltd ;  $\varnothing_{int}= 0,78 \text{ mm}$  ;  $\varnothing_{ext}= 1 \text{ mm}$* ) est une étape extrêmement importante, quelle que soit la manière dont va ensuite être attrapé le chromosome. Ce lavage permet non seulement d'enlever les poussières et les corps gras du verre, mais aussi de le rendre plus hydrophile. Au cours de ce nettoyage, l'opérateur doit éviter au maximum tout contact des capillaires avec les poussières extérieures. Les capillaires doivent être « cachés » de l'extérieur le plus possible quelles que soient les étapes. Le protocole de nettoyage suivant doit être suivi *à la lettre* :

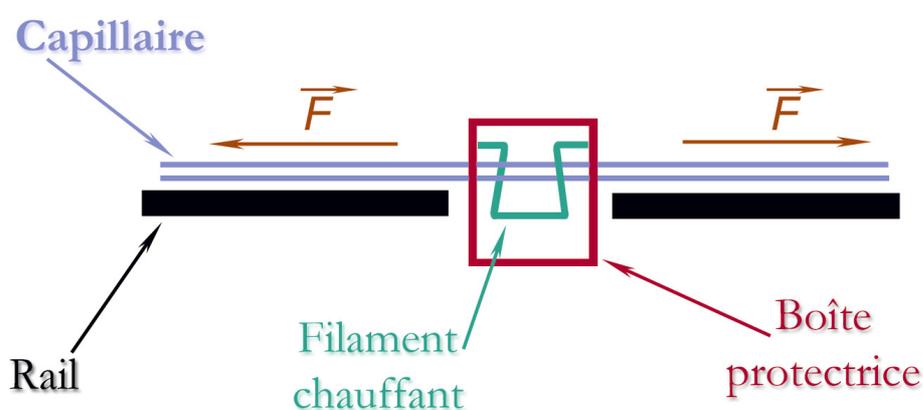
- i. Les capillaires sont incubés 45 minutes dans une solution de détergent (4 % *Hellmanex II (Helma)* qsp H<sub>2</sub>O Δ) à environ 60 °C puis laissés 15 minutes à température ambiante. Le mélange capillaires/détergent, avant chauffage, aura été préalablement mélangé par des secousses énergiques du récipient qui les contient.
- ii. Les capillaires sont ensuite rincés énergiquement avec un volume de H<sub>2</sub>O Δ.
- iii. Un deuxième rinçage (ou plutôt une série de rinçages) énergique lui aussi est effectué. L'eau utilisée est de l'eau déminéralisée (12 MΩ, non filtrée). Les capillaires sont rincés environ 10 à 15 fois.
- iv. Un troisième rinçage identique au ii est ensuite effectué.
- v. Pour l'instant, c'est le capillaire dans son ensemble qui est rincé. L'étape suivante est de rincer individuellement l'intérieur de chaque capillaire avec H<sub>2</sub>O Δ car ces derniers ont un diamètre intérieur relativement fin et sont peu rincés à l'intérieur au cours des précédentes étapes de lavage. Pour ce faire, l'intérieur du capillaire est rincé à l'aide d'une seringue équipée d'une aiguille fine par au moins trois volumes de H<sub>2</sub>O Δ.
- vi. Les capillaires sont ensuite séchés 45 minutes au moins dans une étuve sèche à 120°C puis ramenés à température ambiante.

Il faut noter que toutes les tentatives « d'accélération » de ce protocole se sont soldées par un échec de l'expérience. Par contre, le nombre de rinçages peut être augmenté, les temps de lavage et de séchage aussi. Le protocole décrit précédemment représente simplement le minimum nécessaire.

### *Fabrication des micropipettes*

Le capillaire de verre, une fois lavé, est prêt à devenir une micropipette. Pour cela, nous utilisons une étireuse de pipette (*P-97, Sutter Instrument Company*). Le principe de fonctionnement (illustré dans la Figure VI.8) est relativement simple à comprendre.

Un capillaire de verre est fixé sur deux rails indépendants l'un de l'autre. Ces deux rails sont capables de s'éloigner l'un de l'autre avec une force  $F$ . Lorsque le filament (*FT320B, Sutter Instrument Company*) commence à chauffer, un système d'injection d'air desséché va dissiper la chaleur du filament afin de la rendre homogène. Au cours de cet échauffement, une force  $F_1$  faible est appliquée au capillaire. Quand le verre du capillaire commence à suffisamment se ramollir,  $F_1$  est suffisamment importante pour que les deux rails s'éloignent l'un de l'autre. Lorsque la vitesse d'éloignement atteint une certaine valeur (fixée par l'opérateur), une force  $F_2$  (avec  $F_2 \gg F_1$ ) est appliquée et casse le capillaire en deux micropipettes.



**Figure VI.8 : Principe de fabrication des pipettes**

(© Sébastien Almagro, 2003)

Un capillaire de verre est fixé à deux rails indépendants. Chaque rail exerce une force (relativement faible) dans le sens opposé à celle de l'autre rail et ce, dans le but « d'écarteler » le capillaire. A l'intérieur de la boîte protectrice, un filament métallique est parcouru par un courant électrique ce qui entraîne son échauffement et donc la fonte du capillaire. En même temps que la résistance du capillaire diminue, les deux rails tirent sur le capillaire devenu malléable ce qui entraîne son allongement et son affinement. Ceci continue jusqu'à cassure du capillaire en deux parties : les deux pipettes.

Néanmoins, même si le principe est aisé à comprendre, la fabrication dans notre cas des micropipettes est relativement difficile. Quelle que soit la méthode de fixation du chromosome sur la pipette, nous devons avoir une constante de ressort  $\mathcal{K}$  appropriée. Dans le cas où le chromosome est aspiré par la pipette, nous avons aussi besoin que le diamètre de celle-ci soit proche de celui du chromosome et qu'elle soit capable de conduire un flux.

Cela fait beaucoup de contraintes à respecter et la programmation de l'étireuse de pipettes pour obtenir des micropipettes de ce type est très longue. Modifier un des 5 principaux paramètres de l'étireuse de pipettes ne modifie pas de façon simple le produit final. La modification de ces paramètres demande une certaine habitude pour que l'élaboration du programme ne prenne pas des semaines. Sans oublier que des cycles répétitifs d'échauffement du filament entraînent une certaine déformation de ce dernier et une géométrie parfaite de ce dernier est requise pour obtenir des micropipettes reproductibles. Le filament que nous utilisons a la forme d'un trapèze régulier dont la petite base est égale aux  $\frac{2}{3}$  de la grande base. Ce filament étant livré non formé, nous avons fait construire une mini-presse qui nous permet de donner assez précisément cette forme au filament.

Nous utilisons de plus deux sortes de pipettes dans un même étirement :

- Une pipette dite « dure » ( $\mathcal{K} \sim 2-3 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ ). Cette pipette est fixée au micromanipulateur de précision (*MP-285, Sutter Instrument Company*). C'est cette pipette qui va bouger et ainsi contraindre le chromosome. De par sa constante de ressort élevée, elle ne se défléchira quasiment pas au cours de l'étirement.
- Une pipette dite « souple » ( $10 \text{ pN} < \mathcal{K} < 500 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ ). Cette pipette est fixée au micromanipulateur de moindre précision en mouvement (*contrôleur : MS-314, moteurs : DC3 XYZ, World Precision Instrument*). Aucun mouvement de cette pipette n'est donné par l'opérateur au cours de l'étirement. Seule la force appliquée sur le chromosome va défléchir cette pipette (d'autant plus que la pipette est souple).

Cette différence entre les deux pipettes entraîne donc l'élaboration de deux programmes différents de fabrication de pipettes.

Un autre facteur limitant est la longueur de la partie de faible diamètre de la pipette. Plus cette partie est longue, plus les probabilités de la boucher ou d'avoir du mal à la remplir sont grandes. Néanmoins il est nécessaire d'avoir cette partie fine car elle permet d'obtenir facilement un diamètre correct à l'extrémité et une certaine souplesse de la pipette. Il faut donc trouver des paramètres de fabrication qui permettent aussi de réduire ces problèmes-ci.

Voici deux exemples de paramétrages de l'étireuse de pipettes (la calibration interne de l'appareil ou « *ramp test* » est égale à 225 ) :

- Pour une pipette dite dure : Pressure = 500 ; Heat = 205; Pull = 120; Velocity = 90 ; Time = 45.
- Pour une pipette dite souple : Pressure = 500 ; Heat = 215; Pull = 140; Velocity = 150 ; Time = 45.

#### ***Cas des pipettes extrêmement souples ( $\mathcal{K} \leq 20 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ )***

Lorsque des pipettes de faible constante de ressort sont utilisées, le protocole est légèrement modifié. Tout d'abord, ces pipettes très souples ont une partie de faible diamètre relativement longue par rapport aux autres pipettes. Ceci entraîne qu'une proportion importante de la partie souple de la pipette se trouve hors du liquide du réservoir et donc exposée au courant d'air. Il est donc nécessaire dans ce cas-ci de limiter au maximum les mouvements d'air dans la salle (mouvements lents de l'opérateur, housse autour du montage, etc.).

De plus, la partie souple de la pipette se trouve au contact de l'interface air/eau du réservoir. Si la pipette est suffisamment souple, elle est incurvée par la tension superficielle du liquide. Cette courbure de la pipette n'est pas gênante en elle-même, mais l'évaporation au fil du temps du liquide du réservoir modifie cette courbure et donc modifie la position de la pipette (en X, Y et Z). Ce qui est évidemment inacceptable pour effectuer une mesure correcte. Afin de contrecarrer cette évaporation, une mince couche d'huile minérale (*M-3516, Sigma*) est ajoutée à la surface du réservoir. Néanmoins l'utilisation de cette huile minérale introduit un changement supplémentaire d'indice de réfraction dans le trajet optique ce qui diminue la qualité de l'image. L'ajout d'huile minérale à la surface du réservoir est donc purement limité aux expériences nécessitant l'emploi de pipettes très souples.

Dans le cas où des pipettes de constante de ressort vraiment très basse ( $\mathcal{K} \sim 10 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ ) seraient utilisées, un autre problème se rajoute : la tension superficielle joue le rôle d'un mur et la pipette ne peut pas pénétrer le liquide. Pour faire pénétrer la pipette dans le liquide du réservoir il est alors nécessaire de presser la pipette contre la surface du liquide et de faire tomber manuellement à l'aide d'une pipette automatique quelques dizaines de  $\mu\text{l}$  de tampon. La pipette est alors poussée à l'intérieur du réservoir. Mais cette technique a deux problèmes :

- La pipette séjourne un certain temps à la surface du liquide, un endroit où beaucoup de poussières sont présentes, ces dernières ayant une bonne affinité pour les pipettes.
- Une fois la pipette rentrée dans le réservoir, la tension superficielle du liquide joue toujours le rôle d'un mur et la partie de la pipette à l'interface est alors comme prise en étau par ce mur.

Afin de diminuer cette tension superficielle et après avoir vérifié que cela n'affecte pas le chromosome, nous utilisons du tampon de dilution qui contient 0,03 % de Tween 20. Cela est suffisant pour permettre l'expérience. Evidemment, dans le cas de ces pipettes de constante de ressort très basse, de l'huile est ajoutée à la surface du réservoir. A noter que nous avons vérifié que cette concentration en Tween 20 n'affectait pas la réponse élastique des chromosomes.

### *Attraper un chromosome à l'aide d'une micropipette*

Les pipettes que nous utilisons sont des capillaires à paroi fine sans fil d'aide au remplissage car il n'est pas possible de fabriquer des micropipettes capables d'aspirer à partir de ce type de capillaire.

Nous avons développé deux techniques pour attraper un chromosome entre deux micropipettes et l'étirer tout en étant capable de mesurer la force nécessaire pour le faire : l'aspiration et le « collage ».

#### *La technique d'aspiration*

Cette technique consiste à aspirer une petite partie de l'extrémité d'un chromosome à l'intérieur d'une pipette. Afin que le chromosome soit saisi des deux côtés, ce sont ses deux extrémités qui sont aspirées chacune par une pipette différente.

Les chromosomes assemblés *in vitro* de *Xénope* ont une longueur de l'ordre de 10  $\mu\text{m}$  pour un diamètre de l'ordre de 0,8  $\mu\text{m}$ . Il est donc nécessaire, dans le cas de la technique d'aspiration, que les pipettes soient capables de conduire un flux. Ceci permettant de pouvoir aspirer le chromosome. De plus le diamètre intérieur de la pipette doit être de l'ordre de celui du chromosome ( $\sim 1 \mu\text{m}$ ) sinon le chromosome risque d'être aspiré entièrement ( $\emptyset > \mu\text{m}$ ) ou pas du tout ( $\emptyset \ll \mu\text{m}$ ).

Si une pipette vide (remplie seulement d'air à pression atmosphérique) de diamètre adéquat est approchée d'un chromosome en solution, deux choses sont observées :

- Le liquide n'est pas capable de monter par capillarité. Ce phénomène est dû au fait que l'extrémité de la pipette est de l'ordre du  $\mu\text{m}$  et que la courbure du ménisque qui permettrait au liquide de monter est beaucoup trop grande pour que ce phénomène ait lieu.
- Toute particule (telle que les chromosomes) passant au voisinage de l'extrémité de la pipette est complètement aspirée/happée par la pipette. Cela ne permet donc pas de saisir le chromosome

Dans le but de pouvoir aspirer juste une partie de l'extrémité du chromosome, la pipette doit être amorcée, *i.e.* préalablement remplie de liquide. Ce liquide est toujours le même que le tampon dans lequel baignent les chromosomes au cours de l'expérience où est réalisé cet étirement.

Le protocole d'aspiration d'un chromosome est toujours le même. Une fois la pipette fabriquée, elle est remplie de tampon puis fixée sur le micromanipulateur. A l'aide du micromanipulateur la pipette est centrée (sans la plonger) dans l'axe optique du microscope. Une surpression (~ 25 psi) est appliquée à l'intérieur de la pipette. La pipette est ensuite plongée dans le réservoir qui contient la solution de chromosome. La surpression appliquée avant le plongeon de la pipette a notamment pour but d'empêcher que la pipette soit bouchée par les diverses particules (poussières, etc.) présentes à la surface du liquide du réservoir. La même opération est réalisée avec la seconde micropipette. A noter que ces opérations doivent être menées le plus rapidement possible car si une poussière vient à se glisser à l'intérieur de la pipette cette dernière ne conduira plus.

Une fois les pipettes plongées dans le réservoir, nous vérifions qu'elles ne sont pas bouchées. Cela peut se faire assez facilement car la surpression appliquée dans la pipette provoque la sortie d'un flux de tampon qui affecte les trajectoires des particules en suspension dans la solution. Une fois ces opérations réalisées, la surpression est abaissée (~ 8 psi). La pipette doit se trouver la plus éloignée possible du fond du réservoir de chromosomes.

Les chromosomes ont une tendance naturelle (et très pratique) à sédimenter au fond du réservoir, ce qui permet de les trouver rapidement dans un réservoir somme toute assez grand en comparaison de la taille du chromosome. Cette sédimentation est aussi pratique car les chromosomes se trouvent ainsi près du bord et sont donc moins sensibles aux courants présents dans le réservoir. Ces courants semblent avoir plusieurs origines : frottement de l'air contre la surface du liquide du réservoir, convection thermique, etc. Il est donc nécessaire de garder la pipette la plus éloignée possible du fond du réservoir car le flux qu'elle engendre risque d'agiter les chromosomes, les rendant impossibles à attraper. La même opération est effectuée pour la seconde micropipette.

Une fois assurés du bon état des pipettes, nous recherchons un chromosome. Les pipettes sous pression (cf. Figure VI.10-A) sont laissées pour l'instant éloignées du fond du réservoir. La pression appliquée permet d'éviter que les pipettes soient bouchées par diverses particules en suspension dans le réservoir le temps que la recherche du chromosome soit effectuée.

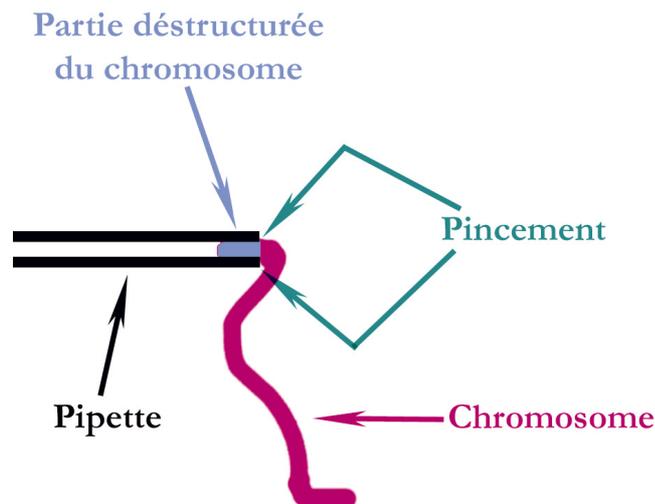
Afin de trouver facilement et de manière sûre un chromosome, la recherche de celui-ci est effectuée en fluorescence (le chromosome étant marqué par du Hoechst 33258). Généralement, la recherche est effectuée préférentiellement au fond du réservoir pour les raisons indiquées auparavant. Le chromosome ayant une certaine affinité pour le verre, une grande partie des chromosomes visibles à cet endroit ont adhéré au verre du fond du réservoir. Afin d'identifier les chromosomes fixés à la lamelle, il est possible de les regarder quelques instants afin de voir si leur position change au cours du temps. Le chromosome fluctuant à température ambiante, s'il ne bouge pas au bout de quelques secondes, c'est qu'il est fixé au verre et donc non étirable.

Une fois un chromosome non fixé repéré, la fluorescence est coupée (passage en mode contraste de phase), la pression appliquée à une des deux pipettes (en général la plus rigide car c'est la plus maniable) est coupée. Le circuit de suppression de cette pipette est ensuite purgé afin de faire redescendre l'intérieur de la pipette à pression atmosphérique. La pipette est descendue au voisinage du chromosome d'intérêt. Les mouvements du micromanipulateur qui tient cette pipette doivent être de la plus faible amplitude possible car des mouvements trop brusques risquent d'agiter le chromosome et de le rendre ainsi inattrapable.

Le circuit de pressurisation de la pipette est ensuite isolé de l'extérieur puis la pipette est ensuite approchée d'une extrémité du chromosome. Une faible dépressurisation de l'intérieur de la pipette est ensuite créée à l'aide du pousse-seringue (cf. Figure VI.10-B) ce qui entraîne l'entrée d'une petite partie de l'extrémité du chromosome dans la pipette (cf. Figure VI.10-C). La dépressurisation est laissée une trentaine de secondes avant que le vide ne soit coupé (retour à la pression atmosphérique).

Au cours de ces quelques secondes, la partie du chromosome se trouvant à l'intérieur de la pipette semble s'être déstructurée ce qui entraîne que des parties internes du chromosome sont à présent au contact du verre. Le chromosome se fixe de manière *irréversible* sur le verre. Nous ne savons pas exactement quelles interactions permettent cette fixation. Une chose est sûre, seule la partie déstructurée du chromosome peut adhérer à nos pipettes. Un chromosome non déstructuré *ne colle pas* sur nos pipettes à moins que ces dernières ne soient *fonctionnalisées*.

Le fait que la partie aspirée par la pipette soit déformée ne gêne en rien la mesure car l'aspiration permet à l'extrémité de la pipette (une partie non déstructurée) d'effectuer un pincement (cf. Figure VI.9). *Du fait de ce pincement, c'est la section entière du chromosome qui est étirée.*

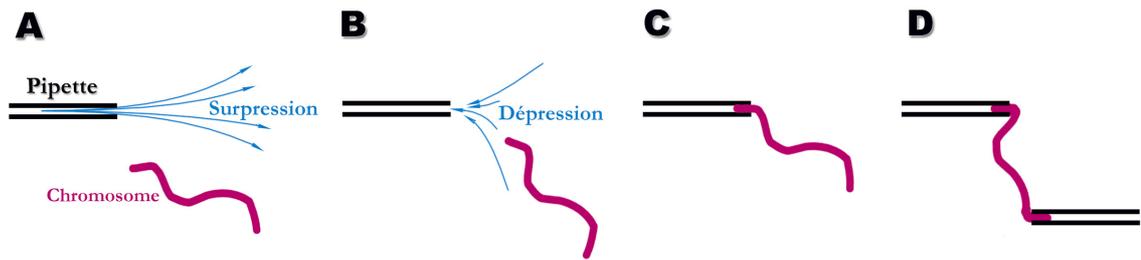


**Figure VI.9 : La technique d'aspiration permet de saisir toute la section du chromosome**

(© Sébastien Almagro, 2003)

Lorsqu'une extrémité du chromosome est aspirée dans une pipette de diamètre proche du sien, la partie à l'intérieur de la pipette se déstructure. Au cours d'un étirement, la partie à l'embouchure de la pipette se retrouve pincée.

Les mêmes étapes sont ensuite répétées avec l'autre pipette et l'autre extrémité du chromosome. Le chromosome est ainsi pris entre deux pipettes (cf. Figure VI.10-D).



**Figure VI.10 : Technique d'aspiration du chromosome**

(© Sébastien Almagro, 2003)

**A)** Une pipette d'un diamètre proche de celui du chromosome est approchée de ce dernier. Cette pipette est remplie d'un tampon identique à celui où baigne le chromosome. Une surpression est appliquée dans la pipette afin d'éviter que des particules ne la bouchent. **B)** La surpression est coupée et une dépression est créée à l'intérieur de la pipette très proche à cet instant d'une extrémité du chromosome. **C)** Le chromosome est attiré en partie à l'intérieur de la pipette. La dépression est coupée après quelques secondes et le chromosome se fixe fortement au verre. **D)** Les mêmes opérations que dans A), B) et C) sont réalisées avec une seconde pipette afin que le chromosome soit attrapé entre deux pipettes.

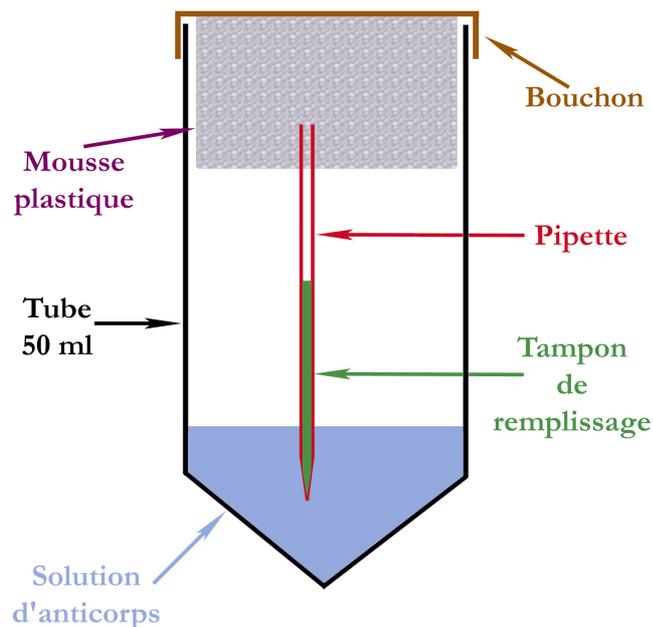
*La technique de « collage » (via une interaction antigène/anticorps).*

La technique de fixation par « collage » du chromosome sur les pipettes est une technique originale que nous avons mise au point au cours de ma thèse. Elle consiste à adsorber des anticorps à la surface de la pipette, ces anticorps étant dirigés contre une protéine présente dans le chromosome. Le lien entre la pipette et le chromosome est ensuite assuré par la liaison antigène/anticorps.

Grossièrement, une seule liaison antigène/anticorps ne peut supporter plus qu'une cinquantaine de pN (évidemment cette force dépend de la manière dont la rupture est atteinte (Evans, 2001a)). Dans notre cas, nous pouvons atteindre des forces de l'ordre du nN. Ce qui laisse envisager qu'environ une vingtaine d'anticorps sont liés au chromosome en même temps.

La première étape pour obtenir des pipettes fonctionnalisées par des anticorps consiste à remplir de tampon la pipette. Il vaut mieux remplir la pipette pour les raisons énoncées dans la rubrique précédente (*la technique d'aspiration, cas d'une pipette vide*). Mais il faut ajouter que la technique de « collage » permet d'éviter l'emploi de pipettes capables de conduire un flux et simplifie ainsi la fabrication des pipettes.

La seconde étape est la fonctionnalisation des pipettes à proprement dit. Comme illustré dans la Figure VI.11, la pipette est enfoncée dans une mousse plastique et sa pointe baigne 24 heures durant dans une solution d'anticorps. Les pipettes étant extrêmement fragiles, il est nécessaire de faire très attention au cours de cette phase. Cette solution est composée de PBS/ $\text{NaN}_3$  0,02 % contenant environ  $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  d'anticorps. Il est important que les pipettes soient lavées en suivant *scrupuleusement* le protocole énoncé auparavant.

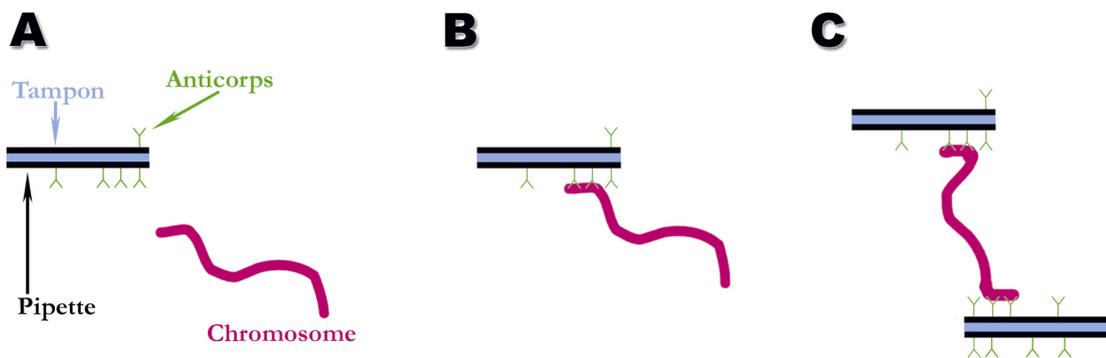


**Figure VI.11 : Fonctionnalisation des pipettes**

(© Sébastien Almagro, 2003)

Dans un tube plastique de 50 ml est déposé 4 ml de solution d'anticorps. A l'intérieur du bouchon du tube est collé un cylindre de mousse plastique. Une (ou plusieurs) pipette remplie du même tampon qui servira à l'expérience d'étirement est enfoncée dans la mousse plastique afin d'être fixée (la pointe vers le bas). Ainsi, la pointe de la pipette baigne dans la solution d'anticorps et des anticorps s'adsorbent à sa surface.

La fixation du chromosome sur la pipette est relativement aisée à comprendre. Il suffit de plonger les deux pipettes dans le réservoir contenant la solution de chromosomes et d'approcher les pipettes du chromosome. Le « collage » se fait par contact de la pipette sur le chromosome (cf. Figure VI.12).



**Figure VI.12 : Technique de « collage » du chromosome**

(© Sébastien Almagro, 2003)

**A)** Une pipette recouverte d'anticorps et remplie d'un tampon identique à celui où baignent les chromosomes, est approchée d'un chromosome. L'anticorps à la surface de la pipette est dirigé contre un des constituants du chromosome. **B)** La pipette est approchée du chromosome jusqu'à contact. Un constituant du chromosome est reconnu par les anticorps et un lien physique est ainsi créé entre le chromosome et la pipette. **C)** Les étapes A et B sont réitérées avec une seconde pipette fonctionnalisée afin que le chromosome soit attrapé entre deux pipettes.

Evidemment, plusieurs paramètres peuvent nuire à une bonne adhérence de la pipette sur le chromosome :

- La force ionique du tampon. Par exemple, lorsque nous ajoutons 150 mM NaCl au tampon EB sans Mg<sup>++</sup> habituel (pour enlever la topoisomérase II), les interactions antigène/anticorps sont plus écrantées. Il en résulte donc une difficulté accrue du collage du chromosome sur la pipette.
- L'affinité de l'anticorps. Plus l'affinité d'un anticorps est grande pour son antigène, plus le collage sera facile.
- Un nettoyage approximatif des pipettes. Un rinçage ou un lavage un peu rapide des pipettes entraîne, semble-t-il, une diminution de la densité surfacique d'anticorps ou entraîne une adsorption de l'anticorps dans une configuration qui le gêne pour établir la liaison antigène/anticorps.

*L'avantage de cette méthode de fixation du chromosome sur la pipette par anticorps est que nous pouvons diriger l'étirement spécifiquement contre l'entité élastique qui contient la protéine choisie.* La spécificité dépend évidemment de la spécificité et de la pureté de l'anticorps.

#### **e. Les micromanipulateurs**

Les micromanipulateurs ont une grande importance. Ils tiennent les deux (ou trois, cf. chapitre VI.11) pipettes. De par le mouvement de l'un des deux micromanipulateurs (*MP-285, Sutter Instrument Company*), nous allons imposer la distance et la vitesse d'étirement. Par l'immobilité de l'autre micromanipulateur (*DC3 XYZ, World Precision Instrument*) nous pouvons mesurer la force nécessaire pour étirer le chromosome. Afin d'avoir une mesure de qualité il est nécessaire de s'assurer de ces différents points :

*Test de vitesse du micromanipulateur permettant d'imposer la distance et la vitesse d'étirement du chromosome*

Le micromanipulateur permettant d'imposer la distance et la vitesse d'étirement possède un pas minimal de 40 nm et il est possible de programmer la vitesse et de la distance directement sur le contrôleur.

Nous avons testé différentes vitesses de déplacement de la pipette dans le but de vérifier si les ordres donnés au contrôleur étaient bien respectés par le micromanipulateur.

*Gamme de vitesse prévue par le constructeur de l'appareil*

Nous observons que pour des vitesses supérieures à  $0,8 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , le micromanipulateur applique bien les ordres que nous lui donnons que ce soit pour la vitesse ou pour la distance à parcourir. Par contre, pour des vitesses plus basses que  $0,8 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , la vitesse programmée n'est pas respectée alors que la distance l'est. L'erreur de vitesse étant reproductible, si nous désirons par exemple déplacer le micromanipulateur à  $0,46 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , il nous suffit de programmer une vitesse de  $40 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$ .

*Cas des très basses vitesses (non prévues par le constructeur)*

Comme cela a été montré auparavant, le micromanipulateur ne peut pas déplacer la pipette à certaines basses vitesses. Afin de contourner ce problème, j'ai réalisé un programme (cf. XII. Annexes.2, p235) qui envoie au micromanipulateur l'ordre de se déplacer d'un pas (ou plusieurs), et ce toutes les secondes. La vitesse maximale mesurée de « discussion » entre l'ordinateur et le contrôleur est d'environ 3 ordres par secondes. Ceci est tout à fait suffisant pour pouvoir déplacer à la vitesse du pas minimal par seconde et de contourner la limite de vitesse imposée par le constructeur.

Le problème qui se pose au cours de telles expériences d'étirement à basse vitesse est que le temps d'étirement est relativement long. Par exemple, pour un chromosome de  $10 \mu\text{m}$  de long, un étirement aller-retour dure un peu plus de 4 minutes. Durant ce temps, il ne doit y avoir aucune vibration parasite ou mouvement d'air dans la pièce.

*Immobilité des micromanipulateurs*

Autant il est nécessaire que le micromanipulateur qui permet l'étirement soit précis dans la vitesse et l'amplitude du mouvement, autant il est nécessaire que les micromanipulateurs soient immobiles quand l'expérience l'exige.

Afin de vérifier cela, nous laissons les pipettes immobiles dans le champ visuel et mesurons si ces dernières bougent en X et Y et en Z. Nous constatons qu'à l'échelle de temps des expériences, aucun mouvement des pipettes n'est détectable par mesure du déplacement des pipettes par corrélation d'image à 2 dimensions.

#### **f. Déroulement de l'expérience d'étirement de chromosome**

Le but de l'expérience d'étirement de chromosome est de mesurer la force nécessaire pour doubler la longueur du chromosome. Cette grandeur se nomme le **Stretch Modulus** ( $SM$ ) et a la dimension d'une force (cf. chapitre V.5.d, p88).

Une fois que le chromosome est saisi entre deux pipettes, il devient le lien matériel qui unit les deux pipettes : *Toute action d'une pipette sur le chromosome sera ressentie par l'autre pipette au travers du lien matériel qu'est le chromosome.*

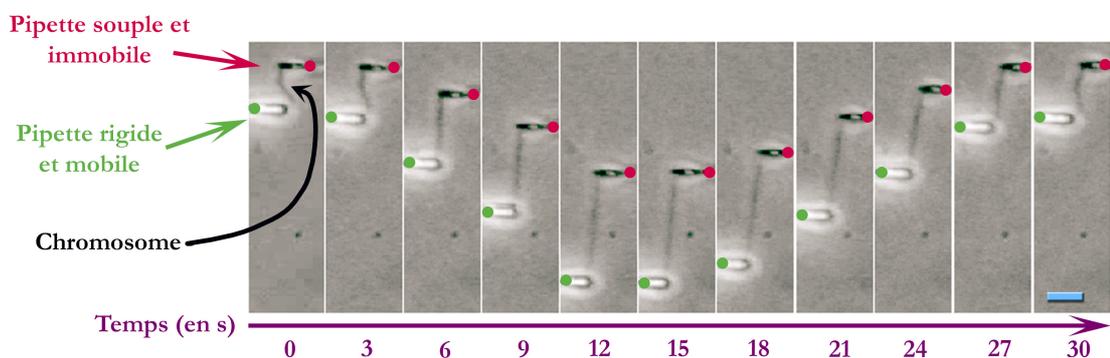
Pour mesurer le  $SM$  d'un chromosome nous devons tout d'abord être capables de l'étirer. La technique est relativement simple à comprendre : le chromosome est fixé sur les deux pipettes et une seule des deux pipettes bouge. Plus précisément, elle s'éloigne de l'autre pipette et ce, à une distance et une vitesse contrôlée. Résultat, le chromosome se retrouve « écartelé » entre les deux pipettes (la pipette qui ne bouge pas exerce une force de rappel). La pipette qui bouge de manière contrôlée est portée par un micromanipulateur relativement précis. La pipette qui bouge a aussi la particularité d'être rigide par rapport au chromosome. A aucun moment au cours de l'étirement la pipette mobile ne sera défléchie. Une première information nécessaire pour mesurer le  $SM$  est disponible : la longueur du chromosome à chaque instant de l'étirement. Cette longueur (mesurable sur l'image) est matérialisée par la distance qui sépare le point d'ancrage du chromosome sur chacune des pipettes.

Une seconde information est nécessaire pour mesurer le  $SM$  du chromosome : la force qui lui est appliquée au cours de l'étirement. La pipette mobile est rigide, elle ne se défléchira donc pas au cours de l'étirement. Mais la pipette immobile est souple. Et si cette pipette est suffisamment souple, la force exercée par la pipette mobile va tendre le chromosome et sera suffisante pour que la pipette souple soit défléchie (cf. Figure VI.13). D'après la loi de Hooke (cf. chapitre VI.10.d), cette déflexion de la pipette souple est proportionnelle à la force appliquée sur le chromosome et à la constante de ressort de cette pipette. La déflexion de la pipette souple et immobile est mesurée directement sur la séquence d'images de l'expérience et la constante de ressort de la pipette est mesurée par la méthode décrite dans le chapitre VI.10.d, la valeur de la force est donc accessible. Le Stretch Modulus ( $SM$ ) est la pente de la courbe :

$$F = f \left( \frac{l - l_0}{l_0} \right) \Rightarrow SM = \frac{\Delta F}{\frac{\Delta l}{l}}$$

### Équation VI.2 : Détermination du Stretch Modulus

où  $l_0$  est la longueur initiale du chromosome,  $l$  sa longueur à chaque instant de l'étirement et  $F$  la force qui lui est appliquée à chaque instant de l'étirement. Par « chaque instant de l'étirement », il faut comprendre chaque instant de l'étirement où une image est prise et est traitée. De manière générale, les séquences sont acquises à  $13 \text{ images.s}^{-1}$  et toutes sont traitées.



**Figure VI.13 : Séquence d'images successives extraites d'un film d'étirement**

(© Sébastien Almagro, 2003)

Taille de la barre d'échelle bleue : 5  $\mu\text{m}$ . La position de la pipette souple et immobile est marquée d'un point rouge. Celle de la pipette rigide et mobile d'un point vert. A  $T = 0$  s, le chromosome est pris entre les deux pipettes et n'est pas tendu. De  $T = 3$  s à  $T = 12$  s, la pipette mobile s'éloigne de sa position initiale ce qui tend le chromosome. La pipette souple étant fixée au chromosome, elle se défléchit de sa position initiale. De  $T = 15$  s à  $T = 30$  s, la pipette mobile retourne à sa position initiale, ce qui détend le chromosome. La force exercée sur le chromosome décroît jusqu'à être nulle et donc la déflexion de la pipette souple décroît jusqu'à être nulle.

A noter que nous avons fait varier la concentration en *Hoechst 33258* sur 3 ordres de grandeurs et nous n'avons pas observé de modification de la résistance à l'étirement.

### *Les différents types d'étirement*

Pour des raisons pratiques, nous avons donné des noms aux différents types d'étirement que nous avons réalisés au cours de ce travail :

#### *L'étirement du type « aller-retour »*

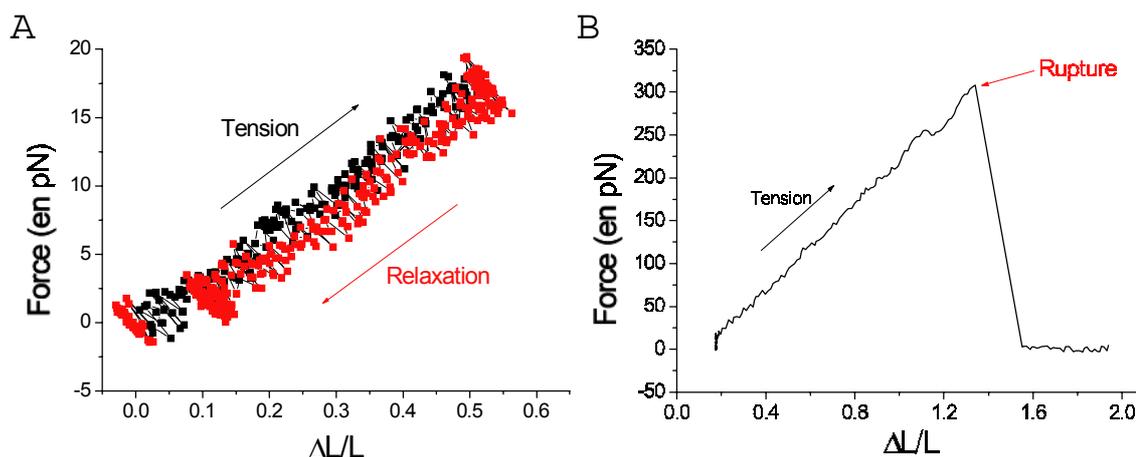
Au cours de ce type d'étirement, la pipette rigide et mobile se déplace à faible distance, environ 1 fois la longueur initiale du chromosome : le chromosome double donc de longueur. Cet étirement tend donc le chromosome, et revient à la position initiale. Ce type d'étirement permet de vérifier si la traction du chromosome est réversible (cf. Figure VI.14-A).

#### *L'étirement du type « infini »*

Au cours de ce type d'étirement, le chromosome est étiré sans relâche jusqu'à ce qu'il casse. Ce type d'étirement permet notamment d'étudier le comportement du chromosome aux grandes déformations (cf. Figure VI.14-B).

#### *L'étirement du type « aller-simple »*

Ce type d'étirement est effectué rarement. Nous appliquons une faible déformation au chromosome et nous ne revenons pas à la position initiale. L'intérêt de cet étirement est de voir comment le chromosome relaxe une contrainte constante.



**Figure VI.14 : Résultats de deux différents types d'expériences d'étirement de chromosomes**

(© Sébastien Almagro, 2003)

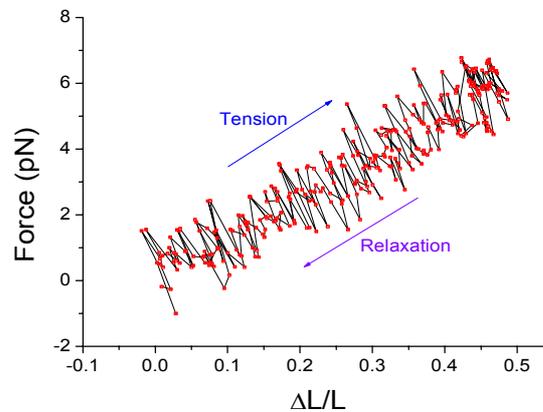
Ces deux graphiques représentent des résultats de deux expériences d'étirement de chromosomes assemblés *in vitro* de *Xénope*. **(A)** Le chromosome a été saisi par des pipettes fonctionnalisées par des anticorps panhistones. Les points en noirs correspondent à la phase de mise sous tension du chromosome et les points rouges à la phase de relaxation du même chromosome. Cet étirement est donc du type « aller-retour ». **(B)** Le chromosome a été saisi par des pipettes fonctionnalisées par des anticorps anti-XCAP-E. Le chromosome est tendu jusqu'à ce qu'il casse. Cet étirement est donc du type « infini ».

Une fois les coordonnées des deux pipettes obtenues pour chaque image de l'étirement nous pouvons commencer l'analyse des résultats. L'analyse des résultats est effectuée sur le logiciel tableur « *Origin®* » (*Version 6.0, © OriginLab® Corporation*).

Comme évoqué dans le chapitre VI.10.d « Mesurer le déplacement des pipettes au cours d'un étirement », les coordonnées sont prises à partir du sommet supérieur gauche de la zone de référence/test. Ce sommet ne coïncide pas avec la position de la pipette. Mais la différence de distance entre le sommet du carré ne varie pas au fil des images. Il est donc nécessaire de corriger la valeur de la distance entre les pipettes en mesurant manuellement la distance entre pipettes sur la première image.

Connaissant la taille absolue du pixel, nous pouvons ensuite en déduire la distance relative des deux pipettes, l'une par rapport à l'autre (en  $\mu\text{m}$ ). De cette information nous pouvons ensuite déduire la longueur du chromosome et la déflexion de la pipette de mesure à chaque instant de l'étirement.

Après avoir mesuré la constante de ressort de la pipette qui permet la mesure de la force, nous avons aussi accès à la valeur de la force appliquée au chromosome à chaque instant de l'étirement. Nous avons donc toutes les valeurs nécessaires au calcul du Stretch Modulus (cf. Équation VI.2 et Figure VI.15).



**Figure VI.15 : Résultat typique d'une expérience d'étirement**

(© Sébastien Almagro, 2003)

Ce graphique représente une courbe typique de force appliquée sur le chromosome en fonction de son extension relative. Les courbes de tension (bleu) et de relaxation (violet) du chromosome se superposent

Lors d'un étirement de type « aller-retour », nous observons que parfois les deux pipettes ne reviennent pas à leur position initiale. Cela peut être provoqué par un mouvement de la caméra CCD par rapport au microscope ou par une modification de la surface de la goutte d'eau qui entraîne un déplacement de 1 ou 2  $\mu\text{m}$  maximum de l'ensemble des deux pipettes. Nous corrigeons ce biais en supposant que le déplacement soit constant tout au long de l'étirement (ce que nous avons pu observer) et nous en soustrayons une partie à chacune des positions obtenues.

## 11. Projection d'enzyme sur chromosome unique

L'expérience d'étirement permet de mesurer la résistance à l'étirement d'un chromosome. Il est aussi possible de mesurer la résistance de celui-ci dans son état natif *ou* après une modification. Cette expérience de projection d'enzyme sur chromosome unique permet ainsi de savoir si cette modification affecte la résistance de cet objet, et donc ainsi de connaître le rôle d'une protéine ou d'une entité élastique dans la « charpente » du chromosome.

### a. Montage expérimental

Le montage expérimental utilisé dans le cas de l'étirement de chromosome (comme décrit dans le chapitre VI.10.a) est conservé mais un troisième micromanipulateur est ajouté au montage (cf. Figure VI.16). Ce troisième micromanipulateur permet l'approche d'une troisième pipette au voisinage du chromosome.

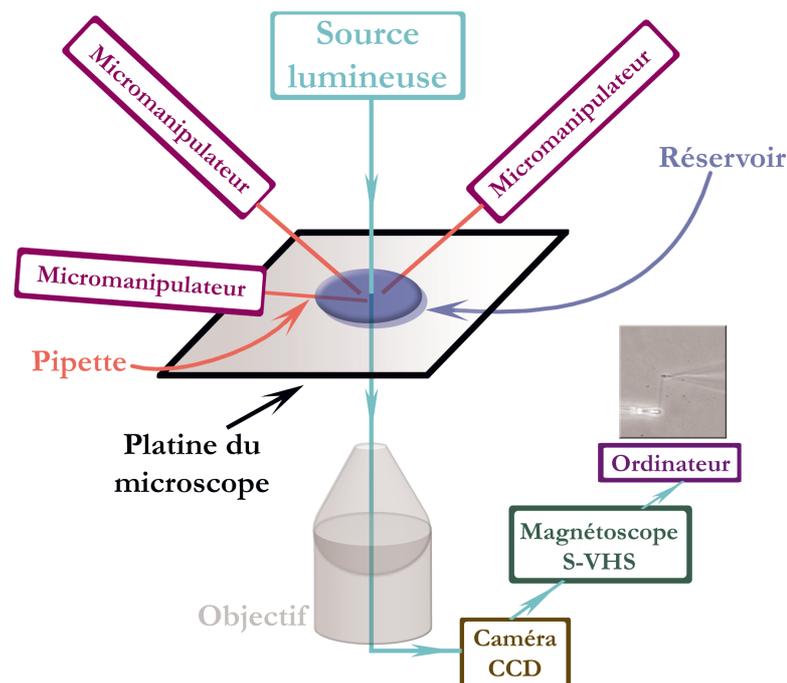
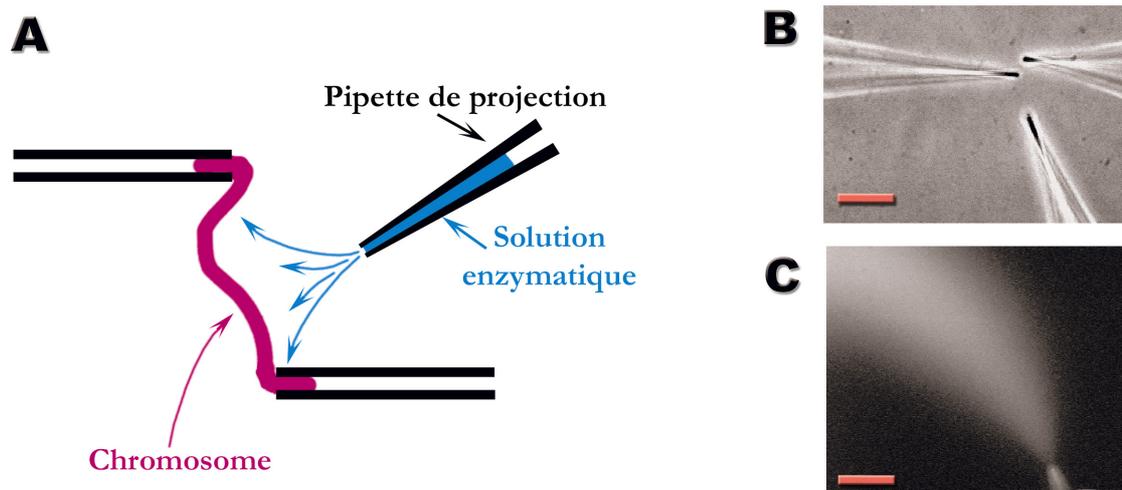


Figure VI.16 : Schéma du montage expérimental dans la configuration « étirement + projection »

(© Sébastien Almagro, 2003)

Le troisième micromanipulateur fait un angle d'environ  $70^\circ$  par rapport à l'axe qui passe par les deux autres micromanipulateurs permettant l'étirement du chromosome. Voir Figure VI.3 pour la description du montage habituel.

Cette troisième micropipette est, elle aussi, couplée au système de pressurisation. Elle est remplie d'une solution enzymatique qu'il est donc possible de projeter sur le chromosome. Le chromosome étant pris entre les deux autres pipettes (cf. Figure VI.17).



**Figure VI.17 : Principe de la projection d'enzyme sur chromosome unique**

(© Sébastien Almagro, 2003)

**A)** Schéma représentant le principe de l'expérience. Un chromosome est saisi par la technique d'aspiration (cf. Figure VI.9) entre deux pipettes. Une troisième pipette projette une solution enzymatique dont elle est remplie sur le chromosome. **B)** Image de contraste de phase des trois pipettes en absence de chromosome. **C)** Image identique à la figure B mais en mode fluorescence. La troisième pipette est remplie d'un fluorochrome (rhodamine) qui la rend visible. Grâce à la pressurisation, elle projette un flux de fluorochrome visible sous la forme d'une gerbe. Taille de la barre d'échelle des figures B et C :  $10\ \mu\text{m}$ .

## **b. Déroulement de l'expérience**

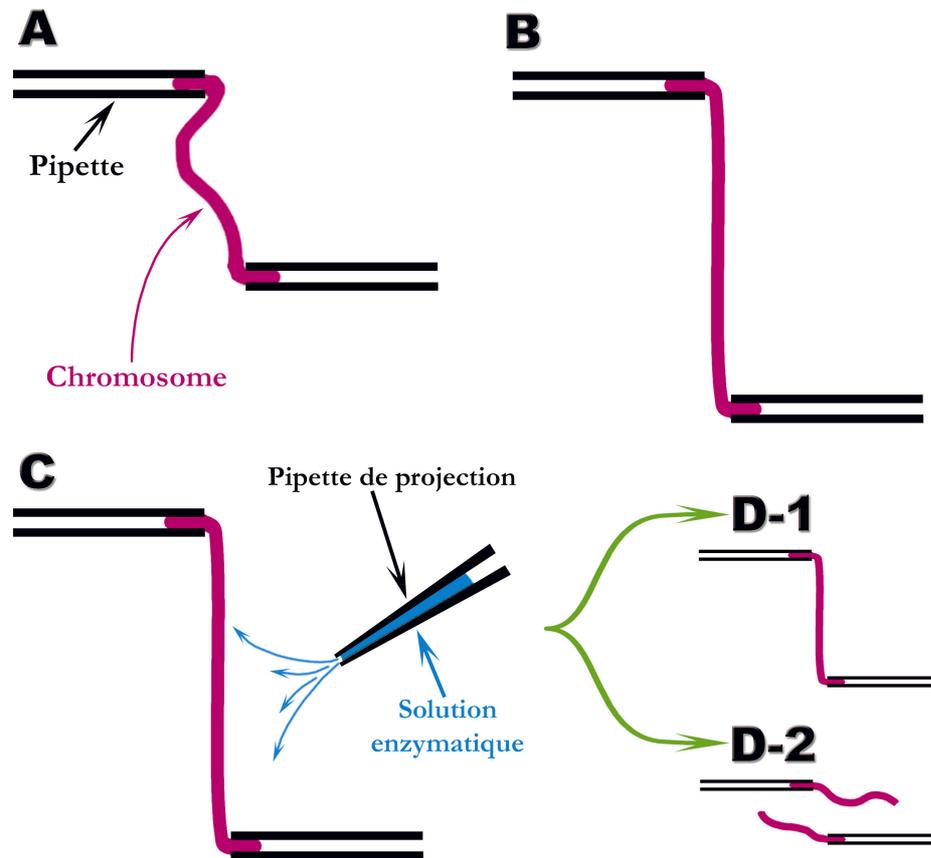
Toute l'expérience se déroule de manière identique à celle de l'étirement de chromosome (cf. chapitres : VI.10.d et VI.10.f). La seule différence réside dans le fait qu'une troisième pipette se trouve plus ou moins près du chromosome et qu'elle est capable de projeter une solution enzymatique sur ce dernier.

Le but de cette expérience (cf. Figure VI.18 pour le principe de l'expérience) est de voir le rôle de l'entité élastique contre laquelle l'enzyme est dirigée. Le chromosome étant sous tension, si nous faisons disparaître l'entité élastique contre laquelle l'enzyme est dirigée, trois cas peuvent se produire :

1. Soit le chromosome casse  $\Rightarrow$  l'entité élastique étudiée joue alors un rôle dans la charpente du chromosome. Par charpente, j'entends une structure qui permet au chromosome de garder son intégrité.

2. Soit le chromosome ne casse pas mais ne présente pas de réponse élastique mesurable au cours de l'étirement qui suit la projection  $\Rightarrow$  la charpente du chromosome n'est pas affectée (le chromosome ne casse pas) mais sa cohésion l'est. Par cohésion, j'entends l'agencement des diverses parties du chromosome qui font de lui un objet résistant.

3. Soit le chromosome ne casse pas et présente une réponse élastique identique à celle de son état natif au cours de l'étirement qui suit la projection  $\Rightarrow$  l'entité élastique étudiée ne joue pas de rôle ni dans la charpente ni dans sa cohésion.



**Figure VI.18 : Schéma descriptif de la projection d'enzyme sur chromosome unique**

(© Sébastien Almagro, 2003)

A) Dans ce type d'expérience le chromosome est tout d'abord pris entre deux pipettes par aspiration (cf. Figure VI.9 pour les détails de la technique d'aspiration). B) Le chromosome est ensuite étiré et reste sous tension. C) Une troisième pipette est approchée du chromosome tendu. Elle contient une solution enzymatique qu'elle projette sur le chromosome tendu (cf. Figure VI.17 pour les détails de la technique de projection). Deux possibilités : D-1) Le chromosome se casse ou, D-2) le chromosome ne se casse pas et peut être ensuite ré-étiré.

### **c. Protocoles et présentation de chaque enzyme.**

Toutes les enzymes sont diluées dans du tampon EB à 5 mM Mg<sup>++</sup> et toutes les dilutions sont réalisées extemporanément. La solution enzymatique souhaitée est ensuite transférée dans une seringue de 10 ml. A l'aide de cette seringue, nous remplissons les pipettes comme indiqué dans le chapitre VI.10. « *La technique d'aspiration* ». Il est extrêmement important d'utiliser une seringue de 10 ml car si nous utilisons une seringue de volume plus petit, la pression appliquée sur la seringue devient plus grande. Résultat, la vitesse élevée de la solution enzymatique dans l'aiguille provoque un phénomène de cavitation difficilement contrôlable. Les bulles ainsi formées bouchent alors la pipette de projection.

Nous avons *micro-projeté* 4 enzymes différentes :

- La DNase I (*DNase I RNase-free, Boehringer Mannheim, # 0776785*). Cette enzyme digère l'ADN.
- La RNase A (*Ribonuclease A from bovine pancreas, Sigma, # R5503*). Cette enzyme digère l'ARN.
- La trypsine (*TPCK treated bovine pancreas, Sigma, # 93630*). Cette enzyme digère les protéines. Elle présente une activité faible en comparaison de celle de la protéinase K.
- La protéinase K (*Proteinase K Tritirachium album, Sigma, # P4850*). Cette enzyme digère les protéines. Elle est extrêmement active.

Les pipettes utilisées pour la *micro-projection* sont du type « pipette dure ». C'est-à-dire qu'elles sont rigides (= faciles à manipuler), très coniques (= difficiles à se boucher) et le diamètre à la pointe est relativement grand (~ 1,5 µm, = débit important).

#### **d. Modifications et contraintes du montage expérimental.**

La manipulation d'une troisième pipette qui doit *micro-projeter* une solution apparemment agressive pour le chromosome n'est pas évidente. Le chromosome ne peut pas être saisi avant que la pipette de projection soit immergée dans le bain. Sinon, le choc provoqué par l'entrée de cette pipette dans le bain détruit le chromosome. Il est donc très important de faire pénétrer les 3 pipettes dans le bain avant de saisir le chromosome. Dans ce but, les 3 pipettes sont plongées dans le bain et les deux pipettes qui permettent de saisir le chromosome sont stationnées près du fond du bain alors que la pipette d'injection est stationnée vers le haut du bain.

Une fois le chromosome saisi par une extrémité, la seconde pipette est approchée de l'autre extrémité. Avant que le chromosome ne soit saisi par cette seconde pipette, la pipette de projection est rapprochée du chromosome tout en restant suffisamment loin pour ne pas le digérer (distance  $\sim 500 \mu\text{m}$  en Z). Une fois le chromosome saisi entre les deux pipettes, la pipette de projection peut être déplacée à l'aide du micromanipulateur.

La présence d'une troisième pipette est aussi lourde de conséquences pour la qualité de l'image car la surface du bain est très déformée par la présence de ces trois objets.

## **12. Mesure des fluctuations du chromosome**

Le chromosome, à température ambiante, est capable de fluctuer. Son aptitude à fluctuer est fonction de sa « souplesse ». Un paramètre élastique nommé longueur de persistance ( $\mathcal{L}_p$ ) permet de quantifier cette souplesse (cf. chapitre V.5.e, p95).  $\mathcal{L}_p$  représente la longueur au bout de laquelle l'effet d'une contrainte ne sera pas ressenti. Dans le cas de fluctuations libres d'un chromosome, la contrainte est celle donnée par l'énergie thermique du milieu ( $k_B \cdot T$ ).

### **a. Acquisition d'images de chromosomes fluctuants**

Le montage expérimental est en grande partie identique à celui décrit dans le chapitre VI.10. Les différences avec ce montage sont les suivantes :

- Nous avons utilisé plusieurs objectifs différents (*LCplan FI - X 40 + X 1,5 ; PlanApo - x60 ; UPLAN Fi - X100 ; cf. chapitre « Calibration de la taille absolue du pixel »*) et nous n'avons observé aucune différence dans les résultats.
- Le chromosome peut être observé tout au long de l'acquisition en fluorescence ou en contraste de phase. La fluorescence facilite postérieurement les mesures, mais raccourcit le temps d'observation. Le contraste de phase augmente le temps d'observation, mais de par son faible contraste, rend moins faciles les mesures.
- Nous n'utilisons de réservoir que dans le cas d'observations de fluctuations entre deux pipettes. Sinon, les chromosomes sont pris entre lame et lamelle.

## **b. Fluctuations d'un chromosome entre deux pipettes**

Nous avons aussi utilisé une méthode qualitative plutôt que quantitative qui consiste à attraper un chromosome entre deux pipettes, sans le tendre, et observer si des zones de celui-ci ne fluctuent pas.

Le protocole d'aspiration pour attraper le chromosome est le même que celui utilisé dans le chapitre VI.10.d. L'objectif utilisé est un objectif *UPLAN Fi - X100*.

Nous utilisons cette méthode car lorsque le chromosome fluctue librement, il subit des rotations sur lui-même, se déforme, etc. Mais lorsque le chromosome est pris entre deux pipettes, un sens et une direction lui sont imposés. Il est capable de fluctuer car nous ne lui appliquons directement aucune force. Cette technique a été déjà utilisée dans la littérature (Poirier et Marko, 2002) pour mesurer la longueur de persistance de chromosomes. Les observations sont réalisées en contraste de phase et l'expérience dure environ une trentaine de minutes durant lesquelles, le chromosome fluctue entre deux pipettes et est filmé. Le résultat de cette expérience est un film ou une succession d'images que nous exploitons *a posteriori*. A partir des images et à l'aide du logiciel que j'ai réalisé (cf. Annexes.3, p249), nous définissons deux segments de longueurs connues sur le chromosome et nous mesurons l'évolution au cours du temps de la valeur de l'angle entre ces deux segments.

## **VII. Résultats.**

### **1. Publication n°1 :**

# Individual chromosomes as viscoelastic copolymers

S. Almagro<sup>1,2</sup>, S. Dimitrov<sup>2</sup>, T. Hirano<sup>3</sup>, M. Vallade<sup>1</sup> and D. Riveline<sup>1,4</sup>

19th May 2003

*1 Laboratoire de Spectrométrie Physique, UMR 5588, Université Joseph Fourier, Saint-Martin d'Hères, France*

*2 Institut Albert Bonniot, Unité INSERM 309, La Tronche, France*

*3 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New-York, USA*

*4 Corresponding author : drivelin@spectro.ujf-grenoble.fr*

## Abstract

We report elastic measurements of individual chromosomes observed *in vitro*. Free fluctuations of shapes show that chromosome can be seen as a copolymer, exhibiting rigid regions alternating with semi-flexible regions. We characterize this behavior and compare it with known biopolymers. We further show that the inner part of chromosome exhibits viscoelasticity, as extracted by the loading rate dependence of the stretch modulus. Taken together, these data suggest an organization for chromosome, as a copolymer composed of an inner rigid core exhibiting viscoelasticity surrounded by an elastic soft envelope.

PACS. 87.15.-v Biomolecules: structure and physical properties

PACS. 82.35.Lr Physical properties of polymers

PACS. 83.60.Bc Linear viscoelasticity

*Introduction.* - Elasticity measurement on individual biopolymers has been showing its power in unraveling levels of organization. Single molecules were probed by optical and magnetic tweezers, atomic force microscopes, or pipettes deflection. The non linearities in the force-extension curves have revealed transitions for DNA [1] and RNA [2], opening of known domains within single proteins (for titin [3, 4], tenascin [5], spectrin [6], bacteriorhodopsin [7]), energy landscapes between interacting molecules [8]. The same approaches have been extended to study the interaction between enzymes and DNA [9, 10]. More complex biological objects such as chromatin [11, 12, 13] and chromosomes [14, 15, 16, 17] have been studied along the same lines.

The mitotic chromosome is a huge supramolecular assembly where DNA is compacted into a short, thick object with dimensions typically in the order of  $10\mu\text{m}$  length and a diameter of  $1\mu\text{m}$ . Topoisomerase II, an enzyme able to untangle chromatin knots and proteins from the family of SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*) are key players in the process of chromatin compaction during mitosis [18, 19]. The SMC proteins are thought to be a family of molecular motors capable of packaging DNA.

We have previously reported measurements of elastic properties of *in vitro* assembled mitotic chromosomes: their bending and stretching modulus, and their force-extension curve for large deformation have been measured [14]. Based on these results, we had argued that the *in vitro* assembled chromosome is formed of thin rigid inner axes, responsible for sharp response to longitudinal stress, and a soft envelope of chromatin connected to these axes, responsible for the weak response to bending stress. Moreover, force-extension curves for large deformations displayed viscoelastic behavior, similar to large deformations of titin-like molecules and could be well understood in the framework of modified worm-like chain models [20].

In this paper, we report the results of new experiments where we have taken a closer look at the elastic behavior of chromosomes. The main results are as follow : (i) in the previous work, we had considered chromosomes as homogeneous along their longitudinal axis  $z$ , and heterogenous along their radial direction  $r$  (hence the thin rigid core and the thick soft envelope). Here, we study the local properties of chromosomes along the  $z$  axis, and show that even in this direction, chromosomes cannot be considered as homogeneous ; (ii) we are able to selectively stretch various components of the chromosome and we show that the viscoelastic behaviour of chromosomes is only due to the rigid core.

*Materials and Methods.* - Preparation of mitotic *in vitro* assembled *Xenopus* chromosomes was described previously [21]. Briefly, demembranated *Xenopus* sperm nuclei were mixed with *Xenopus* egg extracts in the presence of ATP and its regenerating agents. Three hours after, the solution was diluted in the experiment buffer (80mM  $\beta$ -glycerophosphate, 20mM EGTA, 1mM DTT, adjusted to pH 7.3 with KOH) and placed in an open observation chamber. Individual chromosomes could be observed under the microscope by phase microscopy. In order to check that the observed object was indeed a chromosome, we labeled the chromosome DNA with a non intercalating fluorescent dye (Hoechst 33258, final concentration  $10^{-9}M$ ) [22]. Note that these chromosomes are blocked in a state similar to anaphase II and are composed of only one chromatide.

For observation and measurements, an open observation chamber containing the chromosome solution was placed on an inverted microscope (Olympus, IX 70). Images were recorded by a S-VHS VCR (Panasonic, TL700). The objectives used were : Plan Ph2 Olympus  $\times 40$ , with an additional magnification of 1.5, or PlanApochromat Ph3 Olympus  $\times 60$ , 1.4 n.a.

Elastic measurements protocols are similar to [14] with a significant increase in the sensitivity and range of accessible parameters. Briefly, for persistence length measurements, individual chromosomes were observed between two pressed slides. Free 2D fluctuations were analysed by acquiring fluorescence

images and computing the tangent autocorrelation function. Alternatively, chromosomes were taken by two pipettes and fluctuations were observed for time durations up to 30 minutes.

For traction experiments, chromosomes were caught with two micropipettes by two different methods, aspiration and antibody mediated adhesion (see below). In both cases, a fixed micropipette of calibrated spring constant was used as the force sensor. The other pipette was imposed to move at controlled velocity via a step by step micromanipulator (Sutter, MP-285) up to one time the initial chromosome length. The fixed pipette deflection and the end-to-end distance between pipettes gave respectively the force and the extension of the chromosome. Both were extracted with a computer based frame analysis software developed in the laboratory. We measured the limits in resolution for the set-up, by imposing a piezo-electric controlled motion of pipettes : we found that the image 2D correlation analysis allowed to measure minimal deflections of 50 nm. The slope of the force-relative extension graph yielded the stretch modulus. The stretch moduli are measured only for the extension (and not for the return). In most of the experiments, both extension and return assays were performed.

For antibody mediated adhesion, pipettes were incubated overnight at 4°C in a buffer (PBS/NaN<sub>3</sub> 0.02 %) containing antibody typically at 1 µg/ml concentration. Three antibodies were used, immunopurified anti-histones (Roche, # 1 492 519), immunopurified anti-XCAP-E (called also here anti-SMC) and anti-topoisomerase II [18]. We checked the specificity of the attachment of the chromosome to the pipette via the antibodies : non-coated and BSA coated pipettes were unable to adhere to the chromosome. In addition, an antibody against nucleoplasmin (the most abundant protein in the *Xenopus* extract which, however, does not associate with mitotic chromosomes) was also used to coat the pipettes. The anti-nucleoplasmin antibody coated pipettes did not bind to chromosomes.

*Permanent bends.* - Images of freely fluctuating chromosomes show that curved regions as long as 1 µm do not relax. Flexible regions fluctuate with a time scale of ~ 1s, whereas the bends remain stable for duration at least as long as 30 minutes (see Fig. 1a). In order to characterize quantitatively these features, chromosomes were confined in 2D and they were observed by fluorescence for minutes. Regions of chromosomes which did not fluctuate were then isolated by visualising the acquired movies ; their lengths were measured manually (see Fig. 1b). Mean value is 1.1µm ± 0.3µm (10 chromosomes, 53 bends). Regions between bends lengths are 1.6µm ± 0.8µm, with ~ 5 bends per chromosome.

By observing bends surrounded by fluctuating parts in the pipette set-up, we could estimate the bends persistence length following ref. [23]. Angle fluctuations,  $\Delta\theta$ , were extracted by a home-made software, that tracks three points on the bend (two at the ends of bend, and one at its center) ; we measured angles between these three points, when chromosomes were taken between pipettes. Histograms were fitted to a gaussian distribution (Fig. 1c). Following the relation given by [23], i.e.  $\langle\Delta\theta^2\rangle = L_{bend}/L_{pbend}$ , where  $L_{bend}$  and  $L_{pbend}$  are respectively contour length and persistence length of the bend, we determined

Lpbend. We varied the time between succeeding time points with no observable difference (1s and 10s for 10 to 30 minutes of observation). We also compared to the directly determined  $\langle \Delta\theta^2 \rangle$  from the time series. Three bends were analysed. Values for Lpbend estimated from the fit were :  $11\mu\text{m}$ ,  $32\mu\text{m}$ ,  $12\mu\text{m}$ .

Our individual chromosomes appear to behave as copolymers : rigid regions are separated by flexible regions. These chromosomes are identical to those used in our previous study [14] : the tangent autocorrelation function exhibits an exponential decay, yielding a persistence length  $L_{pmean}$  of  $2.7\mu\text{m}$ . It can be shown that permanent bends do not affect significantly the exponential decay for the autocorrelation function for the following reasons : i/ a gliding curvilinear origin is used for measuring the correlation ; ii/ typically three periods soft/rigid regions are observed per chromosome ; iii/ contour lengths distribution for bends and soft regions are not sharply peaked. Therefore, the apparent total persistence length is given approximately by :  $\frac{L_{bend\&soft}}{L_{pmean}} = \frac{L_{bend}}{L_{pbend}} + \frac{L_{soft}}{L_{psoft}}$ ,  $L_p$  and  $L$  refer to persistence lengths and contour lengths respectively. Taking  $L_{bend\&soft}=2.7\mu\text{m}$ ,  $L_{pmean}=2.7\mu\text{m}$ ,  $L_{bend}=1.1\mu\text{m}$ ,  $L_{pbend}=10\mu\text{m}$ ,  $L_{soft}=1.6\mu\text{m}$ , we obtain  $L_{psoft}=1.8\mu\text{m}$ . With our optical resolution, we cannot exclude another description, where chromosome would be composed of a single polymer type with sharply localized bends.

*Loading rate dependence.* - The stretch moduli, which is extracted from the force-extension curve, can be load dependent. We measured this dependence by changing the loading rate over 3 orders of magnitude, i.e. for  $kv$  between 0.1 and 1000 pN/s, where  $k$  is the spring constant ( $10 < k < 400\text{pN}/\mu\text{m}$ ) and  $v$  the pulling velocity ( $0.04 < v < 1\mu\text{m}/\text{s}$ ). Results are reported on Figure 2.

The way the chromosomes are grabbed affects significantly their stretch modulus load dependence. When the chromosomes were taken by their envelope with anti-histones and anti-topoisomerase II antibodies, the stretch modulus was constant ( $\approx 50\text{pN}$ ). In contrast, when the chromosomes were grabbed by anti-SMC antibodies, two regimes could be observed : (i) a constant stretch modulus of also  $\approx 50\text{pN}$  for loading rates of  $0.1\text{pN}/\text{s}$  up to  $40\text{pN}/\text{s}$  ; (ii) a strong variability of the measured stretch modulus for larger loading rates in the vicinity of  $100\text{pN}/\text{s}$ , suggesting a threshold mechanism.

The strong viscoelastic regime can be measured by the importance of the dissipated energy during one stretch-release cycle, i.e. the area enclosed by the force-extension curve (Fig. 3a). Indeed we observed that stretch modulus points lower than  $200\text{pN}$  generally exhibited reversible curves, in contrast to larger points obtained above  $40\text{pN}/\text{s}$ , displaying hysteresis. We can assume for simplicity that the stretch-release cycle gives a rectangular triangle shape, i.e. linear force increase during stretch followed by immediate drop to zero force upon release keeping maximal extension : taking  $\frac{\Delta L}{L}$  for the relative extension, and  $S$  the stretch modulus, the measured area  $A$  is then given by  $A = \frac{S}{2} \left(\frac{\Delta L}{L}\right)^2$ . Area of the hysteresis cycle over the relative extension squared was plotted as a function of the stretch modulus (see Fig. 3b). Two regimes are visible : when  $kv < 40\text{pN}/\text{s}$ ,  $S$  is constant and essentially no hysteresis is observed. Above  $\sim 40\text{pN}/\text{s}$ , hysteresis can appear, but is not related to loading rate (not shown) :

variation in the stretch modulus reflects variability in mechanical properties of each chromosome. However the plot seems to indicate that shape of hysteresis is invariant. We fitted this latter regime, by a line going through the origin and obtained 0.4 slope value, which is close to the 0.5 expected value. This actual slope is smaller : this is consistent with the observed curve shapes (see Fig. 3a), which exhibit a decrease of the relative extension during the release. Note that this slope value appears as a purely geometrical factor. It suggests that the decay path in the release part is essentially the same for the probed loading rates. A limited number of domains would then need to be open in the stretch part, yielding to a conserved release path.

*Longitudinal variation of the bending modulus.* - Permanent bends in a biopolymer is an unusual property : DNA, actin and microtubules were characterised as homogeneous biopolymers with measured persistence lengths. As we have shown above, the bending modulus ( $B$ ) of the chromosome is not constant along its length : the chromosome is formed of long parts of weak bending modulus connected by regions of higher bending modulus.

The existence of longitudinal rigid regions does not modify our model of the chromosome as an assembly of thin rigid core and thick soft envelope. To see that, let us recall our arguments about the existence of the thin rigid core. Suppose that the chromosome is homogeneous along the  $z$  axis (*i.e.*  $B$  does not depend on  $z$ ). If chromosomes were also homogeneous along the radial direction, their Young ( $Y$ ) and bending modulus should be related through  $B \approx Yr^4$  where  $r$  is the radius of the chromosome. We had previously showed that chromosomes do not obey this relation, and  $B$  is two to three orders of magnitude smaller than what is expected from this relation. Our new measured persistence lengths for both regions are still far below the expected mm values.

A possible explanation for the short stiff region can be the existence in this part of the chromosome of molecular agents linking DNA loops together, thus rigidifying the chromosomes specifically there. Poirier et al [23] have measured elastic properties of *in vivo* chromosomes. They measure much higher persistence length for chromosomes, in the range of mm. The difference between their results and ours can be understood by the presence or absence of these linking agents. One has to bear in mind that *the in vitro* assembled chromosomes that have been used in our study should be viewed as the very first chromosomes which are assembled after the fertilization process, *i.e.* after the sperm nucleus entering into the egg. The first twelve divisions of the *Xenopus* fertilized egg are very quick (about 30 minutes each), and this suggests that the embryonic chromatin and in particular embryonic mitotic chromosomes should be built in a way to accomodate this very rapid cell divisions. Using DNA linking agents inside the mitotic chromosome at the embryonic stage could critically slow down the division process and thus it is probably avoided at this stage. To test the validity of this hypothesis, one could perform elastic measurement of chromosomes at different stages of embryonic development and see whether the size of rigidified regions grows as a function of developmental stage.

*Loading rate dependence.* - For a perfectly elastic object, the response to a longitudinal stress does not depend on the rate at which the stress is applied.

For a viscoelastic object on the other hand, the response critically depends on the loading rate. For a long polymer such as titin or tenascin, additional length is stored inside small units which can open upon stress and increase the total length of the polymer. The response of the polymer to a longitudinal stress depends on the rate at which the stress is applied : if the loading is low, the polymer is close to thermodynamic equilibrium, the number of open domains is given by the quasistatic value of the force : during stretching, the length of the polymer increases, the elastic response is weak and close to the entropic response of a flexible polymer for small end-to-end distance. If on the other hand, the loading rate is high, domains do not have time to relax to their open state : the elastic response of the polymer is that of a polymer when the end-to-end distance is close to the polymer length. This is called the modified worm like chain model and has been satisfactorily applied to explain force-extension curve of titin-like molecule on the mitotic chromosome [14]. Points of attachment can be considered as boundary conditions for the traction assay. Our approach allows to exhibit a boundary condition dependence for an elastic modulus measurement on the very same object. Indeed, chromosomes when caught by anti SMC Ab were showing two regimes in loading rate with a threshold at  $\sim 40\text{pN/s}$ , whereas for other antibodies, the stretch modulus was essentially constant.

When stretching the soft envelope of the chromosome, no loading dependence has been observed. The envelope is thus perfectly elastic, and this is what is expected if the envelope is mainly formed of *independent* chromatin loops. On the other hand, stretching the SMC based scaffold shows strong loading dependence, which is in agreement with our earlier proposal of the scaffold formed of units storing lengths, similar to models proposed by Hirano [18, 19] and to the association of titin to the scaffold [24].

Note that we have again a way of testing the linking agent hypothesis : the binding energy of DNA linking agents cannot be much larger than  $kT$ , so if the difference between *in vivo* and *in vitro* chromosomes is only due to the presence of these agents, the measurement performed on *in vivo* chromosomes, when attached only via the anti-histones antibodies, should display a load dependence.

*Conclusion.* - We have shown that *in vitro* assembled mitotic chromosome is composed of two alternating soft/rigid regions. Its inner part exhibits viscoelasticity, as assessed by stretch modulus loading rate dependence. These experimental results give elements for further modelling of chromosome organisation.

\*\*\*\*

We acknowledge B. Houchmandzadeh, J. Bednar, C. Claudet and J. Prost for stimulating discussions and A. Carminati for technical support. This work was supported by la région Rhône-Alpes and a PCV program from the CNRS. S.A. acknowledges support from La Ligue and ARC.

## References

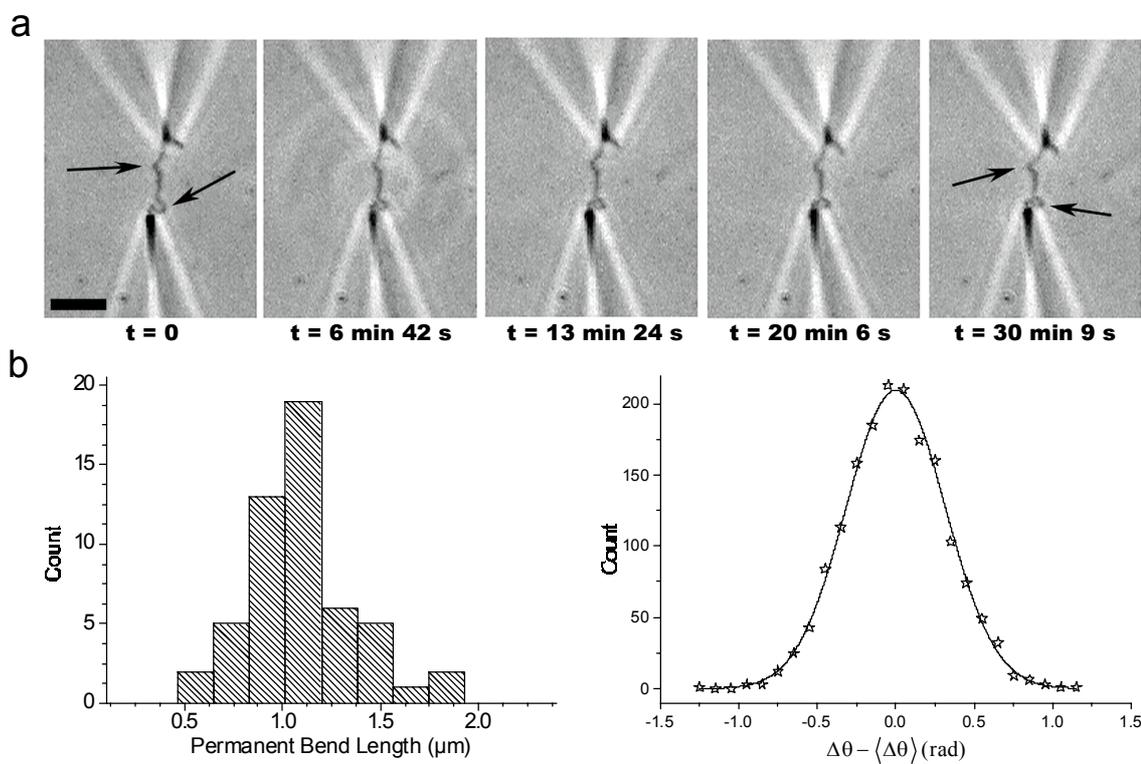
- [1] CLUZEL P., LEBRUN A., HELLER C., LAVERY R., VIOVY J. L., CHATENAY D., CARON F., *Science*, **271** (1996) 792.
- [2] LIPHARDT J., ONOA B., SMITH S. B., TINOCO I. JR, BUSTAMANTE C., *Science*, **292** (2001) 733.
- [3] TSKHOVREBOVA L., TRINICK J., SLEEP J. A., SIMMONS R. M., *Nature*, **387** (1997) 308.
- [4] KELLERMAYER M. S., SMITH S. B., GRANZIER H. L., BUSTAMANTE C., *Science*, **276** (1997) 1112.
- [5] OBERHAUSER A. F., MARSZALEK P. E., ERICKSON H. P., FERNANDEZ J. M., *Nature*, **393** (1998) 181.
- [6] LENNE P. F., RAAE A. J., ALTMANN S. M., SARASTE M., HORBER J. K., *FEBS Lett.*, **476** (2000) 124.
- [7] OESTERHELT F., OESTERHELT D., PFEIFFER M., ENGEL A., GAUB H. E., MULLER D. J., *Science*, **288** (2000) 143.
- [8] EVANS E., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **30** (2001) 105.
- [9] DOHONEY K. M., GELLES J., *Nature*, **409** (2001) 370.
- [10] STRICK T. R., CROQUETTE V., BENSIMON D., *Nature*, **404** (2000) 901.
- [11] CUI Y., BUSTAMANTE C., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97** (2000) 127.
- [12] BENNINK M. L., LEUBA S. H., LENO G. H., ZLATANOVA J., DE GROOTH B. G., GREVE J., *Nat. Struct. Biol.*, **8** (2001) 606.
- [13] BROWER-TOLAND B. D., SMITH C. L., YEH R. C., LIS J. T., PETERSON C. L., WANG M. D., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99** (2002) 1960.
- [14] HOUCHEMANDZADEH B., DIMITROV S., *J. Cell Biol.*, **145** (1999) 215.
- [15] POIRIER M., EROGLU S., CHATENAY D., MARKO J. F., *Mol. Biol. Cell*, **11** (2000) 269.
- [16] HOUCHEMANDZADEH B., MARKO J. F., CHATENAY D., LIBCHABER A., *J Cell Biol.*, **139** (1997) 1.
- [17] POIRIER M. G., NEMANI A., GUPTA P., EROGLU S., MARKO J. F., *Phys. Rev. Lett.*, **86** (2001) 360.
- [18] HIRANO T., MITCHISON T. J., *Cell*, **79** (1994) 449.
- [19] KIMURA K., RYBENKOV V. V., CRISONA N. J., HIRANO T., COZZARELLI N. R., *Cell*, **98** (1999) 239.

- [20] RIEF M., FERNANDEZ J. M., GAUB H. E., *Phys. Rev. Lett.*, **81** (1998) 4764.
- [21] DE LA BARRE A. E., ROBERT-NICOUD M., DIMITROV S., *Methods Mol. Biol.*, **119** (1999) 219.
- [22] We have checked that the Hoechst concentration we use does not affect elastic properties.
- [23] POIRIER M. G., EROGLU S., MARKO J. F., *Mol. Biol. Cell*, **13** (2002) 2170.
- [24] MACHADO C., ANDREW D. J., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **481** (2000) 221.

### Figure Captions

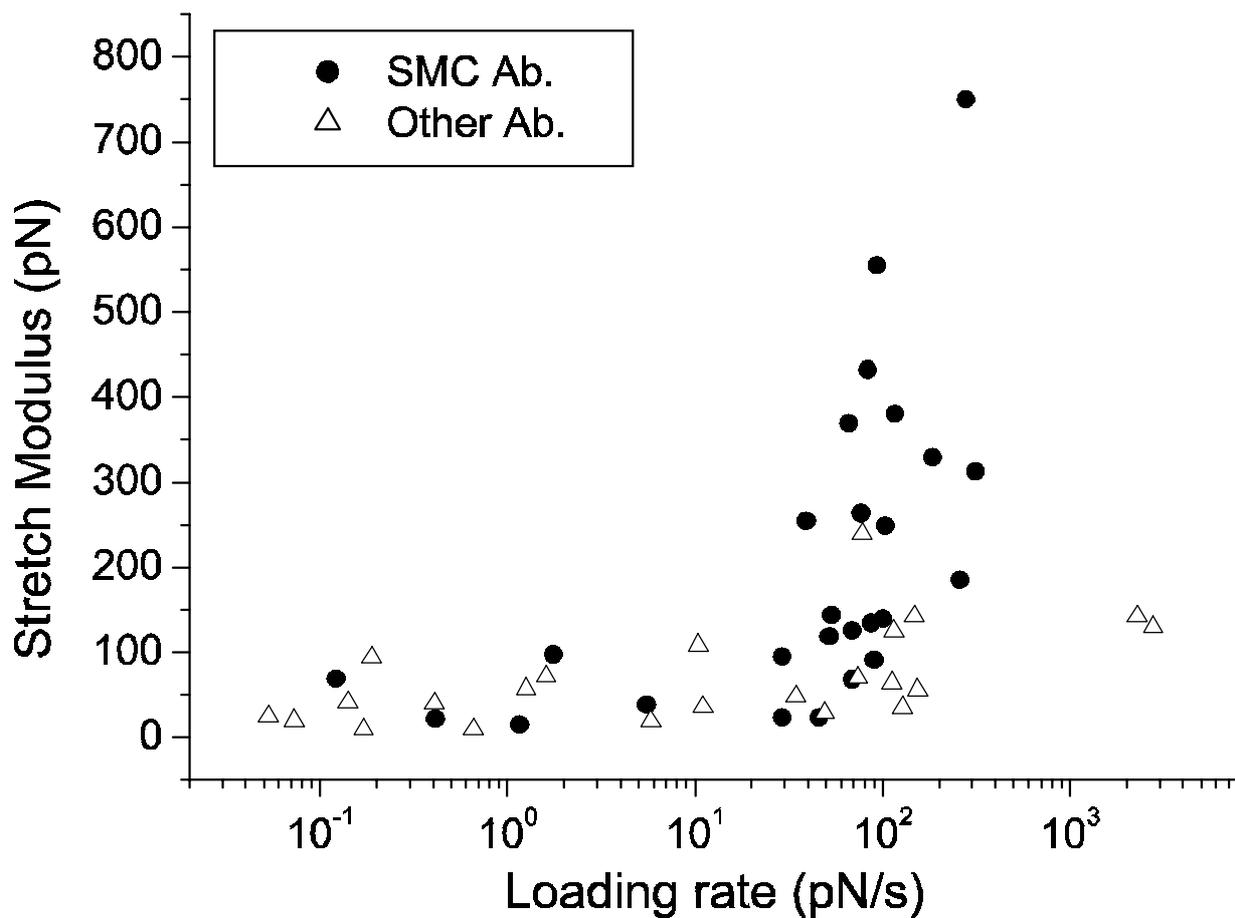
- Figure 1 - Chromosome fluctuations. (a) Time series of a chromosome maintained in the observation plane by attachment to pipettes. Arrows indicate bends that do not relax during the 30 minutes observation. Scale bar, 5  $\mu m$ . (b) Distribution of permanent bend lengths. (c) Typical histogram for  $\Delta\theta - \langle\Delta\theta\rangle$ . The histogram was fitted by a gaussian distribution.
- Figure 2 - Stretch modulus as a function of loading rate. The chromosome is taken by its envelope, via anti-histones and anti-topoisomerase II antibodies : the modulus is essentially constant. In contrast, the chromosome stretch modulus exhibits load dependence when taken via anti-SMC antibodies. Note that the stretch modulus values increase for loading rates values larger than 40 pN/s, suggesting a threshold.
- Figure 3 - Relationship between stretch modulus and hysteresis in extension-return assays. (a) Stretch-release experiments with  $k_v=0.17pN/s$  (triangle), and  $k_v=310pN/s$  (circle). At low  $k_v$ , curves for SMC and other Ab mediated traction are similar. At high  $k_v$ , an increase in stretch modulus associated with an hysteresis behaviour is observed only for the SMC case. (b) Hysteresis characterisation for SMC Ab traction experiments. A is the area enclosed in the stretch-release curves.

Figures



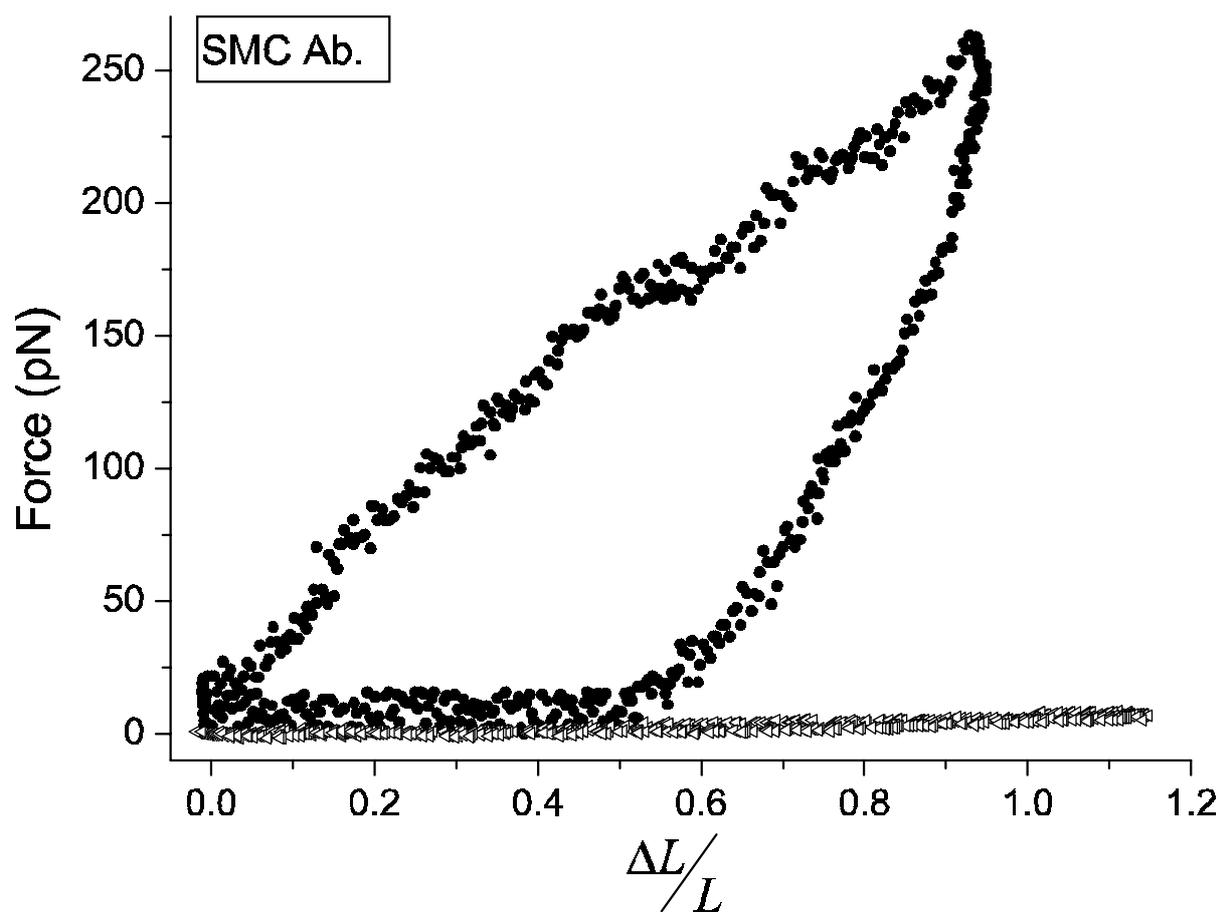
Publication n°1 -Figure VII.1

(© 2003, Sébastien Almagro, Stefan Dimitrov, Marcel Vallade et Daniel Riveline.)



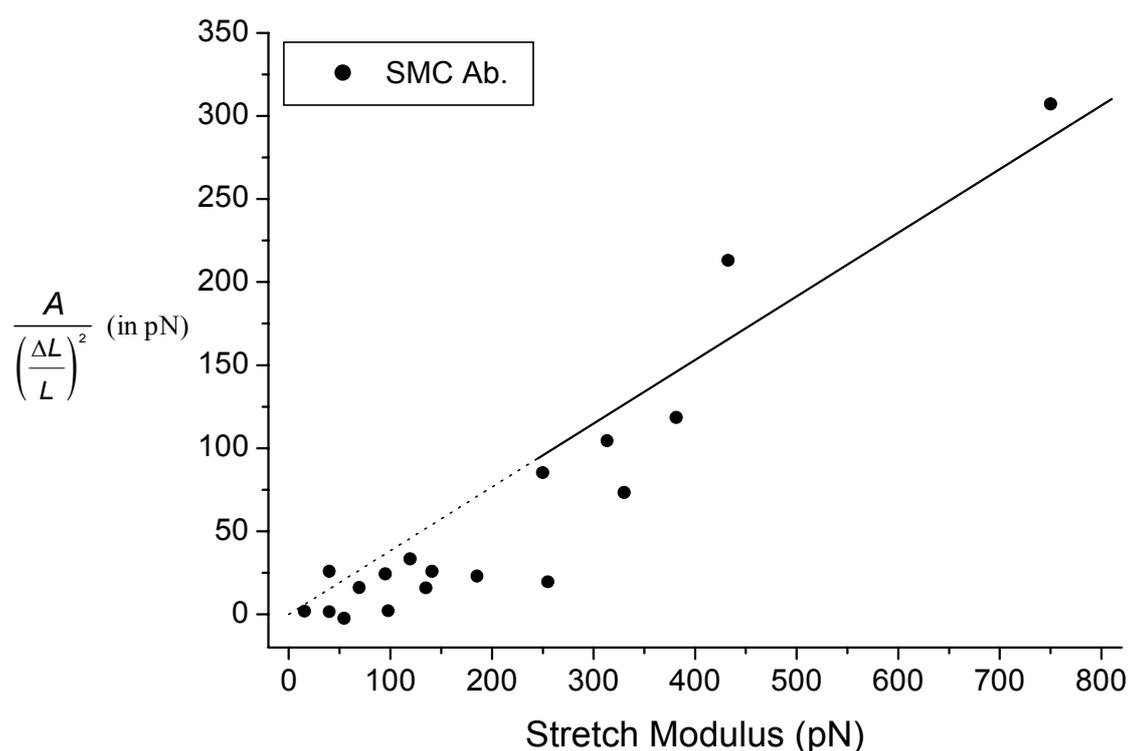
Publication n°1 -Figure VII.2

(© 2003, Sébastien Almagro, Stefan Dimitrov, Marcel Vallade et Daniel Riveline.)



Publication n°1 -Figure VII.3 - a

(© 2003, Sébastien Almagro, Stefan Dimitrov, Marcel Vallade et Daniel Riveline.)



Publication n°1 -Figure VII.3 - b

(© 2003, Sébastien Almagro, Stefan Dimitrov, Marcel Vallade et Daniel Riveline.)

## 2. Publication n°2

**The mitotic chromosome: an assembly of rigid elastic axes, organized by SMC proteins and surrounded by a soft chromatin envelope**

Sébastien Almagro<sup>1</sup>, Daniel Riveline<sup>2</sup>, Tatsuya Hirano<sup>3</sup>, Bahram Houchmandzadeh<sup>2</sup>, and Stefan Dimitrov<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Différenciation, INSERM U309, Institut Albert Bonniot, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche Cedex, France

<sup>2</sup>Laboratoire de Spectrométrie Physique, UMR 5588, Université Joseph Fourier, Saint-Martin d'Hères, France

<sup>3</sup>Cold Spring Harbor Laboratory, One Bungtown Road, Cold Spring Harbor, NY 11724, USA

### *Summary*

The structure of mitotic chromosomes is still poorly understood. Here we describe the use of a novel approach based on elasticity measurements of a single chromosome for studying the organization of these objects. The data reveal that mitotic chromosomes exhibit a non-homogenous structure consisting of rigid elastic axes surrounded by a soft chromatin envelope. The chemical continuity of DNA, but not RNA, was required for the maintenance of these axes. The axes show a modular structure and the SMC proteins participate in their organization. Topoisomerase II was not involved in either the organization of the axes, or in the maintenance of the mitotic chromosomes. A model for the assembly and the structure of the mitotic chromosome is proposed. According to this model the chromosome axes are dynamic structures which assemble at the onset and disassemble at the end of mitosis, respectively. The SMC proteins, in addition to maintaining axis elasticity, are essential for the determination of the rod-like chromosome shape. The extreme compaction of mitotic chromosomes is determined mainly by the high amount of bivalent ions bound to DNA at mitosis.

### *Introduction*

DNA is highly compacted ~10,000-20,000 times in the mitotic chromosomes of a typical vertebrate cell. It is far from clear how this folding is accomplished. The 30 nm chromatin fiber accounts only for 40:1 of the compaction ratio and the remaining ~500 fold compaction is achieved through a largely unknown mechanism (Nasmyth, 2001; Woodcock and Dimitrov, 2001). The complexity of the mitotic chromosome structure has both fascinated and frustrated scientists for many decades. Structural analysis of mitotic chromosomes have been very difficult because of the extreme compaction of the chromatin fibers. A number of models for the chromosome structure have been proposed, ranging from a hierarchical folding of chromatin (Manueledis, 1990) to spaghetti-like disorder (DuPraw, 1966). The favored textbook model describes the structure of the mitotic chromosome as an assembly of chromatin loop domains attached to a central protein scaffold (Paulson and Laemmli, 1977). This scaffold showed the same shape as the mitotic chromosomes and this shape was preserved even upon removal of more than 95% of the chromosomal proteins and 99% of the DNA and RNA (Adolph et al., 1977; Paulson and Laemmli, 1977).

Topoisomerase II and SclI, an SMC (Structural Maintenance of Chromosome) protein, were identified as the major components of the scaffold. About 70% of the total amount of topoisomerase II was found in the mitotic chromosome scaffold fraction (Earnshaw et al., 1985). Several reports have suggested that this enzyme might occupy discrete foci that could correspond to the base of the chromatin loop domains (Earnshaw et al., 1985; Gasser et al., 1986). It was proposed that topoisomerase II, in addition to its important enzymatic function in chromosome assembly, was a part of the structural framework of the mitotic chromosome (Earnshaw et al., 1985; Gasser et al., 1986).

The SMC proteins exist in the cell as high molecular mass complexes, one class of which is termed condensins (Hirano et al., 1997). The biochemical manipulations of extracts isolated from *Xenopus* eggs have identified two forms of condensins, 8S and 13S. The active form of condensin, condensin 13S, consists of two SMC subunits (XCAP-C and -E) and three non-SMC subunits (XCAP-D2, -G, and -H). Depletion and rescue experiments in *Xenopus* egg extracts have demonstrated that 13S condensin is required for both assembly and maintenance of mitotic chromosomes (Hirano et al., 1997).

The models reported in the literature are derived mainly from experiments using microscopy techniques. Recently, a novel and complementary approach via monitoring the changes in the elastic response was applied to study the organization of mitotic chromosomes (Houchmandzadeh and Dimitrov, 1999; Houchmandzadeh et al., 1997; Poirier et al., 2000; Poirier et al., 2002). This approach was used to investigate the structure of mechanically isolated mitotic newt chromosomes (Houchmandzadeh et al., 1997; Poirier et al., 2000; Poirier et al., 2002) and *in vitro* assembled chromosomes in extracts prepared from *Xenopus* eggs (Houchmandzadeh and Dimitrov, 1999). The experiments give interesting information on both the elasticity and the structure of mitotic chromosomes. For example, the measured elastic properties of *in vitro* assembled chromosomes allowed their structure to be modeled by a few rigid axes surrounded by a soft envelope. However, no direct data for such organization are yet available.

In this work, we report a detailed study on the structural organization of mitotic chromosomes assembled in *Xenopus* egg extract by using new approaches for investigating their elasticity. It is shown that chemical continuity of chromosomal DNA is essential for the maintenance of mitotic chromosomes. Direct experimental evidence is presented showing that the structure of the mitotic chromosome is heterogeneous and consists of a soft chromatin envelope and rigid elastic axes. SMC proteins, but not topoisomerase II, are involved in the organization of these axes. Interestingly, topoisomerase II was not found to contribute to the stiffness of the whole chromosome. The data are summarized in a model of the mitotic chromosome which explains their main structural and functional properties.

## Results

### *The chemical continuity of DNA is crucial for the maintenance of mitotic chromosome structure*

Elasticity studies have shown that native (Houchmandzadeh et al., 1997) or *in vitro* assembled (Houchmandzadeh and Dimitrov, 1999) chromosomes could be elongated by close to two orders of magnitude of their initial length without breaking. This demonstrates that a mitotic chromosome contains a very large reservoir of length, which is released gradually as a function of the applied tension. It is difficult to imagine that this peculiar property could be determined by the chromosomal proteins only. Thus, DNA and some nucleoprotein structures should be involved in these specific properties of mitotic chromosomes. If this is correct, one could expect the continuity of DNA to be essential for the maintenance of the elastic properties of the chromosomes. Hence, cleavage of chromatin DNA by nucleases would result in perturbation of the overall structure of the mitotic chromosome and loss of its stability. Moreover, the application of a small tension on the cleaved chromosome should lead to its dissolution.

To test this hypothesis a single *in vitro* assembled chromosome was digested with the deoxyribonuclease I (DNase I) and the morphological changes resulting from the enzyme cutting of chromosomal DNA were observed. The experimental approach used is described on figure 1 A. Briefly, *Xenopus* sperm demembrated nuclei were incubated in extracts isolated from *Xenopus* eggs. After about 150 minutes of incubation, well-separated mitotic chromosomes were formed (figure 1B). Since these chromosomes are free in the extract solution, they can be easily manipulated. Initially, one end of the chromosome was aspirated and fixed to a pipette. Then, the other chromosome end was fixed to an another pipette also by aspiration and some small tension was applied to the chromosome (figure 1C). Next a solution of DNase I was injected through a third pipette and the structural alterations of the chromosome were visualized by both phase contrast and fluorescence microscopy (figure 1C). After some initial decrease of the overall diameter, the chromosome breaks into two halves (figure 1C). When a buffer solution alone was injected no changes in the chromosome structure were observed (not shown, but see also figure 1E). This demonstrates that the chromosome integrity depends on the intactness of DNA.

*Chromosomal proteins, but not RNA, participate in the maintenance of mitotic chromosome structure*

It is accepted that the chromosomal proteins are important players in maintaining the mitotic chromosome structure. To investigate the degree of protein contribution in the maintenance of the structural integrity of mitotic chromosomes, a similar experiment as the one described above was carried out, substituting proteinase K for DNase I (figure 1D). After some initial decondensation, the chromosome “melts” and, after 25 seconds of digestion completely disintegrates . The melted chromosome did not exhibit any detectable elastic response (not shown). Thus, as expected, the presence of chromosomal proteins is crucial for chromosome structural organization.

Recent data have suggested a role for RNA in the maintenance of condensed heterochromatin (Maison et al., 2002). Besides, the high molecular mass *Xist* RNA is involved in the maintenance of the highly compact inactive X chromosome (Clerc and Avner, 2003). This suggests a function for RNA in stabilizing the structure of interphase chromosomes. To test if RNA plays some role in the organization of mitotic chromosomes, we treated a single chromosome with RNase in an experiment similar to that with DNase I or proteinase K. In contrast to both proteinase K or DNase I, the injection of high concentration RNase for more than 30 minutes did not affect the integrity of the chromosome (figure 1E). We conclude that RNA is unlikely to participate in the organization of mitotic chromosomes.

*Mitotic chromosomes exhibit a non-homogenous structure*

The above data demonstrate that both the DNA and chromosomal proteins are key factors in chromosome organization and structure. The chromosomal proteins and DNA might be assembled into a chromosome in different ways, thus forming either a non-homogenous or homogenous structure. Most of the available models suggest that the chromosome exhibited a non-homogenous structure. However, recent elasticity experiments have modeled the chromosomes isolated from newt as solid, elastic rods (Poirier et al., 2002). These data indicate for an essentially homogenous structure in its connectivity across the chromosome cross-section (Poirier et al., 2002; Poirier and Marko, 2002). On the other hand our studies on the elastic properties of *in vitro* assembled chromosomes fitted well with a model of chromosome exhibiting a non-homogenous structure formed of few rigid axes surrounded by a soft envelope of chromatin (Houchmandzadeh and Dimitrov, 1999). Hence, a controversy exists in the literature.

To clarify this controversy, we developed a new antibody-based micropipette technique to stretch a single chromosome and to investigate its elasticity. The classical approach uses aspiration to fix both ends of the chromosome to two micropipettes with different rigidity (figure 2 A, see also (Houchmandzadeh et al., 1997)). Once the chromosomal ends are fixed, the chromosome is stretched by moving one of the pipettes (figure 2B). The aspiration technique allows to study the elastic properties of the whole chromosome. From the force-relative extension dependence the stretch modulus (the force necessary to elongate the chromosome twice its initial length, i.e. the slope of the force-relative extension curve) can be measured. The stretch modulus is a characteristic of the underlying structure of the object. A high stretch modulus reflects the fact that a high force is needed to elongate the object.

The new technique uses antibody-coated pipettes and the “catching” of the chromosome is carried out through an antibody (figure 2A). Since an antibody against specific proteins can be used, this technique allows us to study selectively the elastic properties of mitotic chromosome domains which are associated with these proteins. If the chromosome structure is non-homogenous, one might expect different elastic responses when different antibodies (raised against proteins associated with different chromosomal domains) are used. In addition, the elastic response of the whole chromosome (when caught by aspiration) might also differ from the elastic responses of the different domains.

To study the elastic response of chromatin, we used highly specific anti-histone antibodies which allowed to fix the chromatin fibers to the pipettes. A typical force-extension dependence is shown on figure 3A. As shown the slope (the stretch modulus) of this curve is several times smaller than the slope of the force extension curve for the whole chromosome obtained when aspiration is used to fix the chromosomal ends to the pipettes (figure 3A). Histograms, presenting a summary of the stretching of 18 chromosomes with anti-histone antibodies and 11 chromosomes through aspiration are presented on figures 3B&C. The data show a peak of the stretch modulus around 30 pN when chromosome stretching was performed through the anti-histone antibodies (figure 3C). However, stretching through aspiration gave an average of the stretch modulus around 120 pN (figure 3B). Hence, higher forces are necessary to elongate the chromosome when it is fixed through aspiration to the micropipettes compared to the forces needed to stretch the chromosome when the fixation is carried out through the chromatin fibers. Therefore, the chromosomes exhibit a non-homogenous organization with a lower elastic response for the chromatin entity, i.e. mitotic chromatin shows a relatively soft structure. Bearing this in mind, one should expect the existence of chromosomal structures which are more rigid and show higher elastic response. The available data suggest that topoisomerase II, and more particularly the SMC family of proteins, might be associated with such structures (Earnshaw et al., 1985; Gasser et al., 1986; Laemmli et al., 1978; Paulson and Laemmli, 1977; Saitoh et al., 1994).

*The SMC proteins are associated with chromosome regions exhibiting higher elastic response*

To study the elastic properties of chromosomal regions associated with the SMC proteins we initially performed the following experiment. A single mitotic chromosome was fixed by aspiration between two pipettes and the chromosome was elongated and then retracted to measure its native elastic response. A small tension was then applied to the chromosome ends and a solution of the relatively weak protease (in comparison to proteinase K) trypsin was injected on the chromosome through a third pipette (see figure 1 for details). After 15 minutes, the injection of trypsin was stopped, the third pipette removed and the chromosome was stretched again to measure its elastic response (figure 4). In contrast to proteinase K or DNase I treatment, digestion with trypsin did not strongly affect the overall morphology of the chromosome (figure 4 inset 2). Indeed, after 15 minutes digestion with trypsin both the diameter and the length of the chromosome increased about twofold, but its elongated shape was preserved and no chromosome breakage was observed. Trypsin digestion, however, has a pronounced effect on the elasticity of the chromosome: the stretch modulus of the trypsin digested chromosome decreased from 3 to 4 times in different experiments (figure 4). This strongly suggests that trypsin has cleaved some proteins which play an essential role in the elastic properties of the chromosome. Since the SMC proteins were one of the primary candidates for such a role we concentrated on them. We asked if the treatment with trypsin resulted in cleavage of these proteins. Since it was impossible to carry out such experiment on a single chromosome, we carried out it with an ensemble of mitotic chromosomes that were digested with the protease under conditions similar to these of the trypsin injection experiments (for details see Materials and Methods). The western blot using anti-SMC antibody (anti-XCAP-E) of the trypsin digested chromosomes clearly shows that the SMC proteins were proteolyzed (inset (1) of figure 4). Therefore, the cleavage of the SMC proteins correlated with the reduction of the elastic response. This is indicative for a role of this family of proteins in maintaining the elasticity of mitotic chromosomes. Since the treatment with trypsin affects, however, the integrity of numerous proteins (data not shown) the decrease in the elastic response of the trypsinized chromosomes could not be attributed solely to the cleavage of the SMC proteins.

To clarify the function of the SMC proteins in the organization of the mitotic chromosomes we have carried out stretching experiments by using anti-SMC antibody (anti-XCAP-E antibody) coated pipettes. A typical force-extension curve with the anti-SMC antibody coated pipettes is presented on figure 5A (curve 1). For comparison, a force-extension curve measured with the anti-histone antibody coated pipettes is also shown (figure 5A, curve 2). Figure 5B summarizes the results of the stretching of 22 individual chromosomes using the anti-SMC antibody. The stretching modulus exhibits a very large distribution with a mean value around 180-200 pN. Note that the values of the stretch modulus of the SMC associated regions are much larger than these of the chromatin envelope and some of them are even larger than these of the chromosome when caught by aspiration. These results imply that the SMC proteins are associated with chromosomal regions with higher elasticity response.

*Topoisomerase II is not involved in the maintenance of mitotic chromosomes*

To study the involvement of topoisomerase II in the maintenance of the *in vitro* assembled mitotic chromosomes we used a peculiar property of these chromosomes: the possibility to remove topoisomerase II by increasing the ionic strength of the solution (Hirano and Mitchison, 1993). Indeed, in agreement with (Hirano and Mitchison, 1993) increasing the NaCl concentration of the solution to 100 mM led to removal of topoisomerase II (see the inset in figure 6A) but not of SMC proteins (data not shown) from the chromosomes. Treatment of the chromosomes with 100-150 mM NaCl slightly affected the overall shape of the chromosomes (data not shown, but see (Hirano and Mitchison, 1993)). The ends of a chromosome in a solution of 150 mM NaCl were fixed by aspiration to the pipettes and a force-extension cycle was carried out. The force extension-cycle of a chromosome in 150 mM NaCl was identical to that obtained in the absence of NaCl (data not shown). The stretch modulus of 7 individual chromosomes measured in a solution of 150 mM NaCl are presented on figure 6A. As seen, the values of the chromosome stretch modulus in 150 mM NaCl fall essentially in the same interval of forces as these of chromosomes in the absence of NaCl. Therefore, the elastic response of the mitotic chromosomes is not affected by the absence of topoisomerase II. Since the elastic response reflects the underlying structure of the studied object one can conclude that topoisomerase II does not participate in the maintenance of the structure of mitotic chromosomes.

To further study the structural role of topoisomerase II we have carried out a series of chromosome stretching experiments by using anti-topoisomerase II antibody coated pipettes. Figure 6B shows the summary of the data. The measured stretch moduli were similar to the stretch modulus obtained with anti-histone antibody coated pipettes (compare figure 6B with figure 3C). Hence, topoisomerase II is associated with regions showing elastic response close to that of the soft chromatin envelope.

### *Discussion*

In this work extracts from *Xenopus* eggs were used to assemble mitotic chromosomes. Since these chromosomes are easy to manipulate, this has allowed their inner organization to be studied via novel physical approaches for measuring the elasticity of a single chromosome.

*The elasticity measurements demonstrate a heterogeneous structure of the mitotic chromosomes.*

The use of either aspiration or anti-histone antibody coated pipettes, two different ways to catch the ends of a single chromosome and study its elastic response, has demonstrated that the mitotic chromosome exhibits a heterogeneous structure. Indeed, when the ends of the chromosome were grabbed by aspiration the average value of the stretch modulus was about 120 pN, while when anti-histone antibody coated pipettes were used this value was about 30 pN. The elastic response of chromatin was therefore much lower than that of the whole chromosome. This suggested that the chromosome should possess some regions with higher elastic responses. By using anti-SMC antibody coated pipettes the existence of such regions was demonstrated: the elasticity of the SMC containing chromosomal regions was found to be at least as high as that of the whole chromosome. The data are compatible with a structure of the mitotic chromosome consisting of rigid elastic cores surrounded by a soft chromatin envelope (see the model presented on figure 7B).

The results clearly show that the SMC proteins are involved in the maintenance of the elasticity of the cores since: (i) cleavage of these proteins by trypsin correlates with a reduction in the chromosome elasticity and, (ii) the SMC associated chromosomal regions are more resistant to elongation. Topoisomerase II, however, does not participate in the structural organization of the cores. Indeed, chromosomes depleted of topoisomerase II by NaCl treatment showed the same elastic response as the non NaCl treated ones and the elastic properties of the chromosomal domains containing topoisomerase II were very similar to these of the soft chromatin envelope. Interestingly, DNase I digestion demonstrated that the chemical continuity of DNA is crucial for the elastic properties of the axes and the integrity of the mitotic chromosome, in general. Therefore, the chromosome axes exhibit a specific chromatin structure where the SMC proteins are main actors.

#### *Organization of the chromosome axes.*

How are the axes organized? The analysis of the force-extension dependence of a single chromosome at high deformation could shed light on this question. As we have shown in the past an irreversible transition in the structure of the whole chromosome (caught by aspiration) was observed at high deformation (Houchmandzadeh and Dimitrov, 1999). Upon successive deformation cycles with a gradual increase of the extension, the chromosome was softened and for each subsequent cycle a lower force was necessary to be used to reach the same extension (see figure 5 in (Houchmandzadeh and Dimitrov, 1999)). The same type of elastic behavior of the chromosome at high deformation was observed when anti-SMC antibody coated pipettes were used (data not shown). This is not surprising because the elasticity of the whole chromosome is determined mainly by the elasticity of the rigid axes. The above type of elastic behavior is well described by a modular type of structure of the axes (Houchmandzadeh and Dimitrov, 1999). Since the SMC proteins are associated with the axes one could imagine that a single module of the axis contains one or several SMC (condensin) protein complexes. Given that the two coiled-coiled domains of the SMC proteins are organized around a structurally flexible hinge (Melby et al., 1998), the elastic response of the chromosome could reflect at least partially the elasticity of the hinge.

What is the role of the axes in the mitotic chromosome structure? We suggest that the axes, in addition to maintaining the elasticity of mitotic chromosomes, might be essential for determining the rod-like shape of mitotic chromosomes. Since the SMC proteins are associated with the chromosome axes one should expect them to be involved in this event. If this is correct, a perturbation of the interaction of condensins with the axes would affect the shape of the chromosomes. And in fact, this is the case: when anti-SMC antibody (an antibody against an *Xenopus* SMC protein, XCAP-C) was added to *in vitro* assembled mitotic chromosomes, they lost their rod-like shape and were converted into a shapeless chromatin mass (data not shown, but see also figure 5 of (Hirano and Mitchison, 1994)). Interestingly, the volume of this chromatin shapeless mass seems to be not greater than 3-4 times that of the one of the mitotic chromosome. This result is in complete agreement with the trypsin digestion data of a single chromosome presented on figure 4. Indeed, upon trypsin treatment for 10 minutes the increase of the chromosome volume is not greater than 5-6 times that of the chromosome before injection of trypsin (figure 4, inset 2 and data not shown). The elongated shape of the digested chromosome was preserved due to the small tension applied to its both ends. Upon trypsin digestion, however, in addition to the SMC proteins many other chromosomal proteins were cleaved (data not shown). Thus, the above described increase of the volume of the trypsinized chromosome should also reflect the contribution of these proteins in maintaining the compact state of the mitotic chromosome. Hence, presence of the SMC proteins would not affect significantly the overall compaction of the mitotic chromosomes.

*Mechanism of mitotic chromosome assembly.*

How do the chromosomes assemble during mitosis? Based on the above the condensation process should necessitate the presence of the axes. One should also bear in mind that about half of the DNA phosphate groups are not neutralized in interphase chromatin (Smirnov et al., 1988) and that association of bivalent and polyvalent cations with chromatin results in its higher compaction (Smirnov et al., 1988; Widom, 1986). In addition, a recent ion microscopy study reported that the bivalent ions  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  are implicated in higher order mitotic chromosome structure through electrostatic neutralization (Strick et al., 2001). Indeed, in mitosis the amounts of  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  bound to chromosomes were found to drastically increased compared to these bound to interphase chromatin (Strick et al., 2001).

Since the majority of condensins are not active in interphase, the axes would be formed during G2/M in a process requiring active condensin complexes associated with the chromosome (figure 7A). This process would lead to some condensation of the chromosome which would consist mainly in spatial chromatin fiber reorganization in space without substantial compaction of the chromatin. As a result the chromosome would adopt an elongated shape. The higher chromatin compaction would be dictated rather by the higher amount of the bivalent ions  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  which bind to chromatin at mitosis (Strick et al., 2001). In agreement with this, upon antibody inactivation of the condensin complexes (Hirano and Mitchison, 1994) or cleavage of SMC proteins with trypsin (this work) a relatively modest effect on the overall compaction of the chromosome is detected. Besides, removal of bivalent ions leads to impressive chromosome decondensation (Strick et al., 2001). Thus, the condensin complexes could be viewed as organizers of correct chromosome condensation, while the chromatin compaction would be to a greater extent carried out by the increased amounts of bivalent cations bound to mitotic chromatin (figure 7A). Such a scenario seems reasonable because it is not otherwise easy to explain how the limited number of condensin complexes alone (one active 13S condensin complex per about 10-20 kb of DNA) could be able to condense chromatin (Kimura et al., 1999).

Our data are summarized in a model of the structure of mitotic chromosome presented in figure 7B. The chromosome is described as an assembly of a soft chromatin envelope associated with rigid elastic axes. It differs from the favored scaffold hypothesis that requires a proteinaceous core existing at all stages of the cell cycle and fulfilling the role of a skeleton that supports the chromatin loops (Saitoh and Laemmli, 1994). The model implies that the axes are not static structures, but that instead they are assembled at mitosis upon the action of active condensin complexes as suggested in a recent very comprehensive review (Nasmyth, 2001). Such organization of the mitotic chromosomes will allow recombination to occur and the axes to be easily formed *de novo*.

#### *Embryonic versus somatic chromosomes*

Our experimental results clearly demonstrate a heterogenous structure of the mitotic chromosomes assembled in *Xenopus* egg extract. Poirier and co-authors, however, have carried out stretching experiments on newt chromosomes by using the aspiration technique to catch the chromosome ends (Poirier et al., 2000; Poirier et al., 2002). They have reported that these chromosomes could be described as homogenous elastic rods (Poirier et al., 2002).

This difference might reflect the fact that two different objects were studied by the two groups: somatic chromosomes isolated by micromanipulations of newt cells in one case and *in vitro* assembled chromosomes in extracts isolated from *Xenopus* eggs in the other. Indeed, the *in vitro* assembled chromosomes could be viewed as the very first embryonic *Xenopus* chromosomes. These chromosomes would be built in a way to accommodate to the rapid divisions (30 minutes each) of the very early *Xenopus* embryo, i.e. they should be easier and more rapidly replicated and repaired. A reasonable way to do this is to keep the chromatin envelope very soft. However, during *Xenopus* development after the mid-blastula transition when the duration of the cell divisions is increased, the chromatin envelope might be made more rigid and in somatic cells the chromosomes might thus be converted into homogenous objects. This conversion could be simply done by using agents that link the chromatin envelope. In other words, the somatic chromosomes could be viewed as matured embryonic chromosomes exhibiting a rigid chromatin envelope. If this is true, the stretch modulus of a newt chromosome should be the same when measured by using anti-histone antibody or anti-SMC antibody coated pipettes.

If the above hypothesis for maturation of chromosomes during development is correct the use of *in vitro* assembled chromosomes provides an excellent opportunity to study the structure of mitotic chromosomes. Indeed, only in this case the mitotic chromosome structure is “opened” for deeper understanding of the inner chromosome organization by using elasticity measurements.

## *Experimental procedures*

### *Preparation of mitotic extracts*

*Xenopus* egg extracts were prepared mainly by using the protocol of Losada et al. (2000) (Losada et al., 2000). Briefly, after removal of the jelly by cysteine treatment, the eggs were resuspended in XBE2 buffer (100 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM K-HEPES, pH 7.7, 5 mM K-EGTA, 0.05 M sucrose) supplemented with protease inhibitors (10 mg/ml of leupeptin and apoprotin) and 100 mg/ml of cytochalasin D. The eggs were crushed by centrifugation at 16°C (20 minutes at 15000 rpm in an SW41 rotor, Beckman Instruments). The cytoplasmatic fraction was collected by puncturing the side of the tube with a 1 ml syringe and leupeptin, apoprotin and cytochalasin D (at final concentration of 10 mg/ml) and 1/20 volume of 20 X energy mix (20 mM phosphocreatine, 2 mM ATP, and 5 mg/ml creatine kinase, final concentration) were added to it. Then the crude extract was transferred to 2 ml tubes used for a TLS-55 rotor (Beckman Instruments) and spun at 52 000 rpm for 2 hours at 4°C. The lipid layer was removed carefully with a help of a vacuum and the golden layer fraction was recentrifuged under the same conditions, for 45 minutes. The supernatant was collected, aliquoted in 25 ml fractions and frozen in liquid nitrogen. The extract was stored at –80°C.

### *Isolation of Xenopus demembranated sperm nuclei and chromosome assembly*

*Xenopus* demembranated sperm nuclei were prepared as described in (de la Barre et al., 1999). The demembranated sperm was stored at –80°C and thawed immediately before use. The assembly of mitotic chromosomes was performed according to the protocol described in (de la Barre et al., 2000).

### *Chromosome micromanipulations*

The chromosome micromanipulations were carried out using the device previously described (Houchmandzadeh and Dimitrov, 1999). After completion of the chromosome assembly reaction, 5 ml of the reaction were transferred in a small reservoir containing 300 ml of EB (80 mM B-glycerophosphate, pH 7.3, 20mM EGTA, 15 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM DTT; in some experiments the MgCl<sub>2</sub> was omitted). Then the ends of a single chromosome were grabbed by two pipettes either trough aspiration or by antibody adhesion. The micropipettes used had an inner diameter of 1 µm and were prepared by using a puller (Sutter P-97). One of the pipettes was fixed and a motion was imposed on the second pipette. The simultaneous measurements of the end-to-end distance between the pipettes (the length of the extended chromosome) and the deflection of the fixed pipette allowed the determination of the stretch modulus, i.e. the force necessary to stretch the chromosome twice its initial length (Houchmandzadeh and Dimitrov, 1999).

Three different antibodies were used for the pipette's coating: anti-histone antibody (panhistone antibody, Boehringer Mannheim), immunopurified anti-XCAP-E antibody generated against the C-terminus peptide of XCAP-E (Hirano et al., 1997) and immunopurified polyclonal anti-*Xenopus* topoisomerase II antibody (Hirano and Mitchison, 1993). The pipettes were incubated overnight at 4°C in a solution of PBS, 0.02% NaN<sub>3</sub>, containing 1mg/ml of the respective antibody. The specificity of the anchorage of the chromosome to the antibody-coated pipettes was tested by using either non-antibody-, or anti-nucleoplasmin antibody- (nucleoplasmin is a very abundant protein present in the extract that does not associate with the mitotic chromosomes) or BSA-coated pipettes. In all three cases no attachment of the chromosomes to the pipettes was observed.

### *Topoisomerase II depletion of mitotic chromosomes.*

The topoisomerase II depletion of the *in vitro* assembled mitotic chromosomes was carried out as described by Hirano and Mitchison (Hirano and Mitchison, 1993). After completion of the chromosome assembly reaction, 5 ml of the reaction was transferred to the chromosome stretching chamber, which contained 300 ml of EB solution and 150 mM NaCl and the stretching was carried out. To test if the increase of the ionic strength removes topoisomerase II, a chromosome assembly reaction was brought to 100-200 mM NaCl, the chromosomes were pelleted by centrifugation on a bench-top centrifuge. The pellet was washed with EB containing NaCl at 100-200 mM concentration and used for immunoblotting. The immunoblotting was carried out following a previously described procedure (de la Barre et al., 2000) and using an immunopurified anti-*Xenopus* topoisomerase II antibody (Hirano and Mitchison, 1993).

### *Enzymatic-Micromechanical experiments*

To study the role of nucleic acids or proteins in the maintenance of the mitotic chromosome structure, a series of combined enzymatic-micromechanical experiments was carried out. A typical experiment was performed as follows. A single chromosome was caught by the two pipettes through aspiration and a small tension was applied. Then a third micropipette which contains the enzyme was moved near the chromosome and the enzyme solution was sprayed onto it while maintaining the tension. Phase-contrast and fluorescence images were acquired through a CCD camera and recorded on a VCR. In some experiments the elastic response of both the intact (before injection of the enzyme) and the digested chromosome was measured.

Four different enzymes, namely Dnase I (10 units/ml, Boehringer Mannheim), RNase A (500 µg/ml, Sigma), proteinase K (1mg/ml, Sigma) and trypsin (50 µg/ml, Sigma) were used for spraying. It should be noted that the actual concentration of the sprayed enzyme on the chromosome was decreased roughly by a factor of roughly 2-3 as compared to that within the pipette as judged by experiments with fluorescent dyes (data not shown). When the spraying onto the chromosome was stopped, the enzymatic reaction arrests immediately due to the diffusion-mediated dissipation of the enzyme. In the case of the spraying of trypsin, the changes in the morphology and the elastic response of the chromosome due to the trypsin digestion were correlated with the SMC protein cleavage. Since it was not possible to visualize the degree of protein cleavage on a single chromosome, the digestion of a multitude of chromosomes by trypsin in conditions similar of these for a single chromosome was studied. Briefly, a chromosome assembly reaction was appropriately diluted with EB (see Chromosome Micromanipulations), trypsin was added at concentration 50 mg/ml and the digestion was allowed to proceed for the appropriate time at room temperature. The chromosomes were then pelleted for 30 seconds on a bench top centrifuge, the pellet washed very quickly with ice-cold EB and recentrifuged for 15 seconds. After removal of the EB solution, the trypsin-digested chromosomes were immediately resuspended in SDS electrophoresis loading buffer and heated at 96°C for five minutes. The chromosomal proteins were separated on a 8% polyacrylamide gel containing SDS. The immunoblotting was carried out by using immunopurified anti-SMC protein (anti-XCAP-E, (Hirano et al., 1997)) antibody. It should be noted that in the different trypsin digestion experiments a complete cleavage of the SMC proteins was observed after 2-4 minutes since the onset of digestion reaction.

Added in proof. When this paper was in preparation a manuscript was published showing that upon digestion with micrococcal nuclease or restriction enzymes an individual newt chromosome is dissolved (Poirier and Marko, 2002). These results are in complete agreement with our data on the digestion with DNase I of *in vitro* assembled chromosomes.

## **References**

Adolph, K. W., Cheng, S. M., and Laemmli, U. K. (1977). Role of nonhistone proteins in metaphase chromosome structure. *Cell* 12, 805-816.

Clerc, P., and Avner, P. (2003). Multiple elements within the Xic regulate random X inactivation in mice. *Semin Cell Dev Biol* 14, 85-92.

de la Barre, A.-E., Gerson, V., Gout, S., Creaven, M., Allis, C. D., and Dimitrov, S. (2000). Core histone N-termini play an essential role in mitotic chromosome condensation. *EMBO J* 19, 379-391.

de la Barre, A.-E., Robert-Nicoud, M., and Dimitrov, S. (1999). Assembly of mitotic chromosomes in *Xenopus* egg extract. In *Chromatin Protocols*, P. Becker ed. (Humana Press) 119, 219-229.

DuPraw, E. J. (1966). Evidence for a 'folded-fibre' organization in human chromosomes. *Nature* 209, 577-581.

Earnshaw, W. C., Halligan, B., Cooke, C. A., Heck, M. M. S., and Liu, L. F. (1985). Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds. *J Cell Biol* 100, 1706-1715.

Gasser, S. M., Laroche, T., Falquet, J., Boy de la Tour, E., and Laemmli, U. K. (1986). Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II. *J Mol Biol* 188, 613-629.

Hirano, T., Kobayashi, R., and Hirano, M. (1997). Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a *Xenopus* homolog of the Drosophila Barren protein. *Cell* 89, 511-521.

Hirano, T., and Mitchison, T. J. (1993). Topoisomerase II does not play a scaffolding role in the organization of mitotic chromosomes assembled in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol* 120, 601-612.

Hirano, T., and Mitchison, T. J. (1994). A heterodimeric coil-coil protein required for mitotic chromosome condensation *in vitro*. *Cell* 79, 449-458.

Houchmandzadeh, B., and Dimitrov, S. (1999). Elasticity measurements show the existence of a thin rigid core inside mitotic chromosomes. *J Cell Biol* 145, 215-223.

Houchmandzadeh, B., Marko, J. F., Chatenay, D., and Libchaber, A. (1997). Elasticity and structure of eukaryote chromosomes. *J Cell Biol* 139, 1-12.

Kimura, K., Rybenkov, V. V., Crisona, N. J., Hirano, T., and Cozzarelli, N. R. (1999). 13S condensin actively reconfigures DNA by introducing global positive writhe: implication for chromosome condensation. *Cell* 98, 239-248.

Laemmli, U. K., Cheng, S. M., Adolph, K. W., Paulson, J. R., Brown, J. A., and Baumbach, W. R. (1978). Metaphase chromosome structure: the role of nonhistone proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 42, 351-360.

Losada, A., Yokochi, T., Kobayashi, R., and Hirano, T. (2000). Identification and characterization of SA/Scs3p subunits in the *Xenopus* and human cohesin complexes. *J Cell Biol* 150, 405-416.

Maison, C., Bailly, D., Peters, A. H., Quivy, J. P., Roche, D., Taddei, A., Lachner, M., Jenuwein, T., and Almouzni, G. (2002). Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat Genet* 30, 329-334.

Manueledis, L. (1990). A view of interphase chromosome. *Science* 250, 1533-1540.

Melby, T. E., Ciampaglio, C. N., Briscoe, G., and Erickson, H. P. (1998). The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long antiparallel coiled coils, folded at flexible hinge. *J Cell Biol* 142, 1595-1604.

Nasmyth, K. (2001). Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu Rev Genet* 35, 673-745.

Paulson, J. R., and Laemmli, U. K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12, 817-828.

Poirier, M., Eroglu, S., Chatenay, D., and Marko, J. F. (2000). Reversible and irreversible unfolding of mitotic newt chromosomes by applied force. *Mol Biol Cell* 11, 269-276.

Poirier, M. G., Eroglu, S., and Marko, J. F. (2002). The bending rigidity of mitotic chromosomes. *Mol Biol Cell* 13, 2170-2179.

Poirier, M. G., and Marko, J. F. (2002). From the Cover: Mitotic chromosomes are chromatin networks without a mechanically contiguous protein scaffold. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15393-15397.

Saitoh, N., Goldberg, I. G., Wood, E. R., and Earnshaw, W. C. (1994). ScII: an abundant chromosome scaffold protein is a member of a family of putative ATPases with an unusual predicted tertiary structure. *J Cell Biol* 127, 303-318.

Saitoh, Y., and Laemmli, U. K. (1994). Metaphase chromosome structure: band arises from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell* 76, 609-622.

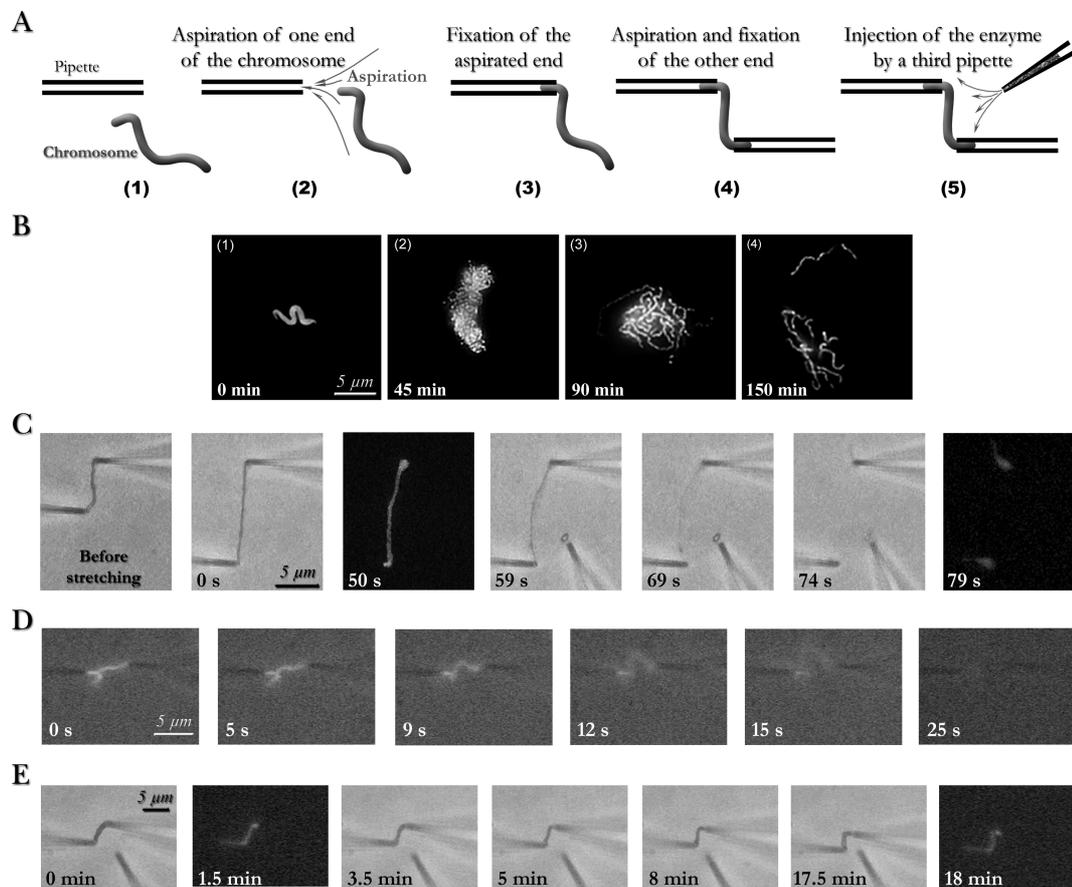
Smirnov, I. V., Dimitrov, S. I., and Makarov, V. L. (1988). Polyamine-DNA interactions. Condensation of chromatin and naked DNA. *J Biomol Struct Dyn* 5, 1149-1161.

Strick, R., Strissel, P. L., Gavrilov, K., and Levi-Setti, R. (2001). Cation-chromatin binding as shown by ion microscopy is essential for the structural integrity of chromosomes. *J Cell Biol* 155, 899-910.

Widom, J. (1986). Physicochemical studies of the folding of the 100 A nucleosome filament into the 300 A filament. Cation dependence. *J Mol Biol* 190, 411-424.

Woodcock, C. L., and Dimitrov, S. (2001). Higher-order structure of chromatin and chromosomes. *Curr Opin Genet Dev* 11, 130-135.

Figures

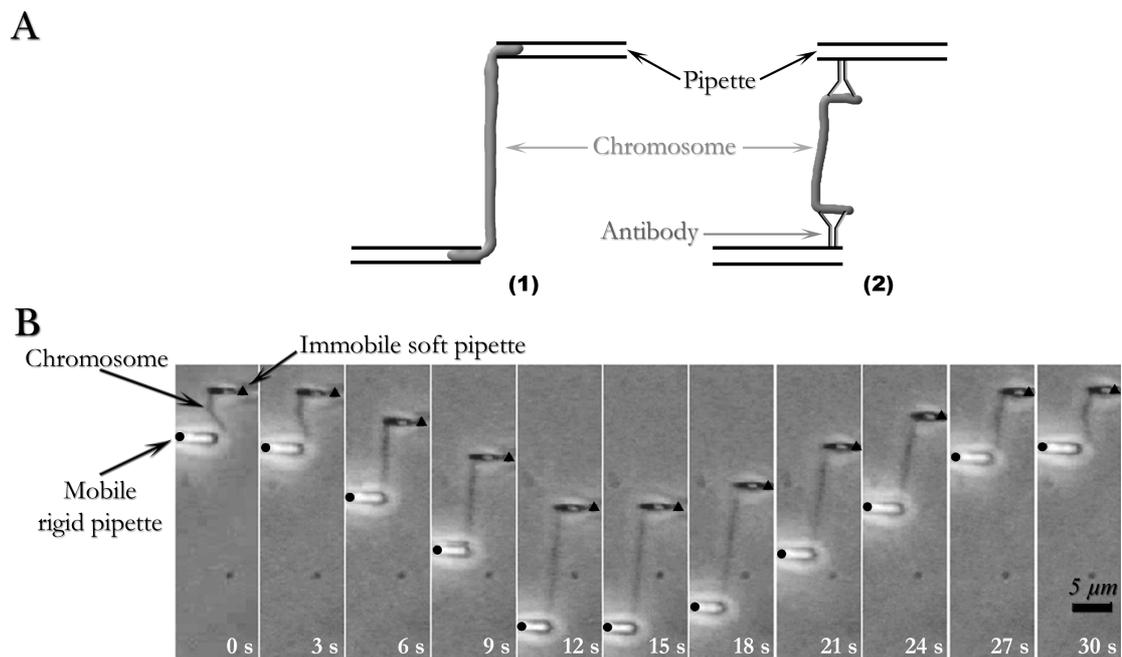


**Publication n°2 -Figure VII.1 : The continuity of DNA is essential for the maintenance of the structure of mitotic chromosomes**

(© 2003, Sébastien Almagro, Stefan Dimitrov, Daniel Riveline et Bahram Houchmandzadeh.)

Mitotic chromosomes were assembled in *Xenopus* egg extract and the ends of an individual chromosome were caught by two micropipettes. Slight tension was applied to the chromosome and a solution of either DNase I, proteinase K or RNase A was injected. **(A)** A drawing showing the successive steps in chromosome catching by aspiration with two micropipettes and the injection of the enzyme with a third pipette. **(B)** Assembly of chromosomes in mitotic extract isolated from *Xenopus* eggs. Demembranated sperm nuclei were incubated into the extract for the times indicated and the condensation intermediates were fixed and stained with Hoescht 33258.

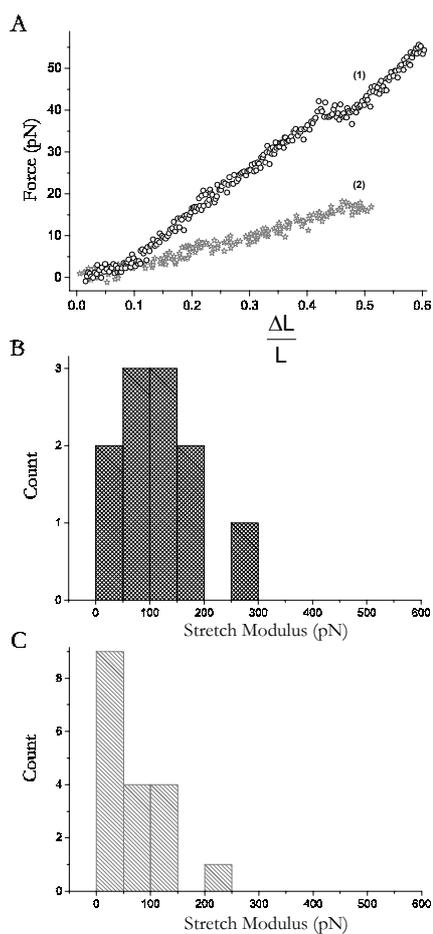
**(C)** Digestion of a single mitotic chromosome with DNase I. A series of phase and fluorescence images of the chromosome during DNase I digestion is shown. The time at which each image was taken after the onset of digestion is indicated. After 74 seconds of digestion the chromosome breaks demonstrating that DNA intactness is crucial for chromosome integrity. **(D)** Visualization of the effect of proteinase K digestion on the integrity of an individual chromosome. A solution of proteinase K was injected on an individual chromosome. The time at which each image was taken is given. Fluorescence images are shown only. **(E)** Same as (D), but for RNase A.



### Publication n°2 - Figure VII.2

(© 2003, Sébastien Almagro, Stefan Dimitrov, Daniel Riveline et Bahram Houchmandzadeh.)

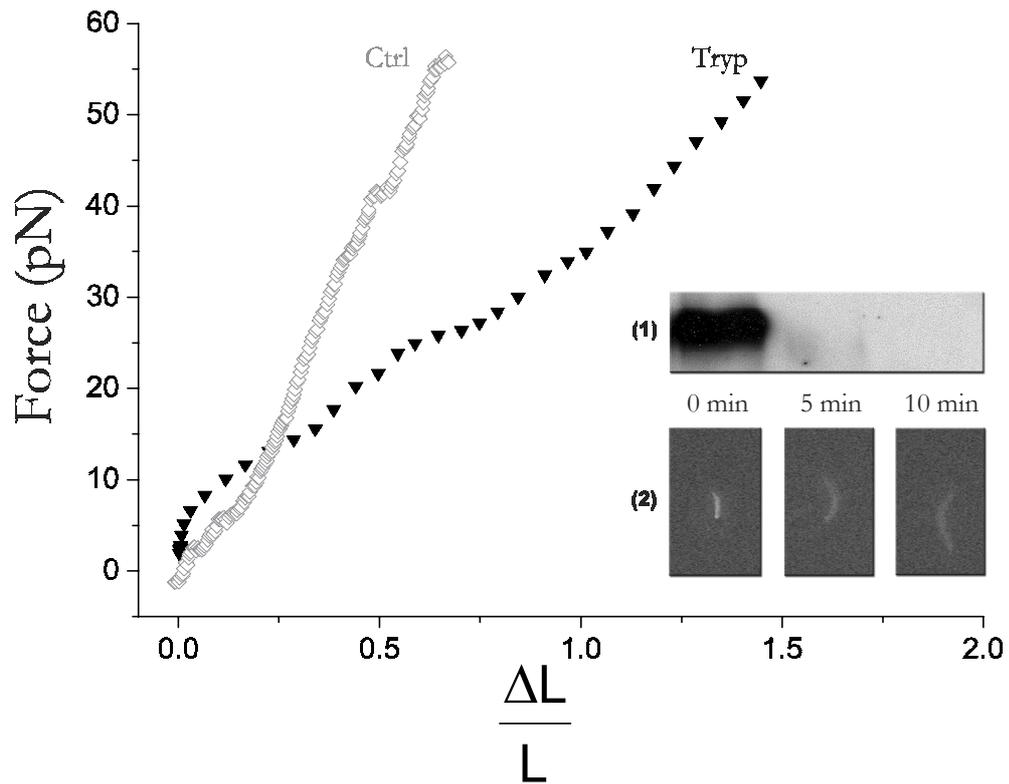
**(A)** Schematic presentation of the two techniques used for “catching” an individual chromosome. The aspiration technique (1) allows to catch the whole chromosome and respectively to measure the elasticity of the chromosome as a whole while by antibody adhesion (2) the elasticity response of specific chromosomal domains containing the protein of interest can be studied. **(B)** A typical force-extension cycle for a single chromosome. The ends of the chromosome were caught by aspiration using two different micropipettes. The upper pipette was flexible (with a spring constant within the pN  $\mu\text{m}^{-1}$  range) and immobile, while the lower one was rigid (spring constant within the nN  $\mu\text{m}^{-1}$  range) and mobile. The chromosome was stretched by moving the lower pipette to obtain the desired extension and after a pause of few seconds the constraint was relaxed with the same velocity. Deflection of the upper pipette provoked by the motion of the lower one yielded the force applied on the chromosome.



**Publication n°2 – Figure VII.3 : Elasticity measurements reveal a non-homogenous structure of mitotic chromosomes**

(© 2003, Sébastien Almagro, Stefan Dimitrov, Daniel Riveline et Bahram Houchmandzadeh.)

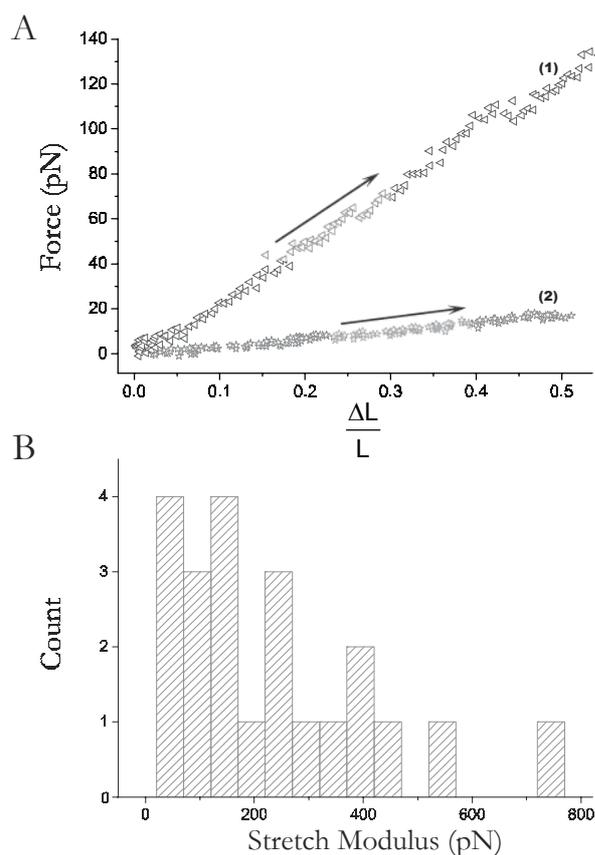
**(A)** Two typical force to deformation curves for individual mitotic chromosomes obtained through aspiration (1) and anti-histone antibody adhesion (2).  $\Delta L/L$  is the elongation induced by the force. Note the large difference in the slope (the stretch modulus) of both curves. **(B)** A histogram summarizing the measurements of the stretch modulus of 11 individual chromosomes by the aspiration technique. The ordinate designates the number of chromosomes studied while on the abscissa are noted the measured stretch modulus. **(C)** Same as (B), but for the measured stretch modulus of 18 individual chromosomes by the anti-histone antibody adhesion technique.



**Publication n°2 - Figure VII.4 : Cleavage of SMC proteins with trypsin correlates with a decrease of the chromosome elastic response**

(© 2003, Sébastien Almagro, Stefan Dimitrov, Daniel Riveline et Bahram Houchmandzadeh.)

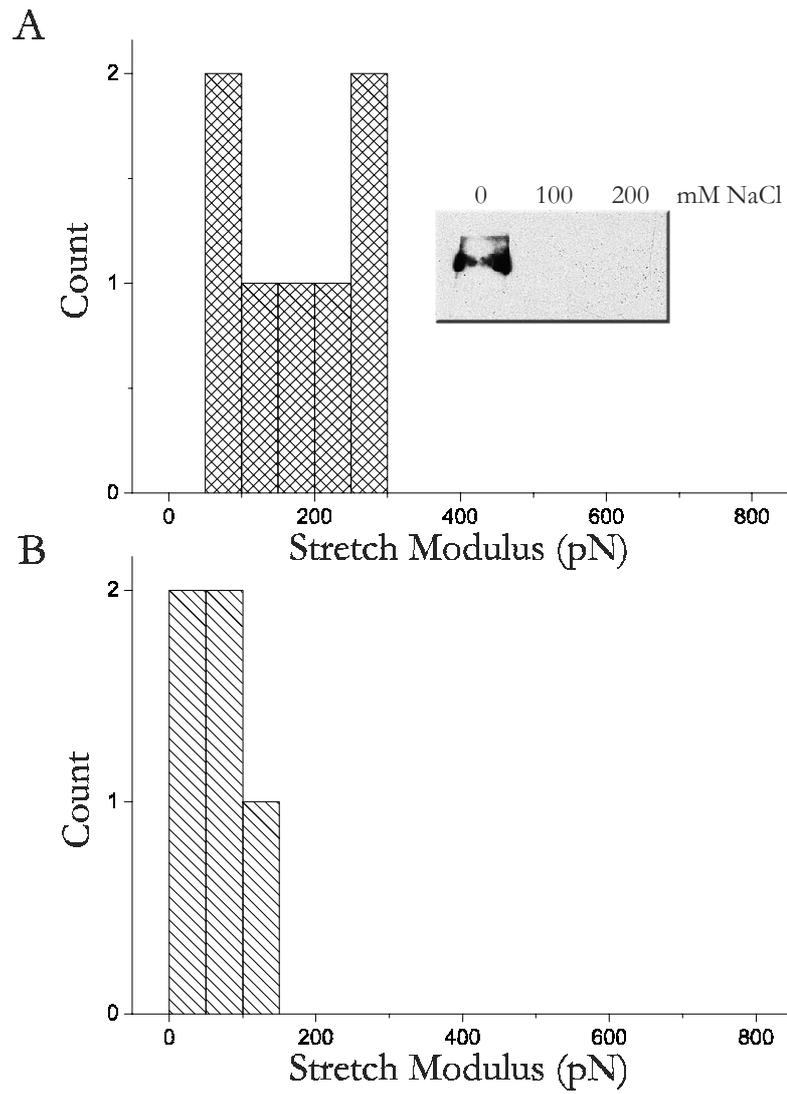
A chromosome was suspended between two micropipettes and it was subjected to an extension–retraction cycle to measure its elastic response. Then the chromosome was relaxed, a slight tension was applied to its both ends and trypsin at a concentration of 50 mg/ml was injected by a third micropipette as described in figure 1. After 15 minutes the trypsin injection was stopped and the chromosome was stretched again (curve Tryp). Curve Ctrl shows the elastic response of the same chromosome before digestion with trypsin. On the inset (1) is shown the western blot using anti-SMC antibody of non-digested and digested with trypsin (50 mg/ml for 5 and 10 minutes) mitotic chromosomes (for details see Materials and Methods). Inset (2) shows the changes in the chromosome structure after digestion with trypsin for 5 and 10 minutes, respectively. Fluorescence images only are presented.



**Publication n°2 - Figure VII.5 : The chromosome domains containing SMC proteins exhibit higher elastic response**

(© 2003, Sébastien Almagro, Stefan Dimitrov, Daniel Riveline et Bahram Houchmandzadeh.)

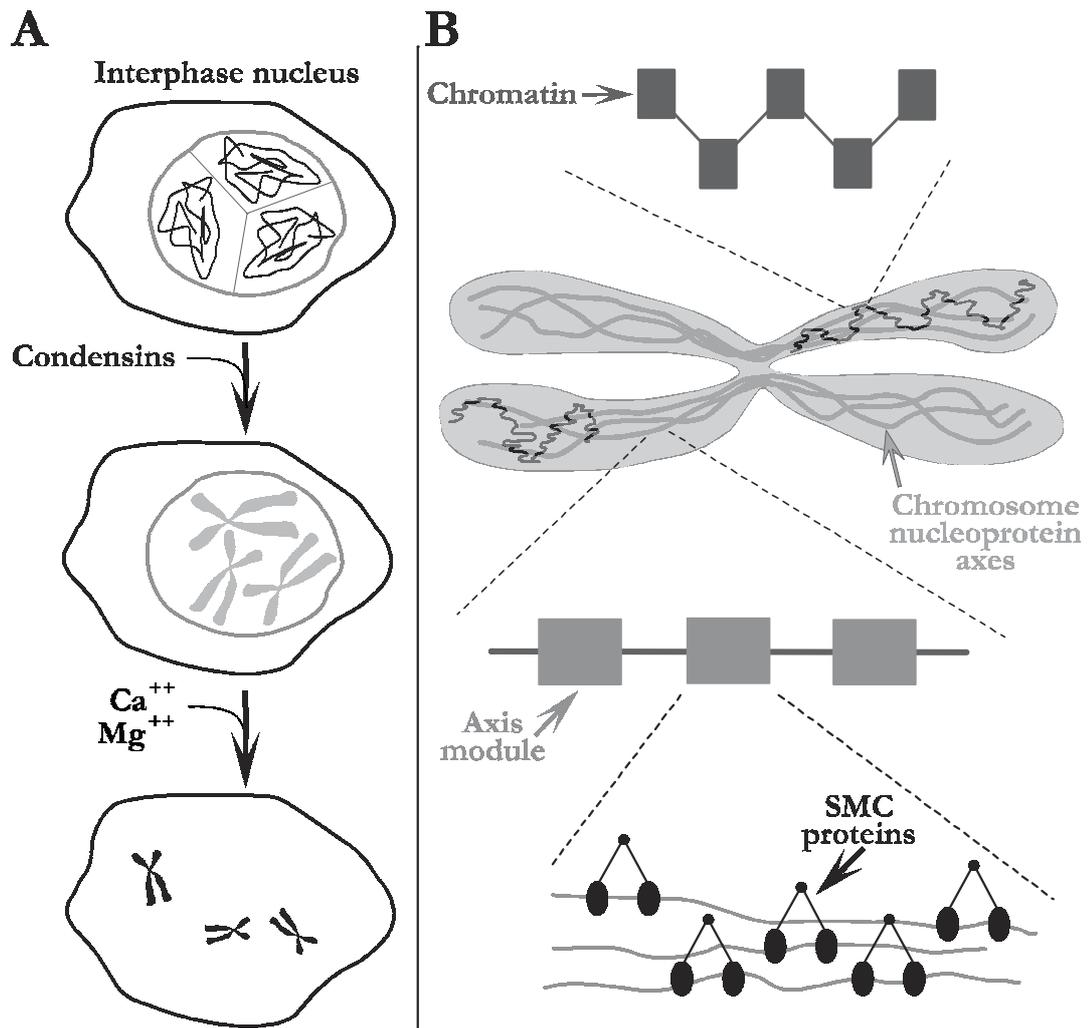
**(A)** Typical force to deformation curves for individual chromosomes obtained through either anti-SMC (anti-XCAP-E) antibody (1) or anti-histone antibody adhesion. Note the difference in the slopes of the two curves. **(B)** A histogram showing the stretch modulus of 22 individual chromosomes. The measurements were carried out by using the antibody adhesion technique with an anti-SMC antibody. The mean value of the stretch modulus was 220 pN.



**Publication n°2 - Figure VII.6 : Topoisomerase II is not involved in the maintenance of the mitotic chromosomes**

(© 2003, Sébastien Almagro, Stefan Dimitrov, Daniel Riveline et Bahram Houchmandzadeh.)

**(A)** A histogram summarizing the measurements of the stretch modulus of 7 chromosomes in a solution 150 mM NaCl. The measurements were performed by using the aspiration technique. The average stretch modulus was 180 pN. The inset is a western blot with anti-topoisomerase II antibody of control and 100 mM or 200 mM NaCl treated mitotic chromosomes. The chromosome solution was brought to 100 or 200 mM NaCl and then the chromosomes were pelleted. The pellet was loaded on a 10% polyacrylamide gel and a western blot was performed using anti-topoisomerase antibody. Note that 100 mM NaCl is sufficient to remove topoisomerase II from the *in vitro* assembled chromosomes. **(B)** The stretch modulus of 5 individual chromosomes measured by the antibody adhesion technique using an anti-topoisomerase II antibody. The average stretch modulus was 60 pN.



Publication n°2 - Figure VII.7

(© 2003, Sébastien Almagro, Stefan Dimitrov, Daniel Riveline et Bahram Houchmandzadeh.)

**(A)** A schematic describing the process of mitotic chromosome assembly. The active condensin complexes bind to chromosomes at the G2/M. This binding results in the adoption by the chromosome of a rod-like shape and in some chromosome condensation. The neutralization of the DNA phosphates by the interaction with  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  ions leads to the extreme compaction of mitotic chromatin. **(B)** A model of the mitotic chromosome structure built on elasticity measurements. The chromosome is presented as an assembly of rigid elastic axes surrounded by a soft chromatin envelope. The SMC proteins belong to the axes and they are essential for maintaining axis elasticity. The axes exhibit a modular structure. Each module shows a specific nucleoprotein structure and contains one or several condensin complexes as well as other chromosomal proteins associated with DNA. The axes are dynamic structures which are assembled at the onset of mitosis upon the binding of active condensin complexes to chromatin and are disassembled upon exit from mitosis.

## **VIII. Conclusions et perspectives.**

### **1. Etat de condensation de la chromatine chromosomique**

Nous mesurons un stretch modulus d'environ 30 pN pour la chromatine (cf. p193). Il est donc nécessaire d'appliquer une force de 30 pN pour doubler la longueur du chromosome. Lorsque nous effectuons cette mesure, nous pensons qu'un grand nombre de fibres de chromatines sont collées à la pipette et ainsi étirées conjointement. C'est donc la résistance à l'étirement de cet *ensemble* que nous mesurons.

La première question que l'on peut se poser à la vue de ces résultats, est « sur quoi tirons-nous ? ». A la vue de la surface du chromosome (Figure V.9-B, p30), le plus vraisemblable est que les pipettes fonctionnalisées par les anticorps anti-histones s'accrochent à ces boucles de chromatine chromosomique. Il est fort possible que, d'une expérience à l'autre, nous ne tirions pas sur le même nombre de fibres chromatiniennes. La section du chromosome saisie ( $\sim 0,5 \mu\text{m}^2$ ) est très grande par rapport à la taille des fibres. Nous pensons donc qu'un très grand nombre de fibres sont étirées en même temps et que la variation, d'une expérience à l'autre, du nombre de fibres saisies n'excède pas quelques pourcent. La différence de mesure qui devrait être observée est alors noyée dans le bruit de mesure (10 % d'incertitude en valeur absolue).

Les chromosomes mitotiques assemblés *in vitro* de *Xénope* présentent la même quantité d'ADN, les mêmes dimensions et la même composition que les chromosomes *in vivo*. Il a toujours été suggéré, dans la littérature, que la chromatine chromosomique devait être compacte pour tenir en si peu de volume. En comparaison, la force nécessaire pour « déplier » un seul nucléosome (Bennink, 2001 ; Brower-Toland, 2002) est de l'ordre de la dizaine de piconewtons. La force nécessaire, pour observer la transition de phase B-S de l'ADN (Cluzel, 1996), est d'environ une soixantaine de piconewtons. Nous observons que la résistance à l'étirement de la chromatine chromosomique présente une résistance à l'étirement du même ordre de grandeur que le dépliement d'un nucléosome. Comme indiqué dans le paragraphe précédent, nous pensons que nous tirons en même temps sur un très grand nombre de fibres. Si nous déplions en parallèle un très grand nombre de nucléofilaments, nous nous attendrions à mesurer une plus grande résistance à l'étirement. De plus, nous n'observons pas de dénaturation de la chromatine lors de l'étirement. Tout ceci laisse penser qu'en étirant la chromatine nous mesurons des interactions entre niveaux d'organisation supérieurs de la chromatine. Par exemple, ces niveaux d'organisation supérieurs pourraient être les interactions qui unissent les boucles de chromatine les unes aux autres ou celles qui unissent la fibre de 30 nm.

Nous avons aussi pu mesurer la résistance de la chromatine chromosomique à 150 mM NaCl (cf. courbe en annexe : Figure XII.1, p235). Nous observons dans ces conditions salines que la résistance à l'étirement de la chromatine du chromosome mitotique augmente de 400 % ( $SM \sim 120$  pN). Vraisemblablement, ce phénomène relève d'une meilleure neutralisation des groupements phosphates de l'ADN chromatinien. De cette neutralisation résulterait une diminution de la répulsion électrostatique entre les fibres de chromatine permettant ainsi une compaction de la chromatine.

## **2. Le maintien du chromosome est assuré par un complexe ADN-protéines**

Nos expériences de micro-injections couplées à des mesures d'élasticité montrent que les protéines et l'ADN sont nécessaires au maintien du chromosome (cf. p170). Il y a quand même une nuance entre la digestion de l'ADN et celle des protéines : la digestion de l'ADN casse le chromosome en deux parties bien visibles, et la digestion des protéines le fait « fondre » (perte de tout maintien). Les expériences de micro-injection de RNase montrent que l'ARN ne joue *aucun* rôle de maintien de l'organisation du chromosome mitotique.

Des résultats ont montré un rôle de l'ARN dans le chromosome interphasique (Maison, 2002 ; Clerc et Avner, 2003). Nos résultats excluent un rôle de maintien de l'ARN dans le chromosome mitotique, mais ne préjugent en rien sur son rôle en interphase.

## **3. La topoisomérase II ne joue pas de rôle de maintien de l'organisation du chromosome**

Les expériences de mesures d'élasticité en présence de 150 mM NaCl montrent que la présence de la topoisomérase II n'est pas requise pour conserver l'organisation et la résistance à l'étirement des chromosomes (cf. p176). Certes, elle est nécessaire pour former les chromosomes et y est abondante, mais la topoisomérase II se limite à ce rôle. Si elle avait aussi une fonction de charpente, comme décrite dans le modèle « loops + scaffold » (cf. V.3.c p39), sa disparition devrait avoir un effet notable sur son élasticité, ce qui n'est pas le cas. De plus, les mesures d'élasticité obtenues par fonctionnalisation des pipettes par l'anticorps anti-topoisomérase II (cf. Publication n°2 - Figure VII.6-B) montrent qu'elle est localisée dans la chromatine. Tout cela corrobore le dernier résultat obtenu par microscopie à ce sujet (Hirano et Mitchison, 1993) et exclut divers résultats précédents (Earnshaw, 1985), notamment ceux obtenus par les détracteurs du modèle « loops + scaffold ».

#### **4. Organisation duale des chromosomes**

Nous avons pu observer que le chromosome possède au moins deux entités élastiques (cf. VII.1 et 2) : (i) une ou plusieurs structures rigides et (ii) une gaine molle de chromatine. Ce qui corrobore le modèle « axes rigides + gaine molle de chromatine » que nous souhaitons mettre à l'épreuve au cours de ce travail de thèse. La technique que nous avons utilisée pour mettre en évidence cette organisation duale est, cette fois-ci, différente de celle utilisée dans Houchmandzadeh et Dimitrov, 1999.

Précédemment, seule la technique d'aspiration avait été utilisée, et la différence entre module de Young mesuré et module de Young calculé (grâce à la longueur de persistance) avait montré de manière indirecte cette organisation duale. Au cours de ce travail de thèse, nous avons mis au point une technique qui nous permet de venir directement sonder les diverses entités élastiques qui composent le chromosome, ce qui nous a permis de vérifier directement leur présence et de confirmer les résultats précédemment obtenus par calcul (Houchmandzadeh et Dimitrov, 1999).

#### **5. Nature des axes**

Les protéines SMC, et plus précisément celles qui participent à la formation du complexe 13 S de condensine, interagissent ou font partie intégrante de ces structures résistantes qui ont été nommées précédemment « axes rigides ». La nature exacte de ces axes n'est pas encore élucidée. Néanmoins, nous avons quelques informations qui nous permettent d'envisager un début de réponse.

Les expériences de projection de DNase I montrent que le chromosome casse lors de cette digestion. Nous voyons clairement cette rupture et le résultat de cette expérience montre deux bouts de chromosomes attachés d'un seul côté (cf. Publication n°2 -Figure VII.1-C (t=74s), p190). Il est donc clair pour nous que l'ADN joue un rôle dans le maintien du chromosome. Il a été montré *in vitro* que l'ADN était un substrat du complexe 13S de condensine (cf. Figure V.24, p60), et il est d'ailleurs postulé que la chromatine soit son substrat *in vivo* (Bazett-Jones, 2002). Il est donc tout à fait probable que les axes soient de la chromatine associée à des protéines SMC. Peut-être que cette chromatine présente dans les axes est condensée par les protéines SMC, mais nous ne pouvons savoir si c'est effectivement le cas.

## **6. Rôles des protéines SMC**

### *Rigidification du chromosome mitotique ?*

Tout d'abord nous avons mesuré que la structure avec laquelle interagissait les protéines SMC était au moins aussi résistante que le chromosome pris par toute sa section alors que la chromatine ne l'est pas (cf. Publication n°2 – Figure VII.3 p193 et Publication n°2 - Figure VII.5 p195).

Nous avons pu mesurer que la disparition entre autres des protéines SMC provoquait une diminution de la résistance à l'étirement du chromosome (cf. Publication n°2 - Figure VII.4 p194).

Nous avons de plus mesuré que des cycles successifs d'étirement à élongation constante des structures associées aux protéines SMC entraînaient une diminution de la réponse élastique. Tout comme cela a été observé *in vivo* et *in vitro* précédemment dans la littérature (Houchmandzadeh et Dimitrov, 1999 ; Poirier, 2000) pour le chromosome pris par toute sa section.

Il a été postulé (Houchmandzadeh et Dimitrov, 1999) que la diminution de cette réponse élastique pouvait être corrélable à des ouvertures irréversibles de domaines présents dans le chromosome. Comme cela a été montré dans le chapitre sur les condensines (cf. p58), les condensines ont une structure qui peut être représentée par deux bras reliés par une charnière. Ce genre de structure pourrait être ouverte au cours de l'étirement de chromosome et ne pas pouvoir se refermer du fait de la dénaturation mécanique de la protéine.

Ces résultats mis ensemble indiquent que la structure qui interagit avec les protéines SMC semble être la même que celle qui représente la réponse élastique de tout le chromosome. Il semble donc qu'un des rôles de ces axes rigides est de conférer au chromosome une certaine résistance à l'étirement. L'intérêt biologique d'un tel rôle serait de maintenir le chromosome en un tout résistant car lors de la mitose, les chromosomes doivent migrer du centre vers le pôle de la cellule. Cette migration entraîne des contraintes sur le chromosome (Nicklas, 1983) et il faut que la chromatine chromosomique reste bien groupée pour que la division cellulaire se passe bien.

#### *Protéines à l'origine de l'aspect en bâtonnet du chromosome ?*

Comme présenté dans la publication n°2 (cf. Publication n°2 - Figure VII.4, p194), l'enlèvement complet des protéines SMC n'entraîne qu'une décompaction d'environ un facteur  $\sim 4 - 5$ . Ce qui indique que ces protéines ont un rôle relativement modeste sur la compaction en comparaison de celui qu'ont les ions bivalents (Strick, 2001) par exemple.

Nous avons pu vérifier lors des mêmes expériences qu'un chromosome saisi entre deux pipettes conservait son aspect de bâtonnet. Un chromosome saisi entre deux pipettes ne peut pas prendre sa configuration de moindre énergie. Or, lorsque ces protéines SMC sont enlevées alors que le chromosome n'est pas saisi entre deux pipettes, la chromatine prend l'allure d'une masse informe (Hirano et Mitchison, 1994). De là, nous pouvons imaginer que les protéines SMC ont pour rôle de donner au chromosome son aspect en bâtonnet.

Mais il ne faut pas oublier que la digestion à la trypsine détruit néanmoins un grand nombre de protéines et de complexes. Nous ne pouvons donc pas être catégoriques quant au rôle « d'aspect chromosomique » des seules protéines SMC. L'intérêt pour la cellule de disposer de chromosomes sous forme de bâtonnets plutôt que de masses difformes est évident lors de la séparation des lots chromosomiques. Il est beaucoup plus difficile de séparer deux entités difformes liées l'une à l'autre (donc probablement entremêlés), alors qu'il est facile de séparer deux bâtonnets reliés l'un à l'autre par le centromère. Même si cette hypothèse n'est pas encore vérifiée, elle a le mérite de pouvoir justifier le faible taux apparent de compaction de la chromatine par les condensines, ainsi que la perte de forme du chromosome lors de l'enlèvement de ces dernières.

## **7. Genèse des chromosomes lors de la mitose**

Comme décrit dans la publication n°2 (cf. VII.2 et Publication n°2 - Figure VII.7-A p198), au cours de la phase G2/M le complexe de condensine s'activerait (Hirano, 2002). Ceci provoquerait un réarrangement spatial de la chromatine plutôt qu'une compaction importante de cette dernière. C'est à ce moment-ci que la chromatine prendrait une forme plus ou moins en bâtonnet. Une augmentation en ions bivalents ( $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ ) suivrait et permettrait la forte compaction des chromosomes mitotiques.

De manière plus précise, nous savons que les condensines se distribuent de façon plus ou moins homogène dans le chromosome. En chaque point où elles interagissent avec la chromatine, elles pourraient former un surenroulement (Bazett-Jones, 2002). Il faut bien voir que le substrat des condensines serait des boucles de chromatine relativement grandes. Les condensines pourraient ainsi, malgré leur faible nombre, faire ressentir leur effet à grande échelle. Ces « îlots » de chromatine compacte ou « modules », seraient reliés les uns aux autres en un réseau diffus, que nous nommons « axes rigides ». Le mot axe peut être trompeur. Il faut comprendre par axe, des structures fines par rapport au diamètre du chromosome, reliées de façon cohérente les unes aux autres et lui conférant une certaine résistance à l'étirement.

Comme décrit aussi dans la publication n°2 (cf. VII.2), il ne faut pas oublier qu'environ 50 % des groupements phosphates de l'ADN ne sont pas neutralisés dans la chromatine interphasique (Smirnov, 1988). Et qu'une association avec des cations bivalents ou des polycations avec ces groupements entraîne une forte compaction de la chromatine (Widom, 1986 ; Smirnov, 1988). De plus, des expériences réalisées récemment (Strick, 2001) montrent que des ions bivalents tels que  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  sont impliqués dans des niveaux d'organisation supérieurs du chromosome mitotique et que le nombre de ces ions sur les chromosomes augmente fortement en comparaison du nombre d'ions déjà présents en interphase (Strick, 2001).

Nous proposons donc un modèle de genèse des chromosomes (cf. Publication n°2 - Figure VII.7, p198) lors de la mitose dans lequel les protéines SMC agiraient comme des médiatrices de la forme en bâtonnet du chromosome mitotique et les ions bivalent tels que  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ , comme agents principaux de la compaction de la chromatine interphasique.

Ce modèle propose une vision dynamique de l'organisation du chromosome : Les axes rigides se formeraient et se déferaient au gré du cycle cellulaire. Ils ne seraient donc pas conservés au cours de l'interphase.

### **8. Le modèle « axes rigides + gaine molle de chromatine » face aux autres modèles d'organisation des chromosomes**

Le modèle « loops + scaffold » (cf. Figure V.14, p41) suggère que le squelette protéique est toujours présent dans le chromosome tout au long du cycle cellulaire et que ce squelette est formé de topoisomérase II et de protéines SMC. Au vu de nos résultats et ceux de la littérature, nous pensons que ce modèle souffre de quelques problèmes : (i) la topoisomérase II, comme nous l'avons montré, ne joue pas de rôle dans la charpente du chromosome et est localisée, semble-t-il, dans la gaine molle de chromatine. (ii) le faible nombre de condensines ne permet pas de justifier la présence d'un squelette protéique continu. De plus, les condensines ne sont pas associées aux chromosomes tout au long du cycle cellulaire.

Selon le modèle de relaxation de la contrainte du chromosome mitotique *in vivo* (cf. Figure V.37, p93), le chromosome mitotique serait un objet homogène. Nous avons pu prouver que ce n'était pas le cas. Il apparaît donc selon nos résultats que ce modèle n'est pas valable. Il a été postulé (Poirier, 2002a) que les chromosomes mitotiques assemblés *in vitro* de *Xénope* étant des chromosomes embryonnaires, ils seraient dans un stade d'organisation qui leur permettrait d'être facilement dupliqués. Nos résultats montrent que des zones qui ne fluctuent pas sont présentes en divers points du chromosome (cf. Publication n°1 -Figure VII.1, p162). Si ces zones devaient s'étendre au cours de la « somatisation » du chromosome embryonnaire, il serait possible que nous obtenions le même résultat que Poirier, 2002a. Mais pour vérifier cela, il serait nécessaire de mesurer l'évolution de la structuration duale du chromosome mitotique au cours du développement embryonnaire (ce qui fait partie des perspectives). Nous ne pouvons donc pas exclure ce modèle d'organisation du chromosome mitotique somatique.

En ce qui concerne le modèle de repliement hiérarchisé de l'ADN, nous excluons totalement ce modèle du fait de l'absence de possibilité de dualité de l'organisation du chromosome.

## **9. Tous les chromosomes semblent avoir la même organisation**

Lors des expériences d'étirement, nous ne choisissons pas les chromosomes. Certes, nous ne prenons pas les chromosomes collés à la lamelle où les chromosomes trop petits (difficilement manipulables), mais aucun autre critère n'entre en compte. Les chromosomes sont pris au hasard, par exemple il se peut qu'au cours d'un étirement nous étirions le chromosome 3 et lors du suivant le chromosome 12. Un paramètre facilement utilisable pour comparer les chromosomes est leur longueur. La longueur des chromosomes que nous avons étirés est comprise entre 3 et 27  $\mu\text{m}$  pour les cas extrêmes, et la longueur moyenne des chromosomes étirés est de 9,3  $\mu\text{m}$  (écart-type = 4,2). Nous avons donc étiré différents chromosomes sans que nous puissions voir de différence entre les chromosomes. Il est possible que si une différence existe entre les divers chromosomes, elle soit noyée dans le bruit de la mesure. Quoiqu'il en soit, aucune différence d'organisation structurale n'a pu être observée entre les différents chromosomes. Il apparaît donc, et cela était notre hypothèse initiale, que le mécanisme de compaction et d'organisation des chromosomes ne dépend ni du chromosome choisi, ni de sa séquence.

## **10. Paysage énergétique des chromosomes**

L'étude du paysage énergétique (cf. Publication n°1 -Figure VII.2, p163) lors des mesures d'élasticité est extrêmement importante car elle permet de vérifier dans quel domaine de taux de variation de force la force mesurée est valable. C'est-à-dire, de décrire exactement la force qui unit deux objets. Comme nous l'avons nous aussi montré au cours de ce travail, la force qui unit deux objets dépend de la manière dont elle est sollicitée.

A notre connaissance, c'est la première fois que ce type de mesure a été effectué sur un objet aussi complexe que le chromosome. Il est extrêmement surprenant que ce type de comportement puisse apparaître aussi précisément (reproductibilité) et aussi clairement (forte dépendance du stretch modulus à partir d'environ 100  $\text{pN}\cdot\text{s}^{-1}$ ) sur un objet aussi « hétéroclite » que le chromosome.

## **11. Les chromosomes mitotiques assemblés in vitro de Xénope : un bon système d'étude.**

### **a. Un système d'étude reproductible**

Comme cela a été montré au cours de l'introduction (cf. V.5.b), le système d'étude des chromosomes mitotiques assemblés *in vitro* de *Xénope* est un système qui a permis de nombreuses découvertes qui ont pu être confirmées ensuite chez d'autres organismes. Dans le cas des mesures d'élasticité, nous avons pu vérifier que, quoiqu'ils n'aient qu'une seule chromatide, ils présentent des valeurs de résistance à l'étirement très proches de celles obtenues *in vivo* pour d'autres organismes.

Au cours d'un peu plus de 3 ans d'expériences, nous avons utilisé un grand nombre d'extraits d'œufs obtenus de diverses grenouilles, à diverses périodes de l'année (le *Xénope* possède un cycle annuel de reproduction et la fécondité dépend de ce cycle) et en utilisant différents protocoles d'extraction. Le test de mesure de la qualité des extraits qui seront choisis pour les expériences d'étirement est purement visuel : nous formons des chromosomes et les observons. A partir de cet aspect (lisse et compact) nous déterminons si l'extrait est apte à former des chromosomes utilisables pour les mesures d'élasticité. Nous avons effectué des expériences d'étirement similaires à plusieurs mois d'intervalle sur plusieurs années dans les mêmes conditions et nous avons mesuré des résistances à l'étirement similaires. Il semble donc que notre système d'étude est très stable pour autant que les chromosomes formés par l'extrait d'œufs ressemblent à des chromosomes. Il semble que si un facteur est altéré par la purification de l'extrait, les chromosomes ne se forment pas. Ce qui est très utile dans la caractérisation de notre matériel.

L'élasticité reflétant la structure sous-jacente de l'objet, de petites différences d'organisation auraient pu être détectées si le système d'étude des chromosomes mitotiques assemblés *in vitro* de *Xénope* n'était pas reproductible. Ce qui n'a pas été le cas sur plus d'une centaine de chromosomes étirés. Sans oublier que tous les points de mesure ont pu être reportés sur les graphiques de dépendance au taux de variation de force, un type de mesure *a priori* encore plus sensible à la reproductibilité du système.

### **b. Chromosomes embryonnaires et chromosomes somatiques**

Comme indiqué notamment dans le paragraphe précédent, les chromosomes mitotiques assemblés *in vitro* de *Xénope* ne comportent qu'une seule chromatide mais ont une résistance à l'étirement très proche de celle des chromosomes *in vivo* de salamandre et de sauterelle. La différence d'élasticité qui subsiste entre chromosomes mitotiques assemblés *in vitro* de *Xénope* et chromosomes somatiques *in vivo* de salamandre est au niveau de la résistance à la courbure. Dans le cas de chromosomes mitotiques assemblés *in vitro* de *Xénope*, nous n'observons pas de relation directe entre longueur de persistance et module de courbure mais cette relation est vérifiée dans le cas des chromosomes *in vivo* de salamandre. Ceci indique que les chromosomes *in vivo* de salamandre sont homogènes (cf. Figure V.37, p93) alors que les chromosomes mitotiques assemblés *in vitro* de *Xénope* ne le sont pas (modèle « axe rigide + gaine molle de chromatine », cf. Figure V.17).

Comme expliqué dans la publication n°2 (cf. VII.2, p165), les chromosomes embryonnaires comme ceux de notre système, sont dans un état facilitant ces divisions rapides (une division toutes les 30 à 60 min). Une manière de rester dans cet état « permissif » serait de garder la chromatine « molle » ce qui faciliterait les divisions rapides. La raison pour laquelle nous avançons cette hypothèse est que nous avons observé que des zones du chromosome ne fluctuent pas (*i.e. permanent bends*, cf. VII.1). Nous pensons que cette rigidité, présente à divers endroits du chromosome embryonnaire, pourrait s'étendre sur toute la longueur du chromosome au cours de sa « somatisation ». Ceci sous-entendant que le chromosome mitotique assemblé *in vitro* de *Xénope* est un modèle très intéressant car, de par son organisation de type « ouverte », il permettrait d'avoir accès à des structures qui sont « cachées » dans le chromosome somatique, d'où un intérêt accru d'utilisation de ce système d'étude.

## **12. Les mesures d'élasticité de chromosomes peuvent apporter des informations originales**

Depuis l'apparition du modèle « loops + scaffold » d'organisation du chromosome mitotique (cf. Figure V.14, p41), il était supposé que la topoisomérase II jouait un rôle dans la charpente du chromosome. D'autres expériences avaient montré plus tard qu'elle était nécessaire pour la formation des chromosomes mais pas pour leur morphologie (Hirano et Mitchison, 1993). Ces résultats étaient basés sur des observations microscopiques. Il aurait pu tout à fait être possible que le chromosome ne change pas d'aspect mais que ses propriétés mécaniques soient altérées. Dans ce cas-là, les observations microscopiques auraient mené à une interprétation fautive du résultat. Ce genre d'information ne peut être obtenu *que* par des mesures d'élasticité.

Il a pu être montré biochimiquement que les protéines SMC étaient nécessaires à la formation et au maintien des chromosomes. Mais en aucun cas des mesures de microscopie n'ont montré une organisation de type « réseau » de ces protéines. Comme nous avons pu l'observer, si des protéines SMC sont attrapées de part et d'autre du chromosome, la résistance à l'étirement se répartit uniformément tout au long du chromosome.

Les expériences de micro-injection de protéases couplées aux mesures d'élasticité ont pu mettre en évidence que les protéines SMC participaient directement ou indirectement à la structuration des « axes durs » qui forment ce réseau. Ce type d'information n'est, lui aussi, accessible *que* par des mesures d'élasticité. De plus, nous avons pu montrer que la disparition entre autres des condensines faisait disparaître ces structures rigides.

### **13. Perspectives**

Nous pensons que les perspectives sont nombreuses et ce chapitre ne se veut en aucun cas exhaustif. Si notre modèle est juste, il serait intéressant d'étudier finement l'évolution de la concentration ionique au niveau des chromosomes au cours de la mitose. La fonctionnalisation *facile* des micropipettes que nous avons mises au point pourrait permettre d'étudier la localisation et le rôle de diverses protéines (ex : cohésines) dans le chromosome. De manière plus générale, cet apport technique est loin d'être négligeable. Notre protocole est relativement simple à mettre en œuvre et peu coûteux en temps et en argent. Il pourrait être applicable à divers domaines de la biologie s'intéressant plus particulièrement à la localisation et aux interactions protéiques. Il serait intéressant, concernant la biologie du développement, de voir si effectivement les chromosomes sont « somatisés » au fil des divisions cellulaires. Surtout que nous sommes à une époque où l'étude du passage de la cellule du stade embryonnaire vers le stade somatique (*et vice-versa*) fait partie des grands thèmes de recherche.

## **IX. Conclusion générale**

Depuis plus d'un siècle, la structure des chromosomes est un domaine de la biologie où la controverse est la règle. Le fait que ces modèles soient contradictoires alors qu'ils sont basés sur des informations obtenues par les mêmes techniques montrent bien que l'étude des chromosomes est difficile. La plupart des protocoles utilisés pour étudier les chromosomes sont agressifs et peuvent engendrer des artefacts structuraux.

Afin de nous affranchir de ces divers artefacts, nous avons utilisé un système d'étude nommé chromosomes mitotiques assemblés *in vitro* de *Xénope* qui nous permet d'obtenir des chromosomes *in vitro* sans avoir à les extraire. Ce système d'étude a montré, au cours des dernières années, son efficacité à répondre à de nombreuses questions concernant diverses problématiques de la biologie cellulaire, notamment en ce qui concerne les chromosomes. Ce système s'est avéré très stable et très reproductible tout au long de notre travail.

Dans le but d'obtenir de nouvelles informations pertinentes et originales, nous avons effectué des mesures d'élasticité de ces chromosomes. L'élasticité d'un objet dépend de sa structure sous-jacente, c'est donc un bon moyen d'obtenir des informations pertinentes sur l'organisation du chromosome. Nous avons amélioré cette technique en fonctionnalisant les pipettes qui permettent l'étirement.

Nous avons montré, par ces techniques, que le chromosome mitotique n'est pas un objet homogène. Il est constitué de deux parties bien distinctes : une gaine molle de chromatine et une ou plusieurs structures rigides. Les protéines SMC semblent jouer un rôle clef dans ces structures rigides. Nous avons aussi montré que la topoisomérase II n'intervient pas dans le maintien du chromosome. De plus, nous avons démontré que l'ADN et les protéines sont nécessaires au maintien de l'organisation des chromosomes alors que l'ARN ne l'est pas.

Nous avons pu mesurer le paysage énergétique des chromosomes. La plupart des mesures déjà effectuées dans ce domaine concernaient des objets très simples. Dans notre cas, nous avons un objet extrêmement complexe et ce comportement vis-à-vis du taux de variation de force a pu être mesuré.

De ces mesures, nous déduisons un modèle d'organisation et de genèse des chromosomes mitotiques. Dans ce modèle, les protéines SMC sont des protéines qui permettent au chromosome d'avoir un aspect en bâtonnet et nous proposons que les ions bivalents  $Mg^{++}$  et  $Ca^{++}$  sont les principaux acteurs de la compaction de la chromatine lors de la mitose.

## X. Bibliographie

- Alberts B, B. D., Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, "**Molecular Biology of the Cell**", (1994), Garland Publishing Inc, New York.
- Alberts, B. and *et. al*, "**Essential Cell Biology**", (1998),
- Ashkin, A., (1997), "*Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers*", Proc Natl Acad Sci U S A, **94**, 10, 4853-4860,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9144154](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9144154).
- Bazett-Jones, D. P., Hendzel, M. J. and Kruhlak, M. J., (1999), "*Stoichiometric analysis of protein- and nucleic acid-based structures in the cell nucleus*", Micron, **30**, 2, 151-157,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10420641](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10420641).
- Bazett-Jones, D. P., Kimura, K. and Hirano, T., (2002), "*Efficient supercoiling of DNA by a single condensin complex as revealed by electron spectroscopic imaging*", Mol Cell, **9**, 6, 1183-1190,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12086616](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12086616).
- Bednar, J., Horowitz, R. A., Grigoryev, S. A., Carruthers, L. M., Hansen, J. C., Koster, A. J. and Woodcock, C. L., (1998), "*Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin*", Proc Natl Acad Sci USA, **95**, 24, 14173-14178,
- Belmont, A. S., Dietzel, S., Nye, A. C., Strukov, Y. G. and Tumber, T., (1999), "*Large-scale chromatin structure and function*", Curr Opin Cell Biol, **11**, 3, 307-311., <http://www.biomednet.com/article/cbb314>.
- Bennink, M. L., Leuba, S. H., Leno, G. H., Zlatanova, J., de Grooth, B. G. and Greve, J., (2001), "*Unfolding individual nucleosomes by stretching single chromatin fibers with optical tweezers*", Nat Struct Biol, **8**, 7, 606-610., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11427891>.
- Berger, J. M., (1998), "*Structure of DNA topoisomerases*", Bba Gene Struct Express, **1400**, 1-3, 3-18,
- Berger, J. M., Gamblin, S. J., Harrison, S. C. and Wang, J. C., (1996), "*Structure and mechanism of DNA topoisomerase II*", Nature, **379**, 6562, 225-232,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8538787](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8538787).
- Berk, D. and Evans, E., (1991), "*Detachment of agglutinin-bonded red blood cells. III. Mechanical analysis for large contact areas*", Biophys J, **59**, 4, 861-872,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2065190](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2065190).
- Bickmore, W. A. and Oghene, K., (1996), "*Visualizing the spatial relationships between defined DNA sequences and the axial region of extracted metaphase chromosomes*", Cell, **84**, 1, 95-104.,

- Binnig, G., Quate, C. F. and Gerber, C., (1986), "*Atomic force microscope*", *Physical Review Letters*, **56**, 9, 930-933, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10033323](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10033323).
- Blat, Y. and Kleckner, N., (1999), "*Cohesins bind to preferential sites along yeast chromosome III, with differential regulation along arms versus the centric region*", *Cell*, **98**, 2, 249-259.,
- Bostock-Smith, C. E., Laughton, C. A. and Searle, M. S., (1998), "*DNA minor groove recognition by a tetrahydropyrimidinium analogue of hoechst 33258: NMR and molecular dynamics studies of the complex with d(GGTAATTACC)2*", *Nucleic Acids Res*, **26**, 7, 1660-1667, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9512536](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9512536).
- Boy de la Tour, E. and Laemmli, U. K., (1988), "*The metaphase scaffold is helically folded: sister chromatids have predominantly opposite helical handedness*", *Cell*, **55**, 6, 937-944., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=2849511>.
- Brower-Toland, B. D., Smith, C. L., Yeh, R. C., Lis, J. T., Peterson, C. L. and Wang, M. D., (2002), "*Mechanical disruption of individual nucleosomes reveals a reversible multistage release of DNA*", *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4, 1960-1965, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11854495](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11854495).
- Bustamante, C., Smith, S. B., Liphardt, J. and Smith, D., (2000a), "*Single-molecule studies of DNA mechanics*", *Curr Opin Struct Biol*, **10**, 3, 279-285., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10851197>, <http://www.biomednet.com/article/sba314>.
- Bustamante, C., Smith, S. B., Liphardt, J. and Smith, D., (2000b), "*Single-molecule studies of DNA mechanics*", *Curr Opin Struct Biol*, **10**, 3, 279-285, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10851197](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10851197).
- Carruthers, L. M. and Hansen, J. C., (2000), "*The core histone N termini function independently of linker histones during chromatin condensation*", *J Biol Chem*, **275**, 47, 37285-37290., <http://www.jbc.org/cgi/content/full/275/47/37285>, <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/275/47/37285>.
- Chow, K. C., Macdonald, T. L. and Ross, W. E., (1988), "*DNA binding by epipodophyllotoxins and N-acyl anthracyclines: implications for mechanism of topoisomerase II inhibition*", *Mol Pharmacol*, **34**, 4, 467-473, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2845248](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2845248).
- Clark, D. J. and Kimura, T., (1990), "*Electrostatic mechanism of chromatin folding*", *J Mol Biol*, **211**, 4, 883-896.,
- Clerc, P. and Avner, P., (2003), "*Multiple elements within the Xic regulate random X inactivation in mice*", *Semin Cell Dev Biol*, **14**, 1, 85-92, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12524011](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12524011).

- Cleveland, D. W., Fischer, S. G., Kirschner, M. W. and Laemmli, U. K., (1977), "*Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis*", J Biol Chem, **252**, 3, 1102-1106, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=320200](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=320200).
- Cluzel, P., Lebrun, A., Heller, C., Lavery, R., Viovy, J. L., Chatenay, D. and Caron, F., (1996), "*DNA: an extensible molecule*", Science, **271**, 5250, 792-794., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=8628993>.
- Cobb, J., Miyaike, M., Kikuchi, A. and Handel, M. A., (1999), "*Meiotic events at the centromeric heterochromatin: histone H3 phosphorylation, topoisomerase II alpha localization and chromosome condensation*", Chromosoma, **108**, 7, 412-425,
- Cobbe, N. and Heck, M. M. S., (2000), "*SMCs in the world of chromosome biology - From prokaryotes to higher eukaryotes*", J Struct Biol, **129**, 2-3, 123-143,
- Cook, P. R., (1995), "*A chromomeric model for nuclear and chromosome structure*", J Cell Sci, **108**, Pt 9, 2927-2935.,
- Cozens-Roberts, C., Quinn, J. A. and Lauffenburger, D. A., (1990), "*Receptor-mediated cell attachment and detachment kinetics. II. Experimental model studies with the radial-flow detachment assay*", Biophys J, **58**, 4, 857-872, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2174272](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2174272).
- Cremer, M., von Hase, J., Volm, T., Brero, A., Kreth, G., Walter, J., Fischer, C., Solovei, I., Cremer, C. and Cremer, T., (2001), "*Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells*", Chromosome Res, **9**, 7, 541-567, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11721953](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11721953).
- Cremer, T. and Cremer, C., (2001), "*Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells*", Nat Rev Genet, **2**, 4, 292-301, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11283701](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11283701).
- Cremer, T., Kreth, G., Koester, H., Fink, R. H., Heintzmann, R., Cremer, M., Solovei, I., Zink, D. and Cremer, C., (2000), "*Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture*", Crit Rev Eukaryot Gene Expr, **10**, 2, 179-212, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11186332](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11186332).
- Cress, W. D. and Seto, E., (2000), "*Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer*", J Cell Physiol, **184**, 1, 1-16., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10825229>.
- Croft, J. A., Bridger, J. M., Boyle, S., Perry, P., Teague, P. and Bickmore, W. A., (1999), "*Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus*", J Cell Biol, **145**, 6, 1119-1131, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10366586](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10366586).
- de la Barre, A. E., Robert-Nicoud, M. and Dimitrov, S., (1999), "*Assembly of mitotic chromosomes in Xenopus egg extract*", Methods Mol Biol, **119**, 219-229, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10804515](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10804515).

- Dimitrov, S., Dasso, M. C. and Wolffe, A. P., (1994), "*Remodeling sperm chromatin in Xenopus laevis egg extracts: the role of core histone phosphorylation and linker histone B4 in chromatin assembly*", J Cell Biol, **126**, 3, 591-601,
- DuPraw, E. J., (1966), "*Evidence for a 'folded-fibre' organization in human chromosomes*", Nature, **209**, 23, 577-581, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=5921180](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5921180).
- Earnshaw, W. C., Halligan, B., Cooke, C. A., Heck, M. M. and Liu, L. F., (1985), "*Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds*", J Cell Biol, **100**, 5, 1706-1715,
- Earnshaw, W. C. and Heck, M. M., (1985), "*Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes*", J Cell Biol, **100**, 5, 1716-1725, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2985626](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2985626).
- Earnshaw, W. C. and Laemmli, U. K., (1983), "*Architecture of metaphase chromosomes and chromosome scaffolds*", J Cell Biol, **96**, 1, 84-93., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=6826654>.
- Essevaz-Roulet, B., Bockelmann, U. and Heslot, F., (1997), "*Mechanical separation of the complementary strands of DNA*", Proc Natl Acad Sci U S A, **94**, 22, 11935-11940, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9342340](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9342340).
- Evans, E., (1998), "*Energy landscapes of biomolecular adhesion and receptor anchoring at interfaces explored with dynamic force spectroscopy*", Faraday Discuss, **111**, 1-16, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10822596>.
- Evans, E., (1999), "*Looking inside molecular bonds at biological interfaces with dynamic force spectroscopy*", Biophys Chem, **82**, 2-3, 83-97., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10631793>.
- Evans, E., (2001a), "*Probing the relation between force--lifetime--and chemistry in single molecular bonds*", Annu Rev Biophys Biomol Struct, **30**, 105-128, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11340054>  
<http://biophys.annualreviews.org/cgi/content/full/30/1/105>  
<http://biophys.annualreviews.org/cgi/content/abstract/30/1/105>.
- Evans, E., Berk, D. and Leung, A., (1991a), "*Detachment of agglutinin-bonded red blood cells. I. Forces to rupture molecular-point attachments*", Biophys J, **59**, 4, 838-848, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2065188](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2065188).
- Evans, E., Berk, D., Leung, A. and Mohandas, N., (1991b), "*Detachment of agglutinin-bonded red blood cells. II. Mechanical energies to separate large contact areas*", Biophys J, **59**, 4, 849-860, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2065189](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2065189).
- Evans, E., Leung, A., Hammer, D. and Simon, S., (2001b), "*Chemically distinct transition states govern rapid dissociation of single L-selectin bonds under force*", Proc Natl Acad Sci U S A, **98**, 7, 3784-3789., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11274395>

<http://www.pnas.org/cgi/content/full/98/7/3784>

<http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/98/7/3784>.

- Evans, E., Ritchie, K. and Merkel, R., (1995), "*Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces*", *Biophys J*, **68**, 6, 2580-2587.,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=7647261>.

- Finch, J. T. and Klug, A., (1976), "*Solenoidal model for superstructure in chromatin*", *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 6, 1897-1901,

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1064861](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1064861).

- Fousteri, M. I. and Lehmann, A. R., (2000), "*A novel SMC protein complex in Schizosaccharomyces pombe contains the Rad18 DNA repair protein*", *Embo J*, **19**, 7, 1691-1702,

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10747036](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10747036).

- Freeman, L., Aragon-Alcaide, L. and Strunnikov, A., (2000), "*The condensin complex governs chromosome condensation and mitotic transmission of rDNA*", *J Cell Biol*, **149**, 4, 811-824,

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10811823](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10811823).

- Gasser, S. M., Laroche, T., Falquet, J., Boy de la Tour, E. and Laemmli, U. K., (1986), "*Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II*", *J Mol Biol*, **188**, 4, 613-629.,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=3016287>.

- Gerace, L. and Burke, B., (1988), "*Functional organization of the nuclear envelope*", *Annu Rev Cell Biol*, **4**, 335-374, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2461721](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2461721).

- Goldman, A. J., Cox, R. G. & Brenner, H., (1967), *Chem. Engr. Sci.*, **22**, 653-660,

- Grunstein, M., (1992), "*Histones as regulators of genes*", *Sci Am*, **267**, 4, 68-74B,

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1411455](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1411455).

- Grunstein, M., (1997), "*Histone acetylation in chromatin structure and transcription*", *Nature*, **389**, 6649, 349-352., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9311776>.

- Habermann, F. A., Biet, C. and Fries, R., (2001), "*Chromosomal localization of the genes encoding SCNN1A, BTG1, IFNG and MAOA on chicken chromosome 1 by fluorescence in-situ hybridization*", *Chromosome Res*, **9**, 6, 515-518,

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11592486](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11592486).

- Hamiche, A., Schultz, P., Ramakrishnan, V., Oudet, P. and Prunell, A., (1996), "*Linker histone-dependent DNA structure in linear mononucleosomes*", *J Mol Biol*, **257**, 1, 30-42.,

- Heinrich, V. and Waugh, R. E., (1996), "*A piconewton force transducer and its application to measurement of the bending stiffness of phospholipid membranes*", *Ann Biomed Eng*, **24**, 5, 595-605,

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8886240](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8886240).

- Hendzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A., VanHooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B. R., Bazett-Jones, D. P. and Allis, C. D., (1997), "*Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation*", *Chromosoma*, **106**, 6, 348-360,
- Higuchi, H., Nakauchi, Y., Maruyama, K. and Fujime, S., (1993), "*Characterization of beta-connectin (titin 2) from striated muscle by dynamic light scattering*", *Biophys J*, **65**, 5, 1906-1915,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8298020](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8298020).
- Hirano, M., Anderson, D. E., Erickson, H. P. and Hirano, T., (2001), "*Bimodal activation of SMC ATPase by intra- and inter-molecular interactions*", *Embo J*, **20**, 12, 3238-3250,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11406600](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11406600).
- Hirano, T., (2000), "*Chromosome cohesion, condensation, and separation*", *Annu Rev Biochem*, **69**, 115-144, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10966455>  
<http://biochem.annualreviews.org/cgi/content/full/69/1/115>  
<http://biochem.annualreviews.org/cgi/content/abstract/69/1/115>.
- Hirano, T., (2002), "*The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair*", *Genes Dev*, **16**, 4, 399-414., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11850403>  
<http://www.genesdev.org/cgi/content/full/16/4/399>.
- Hirano, T., Kobayashi, R. and Hirano, M., (1997), "*Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a Xenopus homolog of the Drosophila Barren protein*", *Cell*, **89**, 4, 511-521., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9160743>.
- Hirano, T. and Mitchison, T. J., (1993), "*Topoisomerase II does not play a scaffolding role in the organization of mitotic chromosomes assembled in Xenopus egg extracts*", *J Cell Biol*, **120**, 3, 601-612., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=8381118>.
- Hirano, T. and Mitchison, T. J., (1994), "*A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro*", *Cell*, **79**, 3, 449-458., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=7954811>.
- Houchmandzadeh, B. and Dimitrov, S., (1999), "*Elasticity measurements show the existence of thin rigid cores inside mitotic chromosomes*", *J Cell Biol*, **145**, 2, 215-223., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10209019>.
- Houchmandzadeh, B., Marko, J. F., Chatenay, D. and Libchaber, A., (1997), "*Elasticity and structure of eukaryote chromosomes studied by micromanipulation and micropipette aspiration*", *J Cell Biol*, **139**, 1, 1-12., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9314524>.
- Hozak, P., Hassan, A. B., Jackson, D. A. and Cook, P. R., (1993), "*Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton*", *Cell*, **73**, 2, 361-373,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8097433](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8097433).

- Hozak, P., Sasseville, A. M., Raymond, Y. and Cook, P. R., (1995), "*Lamin proteins form an internal nucleoskeleton as well as a peripheral lamina in human cells*", *J Cell Sci*, **108 ( Pt 2)**, 635-644, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7769007](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7769007).
- Hsu, T. C., (1975), "*A possible function of constitutive heterochromatin: the bodyguard hypothesis*", *Genetics*, **79 Suppl**, 137-150, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1150080](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1150080).
- Jackson, D. A. and Cook, P. R., (1985), "*Transcription occurs at a nucleoskeleton*", *Embo J*, **4, 4**, 919-925, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2990913](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2990913).
- Jackson, D. A. and Cook, P. R., (1988), "*Visualization of a filamentous nucleoskeleton with a 23 nm axial repeat*", *Embo J*, **7, 12**, 3667-3677, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3208744](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3208744).
- Jackson, D. A. and Cook, P. R., (1993), "*Transcriptionally active minichromosomes are attached transiently in nuclei through transcription units*", *J Cell Sci*, **105 ( Pt 4)**, 1143-1150, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8227203](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8227203).
- Jackson, D. A., Dickinson, P. and Cook, P. R., (1990), "*Attachment of DNA to the nucleoskeleton of HeLa cells examined using physiological conditions*", *Nucleic Acids Res*, **18, 15**, 4385-4393, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2167466](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2167466).
- Karrer, K. M. and VanNuland, T. A., (1999), "*Nucleosome positioning is independent of histone H1 in vivo*", *J Biol Chem*, **274, 46**, 33020-33024,
- Keller, T. C., 3rd, (1997), "*Muscle structure. Molecular bungees*", *Nature*, **387, 6630**, 233-235, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9153382](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9153382).
- Kellermayer, M. S., Smith, S. B., Granzier, H. L. and Bustamante, C., (1997), "*Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers*", *Science*, **276, 5315**, 1112-1116., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9148805>.
- Khochbin, S., Verdel, A., Lemerrier, C. and Seigneurin-Berny, D., (2001), "*Functional significance of histone deacetylase diversity*", *Curr Opin Genet Dev*, **11, 2**, 162-166.,
- Kimura, K., Rybenkov, V. V., Crisona, N. J., Hirano, T. and Cozzarelli, N. R., (1999), "*13S condensin actively reconfigures DNA by introducing global positive writhe: implications for chromosome condensation*", *Cell*, **98, 2**, 239-248., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10428035>.
- Klug, A., (1985), *Proc. R. W. Welch Fdn. Conf. Chem. Res.*, **39**, 133,
- Koshland, D. and Strunnikov, A., (1996), "*Mitotic chromosome condensation*", *Annu Rev Cell Dev Biol*, **12**, 305-333, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8970729](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8970729).
- Labeit, S. and Kolmerer, B., (1995), "*Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity*", *Science*, **270, 5234**, 293-296, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7569978](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7569978).

- Laemmli, U. K., (1978a), "*Levels of organization of the DNA in eucaryotic chromosomes*", Pharmacol Rev, **30**, 4, 469-476., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=392541>.
- Laemmli, U. K., Cheng, S. M., Adolph, K. W., Paulson, J. R., Brown, J. A. and Baumbach, W. R., (1978b), "*Metaphase chromosome structure: the role of nonhistone proteins*", Cold Spring Harb Symp Quant Biol, **42**, Pt 1, 351-360., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=277351>.
- Laemmli, U. K., Kas, E., Poljak, L. and Adachi, Y., (1992), "*Scaffold-associated regions: cis-acting determinants of chromatin structural loops and functional domains*", Curr Opin Genet Dev, **2**, 2, 275-285, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1322207](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1322207).
- Laloraya, S., Guacci, V. and Koshland, D., (2000), "*Chromosomal addresses of the cohesin component Mcd1p*", J Cell Biol, **151**, 5, 1047-1056, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11086006](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11086006).
- Lawrence, M. B., McIntire, L. V. and Eskin, S. G., (1987), "*Effect of flow on polymorphonuclear leukocyte/endothelial cell adhesion*", Blood, **70**, 5, 1284-1290, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3663936](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3663936).
- Leckband, D., (2000), "*Measuring the forces that control protein interactions*", Annu Rev Biophys Biomol Struct, **29**, 1-26, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10940241](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10940241).
- Leckband, D. E., Israelachvili, J. N., Schmitt, F. J. and Knoll, W., (1992), "*Long-range attraction and molecular rearrangements in receptor-ligand interactions*", Science, **255**, 5050, 1419-1421, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1542789](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1542789).
- Lehmann, A. R., Walicka, M., Griffiths, D. J., Murray, J. M., Watts, F. Z., McCready, S. and Carr, A. M., (1995), "*The rad18 gene of Schizosaccharomyces pombe defines a new subgroup of the SMC superfamily involved in DNA repair*", Mol Cell Biol, **15**, 12, 7067-7080, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8524274](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8524274).
- Leuba, S. H., Bustamante, C., van Holde, K. and Zlatanova, J., (1998a), "*Linker histone tails and N-tails of histone H3 are redundant: scanning force microscopy studies of reconstituted fibers*", Biophys J, **74**, 6, 2830-2839,
- Leuba, S. H., Bustamante, C., Zlatanova, J. and van Holde, K., (1998b), "*Contributions of linker histones and histone H3 to chromatin structure: scanning force microscopy studies on trypsinized fibers*", Biophys J, **74**, 6, 2823-2829,
- Lewin, B., "**Genes VI**", (1997), Oxford University Press,
- Lieb, J. D., Albrecht, M. R., Chuang, P. T. and Meyer, B. J., (1998), "*MIX-1: an essential component of the C. elegans mitotic machinery executes X chromosome dosage compensation*", Cell, **92**, 2, 265-277, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9458050](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9458050).
- Lin, J. H. and Castora, F. J., (1991), "*DNA topoisomerase II from mammalian mitochondria is inhibited by the antitumor drugs, m-AMSA and VM-26*", Biochem Biophys Res Commun, **176**, 2, 690-697, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1851000](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1851000).

- Liphardt, J., Onoa, B., Smith, S. B., Tinoco, I. J. and Bustamante, C., (2001), "*Reversible unfolding of single RNA molecules by mechanical force*", *Science*, **292**, 5517, 733-737.,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11326101>

<http://www.sciencemaq.org/cqi/content/full/292/5517/733>

<http://www.sciencemaq.org/cqi/content/abstract/292/5517/733>.

- Lohka, M. J. and Masui, Y., (1983), "*Formation in vitro of sperm pronuclei and mitotic chromosomes induced by amphibian ooplasmic components*", *Science*, **220**, 4598, 719-721.,

- Losada, A., Hirano, M. and Hirano, T., (1998), "*Identification of Xenopus SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion*", *Genes Dev*, **12**, 13, 1986-1997.,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9649503>

<http://www.genesdev.org/cqi/content/full/12/13/1986>.

- Lowe, J., Cordell, S. C. and van den Ent, F., (2001), "*Crystal structure of the SMC head domain: an ABC ATPase with 900 residues antiparallel coiled-coil inserted*", *J Mol Biol*, **306**, 1, 25-35.,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11178891>.

- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. and Richmond, T. J., (1997), "*Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*", *Nature*, **389**, 6648, 251-260.,

<http://www.nature.com/>.

- Lupo, R., Breiling, A., Bianchi, M. E. and Orlando, V., (2001), "*Drosophila chromosome condensation proteins Topoisomerase II and Barren colocalize with Polycomb and maintain Fab-7 PRE silencing*", *Mol Cell*, **7**, 1, 127-136,

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11172718](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11172718).

- Machado, C., Sunkel, C. E. and Andrew, D. J., (1998), "*Human autoantibodies reveal titin as a chromosomal protein*", *J Cell Biol*, **141**, 2, 321-333.,

- Maison, C., Bailly, D., Peters, A. H., Quivy, J. P., Roche, D., Taddei, A., Lachner, M., Jenuwein, T. and Almouzni, G., (2002), "*Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component*", *Nat Genet*, **30**, 3, 329-334,

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11850619](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11850619).

- Manuelidis, L., (1990), "*A view of interphase chromosomes*", *Science*, **250**, 4987, 1533-1540., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=2274784>.

- Manuelidis, L. and Chen, T. L., (1990), "*A unified model of eukaryotic chromosomes*", *Cytometry*, **11**, 1, 8-25.,

- Marko, J. F. and Siggia, E. D., (1997), "*Polymer models of meiotic and mitotic chromosomes*", *Mol Biol Cell*, **8**, 11, 2217-2231,

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9362064](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9362064).

- Marko, J. F., Siggia, E. D., (1995), "*Stretching DNA*", *Macromolecules*, **28**, 8759-8770,

- Marsden, M. P. and Laemmli, U. K., (1979), "*Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model*", *Cell*, **17**, 4, 849-858., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=487432>.
- Mehta, A. D., Rief, M., Spudich, J. A., Smith, D. A. and Simmons, R. M., (1999), "*Single-molecule biomechanics with optical methods*", *Science*, **283**, 5408, 1689-1695., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10073927>.
- Melby, T. E., Ciampaglio, C. N., Briscoe, G. and Erickson, H. P., (1998), "*The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge*", *J Cell Biol*, **142**, 6, 1595-1604., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9744887>.
- Merkel, R., Nassoy, P., Leung, A., Ritchie, K. and Evans, E., (1999), "*Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy*", *Nature*, **397**, 6714, 50-53., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9892352>.
- Meyer, B. J., (2000), "*Sex in the worm counting and compensating X-chromosome dose*", *Trends Genet*, **16**, 6, 247-253, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10827451](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10827451).
- Michaelis, C., Ciosk, R. and Nasmyth, K., (1997), "*Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids*", *Cell*, **91**, 1, 35-45.,
- Mirkovitch, J., Mirault, M. E. and Laemmli, U. K., (1984), "*Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold*", *Cell*, **39**, 1, 223-232.,
- Nelson, W. G., Pienta, K. J., Barrack, E. R. and Coffey, D. S., (1986), "*The role of the nuclear matrix in the organization and function of DNA*", *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, **15**, 457-475, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3013231](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3013231).
- Newport, J. and Spann, T., (1987), "*Disassembly of the nucleus in mitotic extracts: membrane vesicularization, lamin disassembly, and chromosome condensation are independent processes*", *Cell*, **48**, 2, 219-230.,
- Ng, H. H. and Bird, A., (2000), "*Histone deacetylases: silencers for hire*", *Trends Biochem Sci*, **25**, 3, 121-126., [http://www.biomednet.com/library/fulltext/TIBS.etc00249\\_09680004\\_v0025i03\\_00001551](http://www.biomednet.com/library/fulltext/TIBS.etc00249_09680004_v0025i03_00001551)  
[http://www.biomednet.com/library/abstract/TIBS.etc00249\\_09680004\\_v0025i03\\_00001551](http://www.biomednet.com/library/abstract/TIBS.etc00249_09680004_v0025i03_00001551).
- Nicklas, R. B., (1983), "*Measurements of the force produced by the mitotic spindle in anaphase*", *J Cell Biol*, **97**, 2, 542-548., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=6885908>.
- Nitiss, J. L., (1998), "*Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells*", *Biochim Biophys Acta*, **1400**, 1-3, 63-81., [http://www.elsevier.com/80/cgi-bin/cas/tree/store/bbaexp/cas\\_sub/browse/browse.cgi?year=1998&volume=1400&issue=1-3&aid=93143](http://www.elsevier.com/80/cgi-bin/cas/tree/store/bbaexp/cas_sub/browse/browse.cgi?year=1998&volume=1400&issue=1-3&aid=93143).
- Oberhauser, A. F., Hansma, P. K., Carrion-Vazquez, M. and Fernandez, J. M., (2001), "*Stepwise unfolding of titin under force-clamp atomic force microscopy*", *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 2, 468-472, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11149943](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11149943).

- Ohsumi, K., Katagiri, C. and Kishimoto, T., (1993), "*Chromosome condensation in Xenopus mitotic extracts without histone H1*", *Science*, **262**, 5142, 2033-2035.,
- Ostashevsky, J., (1998), "*A polymer model for the structural organization of chromatin loops and minibands in interphase chromosomes*", *Mol Biol Cell*, **9**, 11, 3031-3040,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9802894](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9802894).
- Ostashevsky, J. Y. and Lange, C. S., (1994), "*The 30 nm chromatin fiber as a flexible polymer*", *J Biomol Struct Dyn*, **11**, 4, 813-820,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8204216](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8204216).
- Ott, A., Magnasco, M., Simon, A. and Libchaber, A., (1993), "*Measurement of the persistence length of polymerized actin using fluorescence microscopy*", *Physical Review. E. Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics*, **48**, 3, R1642-R1645,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9960868](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9960868).
- Paul, A. L. and Ferl, R. J., (1999), "*Higher-order chromatin structure: looping long molecules*", *Plant Mol Biol*, **41**, 6, 713-720,
- Paulson, J. R. and Laemmli, U. K., (1977), "*The structure of histone-depleted metaphase chromosomes*", *Cell*, **12**, 3, 817-828.,
- Perreault, S. D., Barbee, R. R. and Slott, V. L., (1988), "*Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes*", *Dev Biol*, **125**, 1, 181-186, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3334716](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3334716).
- Perreault, S. D., Wolff, R. A. and Zirkin, B. R., (1984), "*The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo*", *Dev Biol*, **101**, 1, 160-167,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6692970](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6692970).
- Poirier, M., Eroglu, S., Chatenay, D. and Marko, J. F., (2000), "*Reversible and irreversible unfolding of mitotic newt chromosomes by applied force*", *Mol Biol Cell*, **11**, 1, 269-276.,  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10637307>  
<http://www.molbiolcell.org/cgi/content/full/11/1/269>  
<http://www.molbiolcell.org/cgi/content/abstract/11/1/269>.
- Poirier, M. G., Eroglu, S. and Marko, J. F., (2002a), "*The bending rigidity of mitotic chromosomes*", *Mol Biol Cell*, **13**, 6, 2170-2179,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12058078](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12058078).
- Poirier, M. G. and Marko, J. F., (2002), "*Mitotic chromosomes are chromatin networks without a mechanically contiguous protein scaffold*", *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 24, 15393-15397,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12438695](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12438695).
- Poirier, M. G., Monhait, T. and Marko, J. F., (2002b), "*Reversible hypercondensation and decondensation of mitotic chromosomes studied using combined chemical-micromechanical techniques*", *J Cell Biochem*, **85**, 2, 422-434,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11948697](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11948697).

- Poirier, M. G., Nemani, A., Gupta, P., Eroglu, S. and Marko, J. F., (2001), "*Probing chromosome structure with dynamic force relaxation*", *Phys Rev Lett*, **86**, 2, 360-363.,  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11177831>.
- Rattner, J. B., (1992), "*Integrating chromosome structure with function*", *Chromosoma*, **101**, 5-6, 259-264.,
- Rattner, J. B., Hendzel, M. J., Furbee, C. S., Muller, M. T. and Bazettjones, D. P., (1996), "*Topoisomerase II alpha is associated with the mammalian centromere in a cell cycle and species-specific manner and is required for proper centromere/kinetochore structure*", *J Cell Biol*, **134**, 5, 1097-1107,
- Rattner, J. B. and Lin, C. C., (1985), "*Radial loops and helical coils coexist in metaphase chromosomes*", *Cell*, **42**, 1, 291-296,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4016953](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4016953).
- Rhodes, D., (1997), "*Chromatin structure. The nucleosome core all wrapped up*", *Nature*, **389**, 6648, 231, 233, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9305832](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9305832).
- Rief, M., Clausen-Schaumann, H. and Gaub, H. E., (1999), "*Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules*", *Nat Struct Biol*, **6**, 4, 346-349,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10201403](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10201403).
- Sachs, R. K., van den Engh, G., Trask, B., Yokota, H. and Hearst, J. E., (1995), "*A random-walk/giant-loop model for interphase chromosomes*", *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7, 2710-2714,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7708711](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7708711).
- Sadoni, N., Langer, S., Fauth, C., Bernardi, G., Cremer, T., Turner, B. M. and Zink, D., (1999), "*Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments*", *J Cell Biol*, **146**, 6, 1211-1226,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10491386](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10491386).
- Saitoh, N., Goldberg, I. G., Wood, E. R. and Earnshaw, W. C., (1994), "*ScII: an abundant chromosome scaffold protein is a member of a family of putative ATPases with an unusual predicted tertiary structure*", *J Cell Biol*, **127**, 2, 303-318,
- Saitoh, Y. and Laemmli, U. K., (1993), "*From the chromosomal loops and the scaffold to the classic bands of metaphase chromosomes*", *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **58**, 755-765.,
- Saitoh, Y. and Laemmli, U. K., (1994), "*Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold*", *Cell*, **76**, 4, 609-622., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=7510215>.
- Schmiesing, J. A., Gregson, H. C., Zhou, S. and Yokomori, K., (2000), "*A human condensin complex containing hCAP-C-hCAP-E and CNAP1, a homolog of Xenopus XCAP-D2, colocalizes with phosphorylated histone H3 during the early stage of mitotic chromosome condensation*", *Mol Cell Biol*, **20**, 18, 6996-7006, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10958694](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10958694).

- Sedat, J. and Manuelidis, L., (1978), "*A direct approach to the structure of eukaryotic chromosomes*", Cold Spring Harb Symp Quant Biol, **42 Pt 1**, 331-350,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=98280](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=98280).
- Shao, J. Y., (2001), "*Measuring Piconewton Forces and Its Application in Cellular and Molecular Biomechanics*", Advances in Biomechanics, 47-51,
- Shen, X. and Gorovsky, M. A., (1996), "*Linker histone H1 regulates specific gene expression but not global transcription in vivo*", Cell, **86**, 3, 475-483.,
- Shen, X., Yu, L., Weir, J. W. and Gorovsky, M. A., (1995), "*Linker histones are not essential and affect chromatin condensation in vivo*", Cell, **82**, 1, 47-56.,
- Smirnov, I. V., Dimitrov, S. I. and Makarov, V. L., (1988), "*Polyamine-DNA interactions. Condensation of chromatin and naked DNA*", J Biomol Struct Dyn, **5**, 5, 1149-1161,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3271502](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3271502).
- Smith, S. B., Cui, Y. and Bustamante, C., (1996), "*Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules*", Science, **271**, 5250, 795-799, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8628994](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8628994).
- Smith, S. B., Finzi, L. and Bustamante, C., (1992), "*Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads*", Science, **258**, 5085, 1122-1126,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1439819](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1439819).
- Smythe, C. and Newport, J. W., (1991), "*Systems for the study of nuclear assembly, DNA replication, and nuclear breakdown in Xenopus laevis egg extracts*", Methods Cell Biol, **35**, 449-468,
- Steffensen, S., Coelho, P. A., Cobbe, N., Vass, S., Costa, M., Hassan, B., Prokopenko, S. N., Bellen, H., Heck, M. M. and Sunkel, C. E., (2001), "*A role for Drosophila SMC4 in the resolution of sister chromatids in mitosis*", Curr Biol, **11**, 5, 295-307,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11267866](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11267866).
- Strick, R., Strissel, P. L., Gavrillov, K. and Levi-Setti, R., (2001), "*Cation-chromatin binding as shown by ion microscopy is essential for the structural integrity of chromosomes*", J Cell Biol, **155**, 6, 899-910, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11739403](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11739403).
- Strick, T. R., Allemand, J. F., Bensimon, D., Bensimon, A. and Croquette, V., (1996), "*The elasticity of a single supercoiled DNA molecule*", Science, **271**, 5257, 1835-1837,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8596951](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8596951).
- Strunnikov, A. V., Larionov, V. L. and Koshland, D., (1993), "*SMC1: an essential yeast gene encoding a putative head-rod-tail protein is required for nuclear division and defines a new ubiquitous protein family*", J Cell Biol, **123**, 6 Pt 2, 1635-1648,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8276886](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8276886).

- Sun, H. B., Shen, J. and Yokota, H., (2000), "*Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei*", *Biophys J*, **79**, 1, 184-190,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10866946](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10866946).
- Sutani, T., Yuasa, T., Tomonaga, T., Dohmae, N., Takio, K. and Yanagida, M., (1999), "*Fission yeast condensin complex: essential roles of non-SMC subunits for condensation and Cdc2 phosphorylation of Cut3/SMC4*", *Gene Develop*, **13**, 17, 2271-2283,
- Tanabe, H., Habermann, F. A., Solovei, I., Cremer, M. and Cremer, T., (2002a), "*Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications*", *Mutat Res*, **504**, 1-2, 37-45,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12106644](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12106644).
- Tanabe, H., Muller, S., Neusser, M., von Hase, J., Calcagno, E., Cremer, M., Solovei, I., Cremer, C. and Cremer, T., (2002b), "*Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates*", *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7, 4424-4429,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11930003](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11930003).
- Taylor, E. M., Moghraby, J. S., Lees, J. H., Smit, B., Moens, P. B. and Lehmann, A. R., (2001), "*Characterization of a novel human SMC heterodimer homologous to the Schizosaccharomyces pombe Rad18/Spr18 complex*", *Mol Biol Cell*, **12**, 6, 1583-1594,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11408570](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11408570).
- Thoma, F., Koller, T. and Klug, A., (1979), "*Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin*", *J Cell Biol*, **83**, 2 Pt 1, 403-427.,
- Tokunaga, M., Aoki, T., Hiroshima, M., Kitamura, K. and Yanagida, T., (1997), "*Subpiconewton intermolecular force microscopy*", *Biochem Biophys Res Commun*, **231**, 3, 566-569,  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9070846](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9070846).
- Tsai, S. C., Valkov, N., Yang, W. M., Gump, J., Sullivan, D. and Seto, E., (2000), "*Histone deacetylase interacts directly with DNA topoisomerase II*", *Nat Genet*, **26**, 3, 349-353.,  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11062478>  
[http://www.nature.com/cgi-taf/DynaPage.taf?file=/ng/journal/v26/n3/full/ng1100\\_349.html](http://www.nature.com/cgi-taf/DynaPage.taf?file=/ng/journal/v26/n3/full/ng1100_349.html)  
[http://www.nature.com/cgi-taf/DynaPage.taf?file=/ng/journal/v26/n3/abs/ng1100\\_349.html](http://www.nature.com/cgi-taf/DynaPage.taf?file=/ng/journal/v26/n3/abs/ng1100_349.html).
- Tskhovrebova, L., Trinick, J., Sleep, J. A. and Simmons, R. M., (1997), "*Elasticity and unfolding of single molecules of the giant muscle protein titin*", *Nature*, **387**, 6630, 308-312.,  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9153398>.
- van Holde, K. and Zlatanova, J., (1995), "*Chromatin higher order structure: chasing a mirage?*" *J Biol Chem*, **270**, 15, 8373-8376.,
- van Holde, K. E., "**Chromatin**", (1989), Springer-Verlag, New York.

- Wang, M. D., Yin, H., Landick, R., Gelles, J. and Block, S. M., (1997), "*Stretching DNA with optical tweezers*", *Biophys J*, **72**, 3, 1335-1346., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9138579>.
- Ward, W. S., (1993), "*Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa*", *Biol Reprod*, **48**, 6, 1193-1201, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8318576](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8318576).
- Widom, J., (1986), "*Physicochemical studies of the folding of the 100 A nucleosome filament into the 300 A filament. Cation dependence*", *J Mol Biol*, **190**, 3, 411-424, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3783706](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3783706).
- Wolffe, A. P. and Guschin, D., (2000), "*Review: Chromatin Structural Features and Targets That Regulate Transcription*", *J Struct Biol*, **129**, 2/3, 102-122,
- Wolffe, A. P. and Hayes, J. J., (1999), "*Chromatin disruption and modification*", *Nucleic Acids Res*, **27**, 3, 711-720,
- Zatssepina, O. V., Poliakov, V. and Chentsov Iu, S., (1983), "*[Electron microscopic study of the chromonema and chromomeres in mitotic and interphase chromosomes] (Article in Russian)*", *Tsitologija*, **25**, 2, 123-129, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6679413](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6679413).
- Zhou, Y. B., Gerchman, S. E., Ramakrishnan, V., Travers, A. and Muyldermans, S., (1998), "*Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome*", *Nature*, **395**, 6700, 402-405.,

# **XI. Informations légales, références des logiciels et des figures**

## **1. Informations légales**

L'article L. 122-4 du code de la propriété intellectuelle dispose que « toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite. Il en est de même pour la traduction, l'adaptation, la transformation, l'arrangement ou la reproduction par un art ou un procédé quelconque ». Toutefois, selon l'article L. 122-5 du code de propriété intellectuelle, sont autorisées :

- « [...] les copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective [...] » ;

- « sous réserve que soient indiqués clairement le nom de l'auteur et la source : [...] les analyses et courtes citations justifiées par le caractère critique, polémique, pédagogique, scientifique ou d'information de l'œuvre à laquelle elles sont incorporées ».

En conséquence, tout acte de reproduction, de représentation, de traduction, d'adaptation, d'arrangement ou de transformation des documents par quelque procédé que ce soit, en dehors des exceptions permises par l'article L. 122-5, constituerait une contrefaçon sanctionnée par les articles L. 335-2 et suivants du code de la propriété intellectuelle.

Source de ces extraits : Auteurs: MINISTERE DE L'EDUCATION NATIONALE et MINISTERE DE LA RECHERCHE, document nommé "*MENRT-Guide-Redaction-These-2001-09-28*".

## **2. Logiciels**

### **a. Cytofish**

Ce logiciel a été conçu par Yves Usson ([yves.usson@ujf-grenoble.fr](mailto:yves.usson@ujf-grenoble.fr)), Institut Albert Bonniot, La Tronche, France.

#### **b. Image tool** ©

S. Brent Dove ([dove@uthscsa.edu](mailto:dove@uthscsa.edu)), Dental Diagnostic Science, © UTHSCSA 1996-2002 Tous droits réservés. Téléchargeable gratuitement sur <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html> .

#### **c. Programme de détection de mouvement de pipette par corrélation d'image à 2 dimensions.**

Ce logiciel a été conçu par *Bahram Houchmandzadeh* ([bahram@spectro.ujf-grenoble.fr](mailto:bahram@spectro.ujf-grenoble.fr)) du Laboratoire de Spectrométrie Physique de Saint-Martin d'Hères, France.

#### **d. Origin**® 6

Origin® et OriginLab® sont des marques déposées d'OriginLab® Corporation, © 1991-2003. Tous droits réservés. [www.originlab.com](http://www.originlab.com).

#### **e. Scion**

Téléchargeable gratuitement sur [www.scioncorp.com](http://www.scioncorp.com).

### **3. Figures**

Les informations légales des figures sont toujours reportées en vert dans la légende de la figure. Les textes verts soulignés sont des liens internet vers la source. La pérennité de ces liens n'est hélas pas garantie. Toutes les figures appartenant à quelqu'un, le fichier de type « PDF » (**P**ortable **D**ocument **F**ormat) à partir duquel vous lisez ces lignes a été crypté. Ceci empêche *a priori* toute récupération et donc distribution des figures, tout en permettant leur visualisation dans le contexte de ce travail de thèse. A noter que le présent fichier est crypté et que *sous aucun prétexte* une version non cryptée ne sera fournie. Il existe toujours la possibilité d'obtenir une version papier de ce document par les filières universitaires habituelles.

Du fait du cryptage, il se peut que certains programmes capables d'afficher des fichiers PDF aient du mal à imprimer ce document. Je vous conseille alors d'utiliser le lecteur de fichier associé au logiciel qui a permis la création du présent document, nommément *Adobe*® *Acrobat*® *Reader* (version 5 minimum, téléchargeable gratuitement sur [www.adobe.fr](http://www.adobe.fr) ).

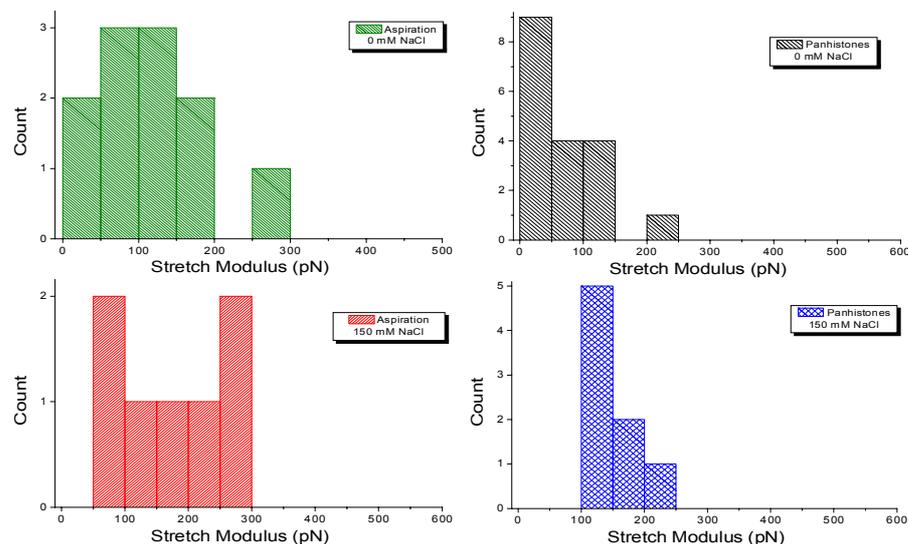
Du fait de la grande taille du fichier et de sa résolution, il se peut que la mémoire de l'ordinateur qui l'imprime ne soit pas suffisante. Ceci peut-être évité en imprimant la thèse par morceaux (et non en seul bloc) ou alors (plus compliqué) en obligeant le système d'exploitation de l'ordinateur à envoyer les informations directement sur l'imprimante (pas de « spool » de l'impression).

## **XII. Annexes**

### **1. Elasticité de la chromatine en présence de 150 mM NaCl**

La technique d'aspiration permet de saisir toute la section du chromosome, alors que la technique de collage des histones permet d'étirer spécifiquement la chromatine. Les valeurs moyennes/pics de résistance à l'étirement obtenues dans les conditions natives sont de 120 pN pour toute la section du chromosome (cf. Figure XII.1-A) et de 30 pN pour la chromatine (cf. Figure XII.1-C).

L'augmentation de la force ionique (ajout de 150 mM NaCl au milieu) permet d'enlever un certain nombre de protéines dont la topoisomérase II. Lorsque la force ionique augmente, nous observons que la valeur du chromosome pris par toute sa section passe à 180 pN (cf. Figure XII.1-B) et celle de la chromatine à 120 pN (cf. Figure XII.1-D). Exprimée de manière relative, l'adjonction de 150 mM de NaCl provoque une augmentation de 50 % de la résistance à l'étirement du chromosome entier et une augmentation de 400 % de celle de la chromatine.



**Figure XII.1 : Influence de la force ionique sur la résistance à l'étirement de la chromatine.**

(© Sébastien Almagro, 2003)

(Count= nombre de mesures). Ces 4 graphiques représentent les distributions de stretch modulus obtenues pour : **(A)** Le chromosome pris par toute sa section (aspiré) dans des conditions natives ; **(B)** Le chromosome pris par toute sa section à 150 mM NaCl ; **(C)** La chromatine (panhistones) dans des conditions natives ; **(D)** La chromatine à 150 mM NaCl.

**2. Programme permettant le déplacement des pipettes aux vitesses inférieures à celles prévues par le constructeur du micromanipulateur**

Ce programme (© Sébastien Almagro, 2001) a été écrit sous *Microsoft Visual Basic*® (32 bits). Il fonctionne donc avec *Microsoft*® *Visual Basic*® version 4, 5 et 6. La version présentée ci-dessous a été écrite pour *Microsoft*® *Visual Basic*® 5 Professionnel. Pour récupérer le programme et le faire fonctionner, pour chaque rubrique correspondant à un fichier, copier le texte de chacune des rubriques et enregistrer le sous le nom du fichier donné (sutter4.vbp, module1.bas et form1.frm). Puis ouvrez le projet « sutter4.vbp » avec *Microsoft*® *Visual Basic*®.

**a. Fichier de projet : « sutter4.vbp »**

```
Type=Exe
Form=sutter4.frm
Object={BDC217C8-ED16-11CD-956C-0000C04E4C0A}#1.1#0; TABCTL32.OCX
Object={3B7C8863-D78F-101B-B9B5-04021C009402}#1.1#0; RICHTX32.OCX
Object={FAEEE763-117E-101B-8933-08002B2F4F5A}#1.1#0; DBLIST32.OCX
Object={00028C01-0000-0000-0000-000000000046}#1.0#0; DBGRID32.OCX
Object={F6125AB1-8AB1-11CE-A77F-08002B2F4E98}#2.0#0; MSRDC20.OCX
Reference=*\G{00020430-0000-0000-C000-000000000046}#2.0#0#..\..\..\..\WINDOWS\SYSTEM\stdole2.tlb#Standard OLE
Types
Reference=*\G{EE008642-64A8-11CE-920F-08002B369A33}#1.0#0#..\..\..\..\WINDOWS\SYSTEM\msrdo20.dll#Microsoft
Remote Data Object 1.0
Object={648A5603-2C6E-101B-82B6-000000000014}#1.1#0; MSCOMM32.OCX
Module=Module1; ..\..\..\..\WINDOWS\Bureau\sutter4\sutter4.bas
IconForm="Form1"
Startup="Form1"
Command32=""
```

```
Name="Projet1"  
HelpContextID="0"  
CompatibleMode="0"  
MajorVer=1  
MinorVer=0  
RevisionVer=0  
AutoIncrementVer=0  
ServerSupportFiles=0  
VersionCompanyName="lsp"  
CompilationType=0  
OptimizationType=0  
FavorPentiumPro(tm)=0  
CodeViewDebugInfo=0  
NoAliasing=0  
BoundsCheck=0  
OverflowCheck=0  
FlPointCheck=0  
FDIVCheck=0  
UnroundedFP=0  
StartMode=0  
Unattended=0  
ThreadPerObject=0  
MaxNumberOfThreads=1
```

### **b. Fichier de module : « MODULE1.bas »**

```
Attribute VB_Name = "Module1"  
Option Explicit  
  
Global tableau_recu(1 To 12) As Byte  
Global tableau_coords_byte(1 To 12) As Byte  
Global tableau_coords_steps(1 To 3), tableau_coords_micron(1 To 3) As  
Double  
Global amplitude_move_steps As Long  
Global vit_steps As Long  
Global interval_temps_steps As Double  
Global wished_y As Long
```

### **c. Fichier de form : « form1.frm »**

```
VERSION 5.00  
Object = "{648A5603-2C6E-101B-82B6-000000000014}#1.1#0"; "MSCOMM32.OCX"  
Begin VB.Form Form1  
    BackColor = &H00C0C0C0&  
    Caption = "Form1"  
    ClientHeight = 3828  
    ClientLeft = 1188  
    ClientTop = 1500  
    ClientWidth = 6480  
    LinkTopic = "Form1"  
    PaletteMode = 1 'UseZOrder  
    ScaleHeight = 3828  
    ScaleWidth = 6480  
    Begin VB.CheckBox Check4  
        BackColor = &H00C0C0C0&  
        Caption = "Vers le bas"  
        BeginProperty Font  
            Name = "Times New Roman"  
            Size = 9.6
```

```

        Charset      = 0
        Weight       = 700
        Underline    = 0 'False
        Italic       = -1 'True
        Strikethrough = 0 'False
    EndProperty
    ForeColor      = &H00FF0000&
    Height         = 495
    Left           = 5040
    TabIndex       = 25
    Top            = 2280
    Width          = 1335
End
Begin VB.CheckBox Check3
    BackColor      = &H00C0C0C0&
    Caption        = "Vers le haut"
    BeginProperty Font
        Name        = "Times New Roman"
        Size        = 9.6
        Charset     = 0
        Weight      = 700
        Underline   = 0 'False
        Italic      = -1 'True
        Strikethrough = 0 'False
    EndProperty
    ForeColor      = &H00FF0000&
    Height         = 495
    Left           = 5040
    TabIndex       = 24
    Top            = 1920
    Width          = 1335
End
Begin VB.Frame Frame9
    Caption        = "Vitesse souhaitée (en µsteps/secondes)"
    BeginProperty Font
        Name        = "Times New Roman"
        Size        = 9.6
        Charset     = 0
        Weight      = 700
        Underline   = 0 'False
        Italic      = -1 'True
        Strikethrough = 0 'False
    EndProperty
    ForeColor      = &H00FF0000&
    Height         = 735
    Left           = 0
    TabIndex       = 22
    Top            = 1920
    Width          = 3375
    Begin VB.TextBox text9
        Height      = 375
        Left        = 960
        TabIndex    = 23
        Top         = 240
        Width       = 1455
    End
End
Begin VB.CommandButton Command3
    Caption        = "Stretch !!!"
    Height        = 615
    Left          = 0

```

```
    TabIndex      = 21
    Top           = 1320
    Width         = 855
End
Begin VB.CheckBox Check2
    BackColor     = &H00C0C0C0&
    Caption       = "Aller/Retour"
    BeginProperty Font
        Name       = "Times New Roman"
        Size       = 9.6
        Charset    = 0
        Weight     = 700
        Underline  = 0 'False
        Italic     = -1 'True
        Strikethrough = 0 'False
    EndProperty
    ForeColor     = &H00FF0000&
    Height        = 495
    Left          = 3600
    TabIndex      = 20
    Top           = 2280
    Width         = 1455
End
Begin VB.CheckBox Check1
    BackColor     = &H00C0C0C0&
    Caption       = "Aller simple"
    BeginProperty Font
        Name       = "Times New Roman"
        Size       = 9.6
        Charset    = 0
        Weight     = 700
        Underline  = 0 'False
        Italic     = -1 'True
        Strikethrough = 0 'False
    EndProperty
    ForeColor     = &H00FF0000&
    Height        = 495
    Left          = 3600
    TabIndex      = 19
    Top           = 1920
    Width         = 1335
End
Begin VB.Frame Frame8
    Caption       = "Number of times to stretch"
    BeginProperty Font
        Name       = "Times New Roman"
        Size       = 9.6
        Charset    = 0
        Weight     = 700
        Underline  = 0 'False
        Italic     = -1 'True
        Strikethrough = 0 'False
    EndProperty
    ForeColor     = &H00FF0000&
    Height        = 735
    Left          = 3960
    TabIndex      = 17
    Top           = 1200
    Width         = 2415
    Begin VB.TextBox Text8
        Height     = 375
```

```

        Left           = 120
        TabIndex      = 18
        Top           = 240
        Width         = 1215
    End
End
Begin VB.Frame Frame7
    Caption           = "Initial length of the chromosome"
    BeginProperty Font
        Name           = "Times New Roman"
        Size           = 9.6
        Charset        = 0
        Weight         = 700
        Underline      = 0 'False
        Italic         = -1 'True
        Strikethrough  = 0 'False
    EndProperty
    ForeColor        = &H00FF0000&
    Height           = 735
    Left             = 960
    TabIndex        = 14
    Top              = 1200
    Width           = 2895
    Begin VB.TextBox Text7
        Height         = 375
        Left           = 120
        TabIndex      = 15
        Top           = 240
        Width         = 1215
    End
    Begin VB.Label Label1
        AutoSize       = -1 'True
        Caption        = "(in µm)"
        BeginProperty Font
            Name       = "Times New Roman"
            Size       = 12
            Charset    = 0
            Weight     = 400
            Underline  = 0 'False
            Italic     = 0 'False
            Strikethrough = 0 'False
        EndProperty
        Height        = 285
        Left         = 1560
        TabIndex     = 16
        Top          = 240
        Width        = 630
    End
End
End
Begin VB.Frame Frame6
    Caption           = "Z move (in µm)"
    BeginProperty Font
        Name           = "MS Sans Serif"
        Size           = 7.8
        Charset        = 0
        Weight         = 700
        Underline      = 0 'False
        Italic         = -1 'True
        Strikethrough  = 0 'False
    EndProperty
    ForeColor        = &H0000C0C0&

```

```
Height          = 855
Left            = 4920
TabIndex       = 12
Top            = 2880
Width          = 1455
Begin VB.TextBox Text6
  BackColor     = &H00C0C0C0&
  BeginProperty Font
    Name        = "System"
    Size        = 9.6
    Charset     = 0
    Weight      = 700
    Underline   = 0 'False
    Italic      = 0 'False
    Strikethrough = 0 'False
  EndProperty
  ForeColor     = &H0000C0C0&
  Height        = 495
  Left         = 120
  TabIndex     = 13
  Top          = 240
  Width        = 1215
End
End
Begin VB.Frame Frame5
  Caption       = "Y move (in µm)"
  BeginProperty Font
    Name        = "MS Sans Serif"
    Size        = 7.8
    Charset     = 0
    Weight      = 700
    Underline   = 0 'False
    Italic      = -1 'True
    Strikethrough = 0 'False
  EndProperty
  ForeColor     = &H000000FF&
  Height        = 855
  Left         = 3360
  TabIndex     = 10
  Top          = 2880
  Width        = 1455
  Begin VB.TextBox Text5
    BackColor     = &H00C0C0C0&
    BeginProperty Font
      Name        = "System"
      Size        = 9.6
      Charset     = 0
      Weight      = 700
      Underline   = 0 'False
      Italic      = 0 'False
      Strikethrough = 0 'False
    EndProperty
    ForeColor     = &H000000FF&
    Height        = 495
    Left         = 120
    TabIndex     = 11
    Top          = 240
    Width        = 1215
  End
End
End
Begin VB.Frame Frame4
```

```

Caption          = "X move (in µm)"
BeginProperty Font
  Name           = "MS Sans Serif"
  Size          = 7.8
  Charset       = 0
  Weight        = 700
  Underline     = 0 'False
  Italic        = -1 'True
  Strikethrough = 0 'False
EndProperty
ForeColor       = &H00008000&
Height         = 855
Left           = 1800
TabIndex       = 8
Top            = 2880
Width          = 1455
Begin VB.TextBox Text4
  BackColor     = &H00C0C0C0&
  BeginProperty Font
    Name        = "System"
    Size       = 9.6
    Charset    = 0
    Weight     = 700
    Underline  = 0 'False
    Italic    = 0 'False
    Strikethrough = 0 'False
  EndProperty
  ForeColor    = &H00008000&
  Height      = 495
  Left       = 120
  TabIndex   = 9
  Top       = 240
  Width     = 1215
End
End
Begin VB.CommandButton Command2
  Caption      = "MOVE !!!!!"
  Height      = 855
  Left       = 0
  TabIndex   = 7
  Top       = 2880
  Width     = 1695
End
End
Begin VB.Timer Timer1
  Left      = 4080
  Top      = 4440
End
End
Begin VB.Frame Frame3
  Caption   = "current Z"
  BeginProperty Font
    Name        = "MS Sans Serif"
    Size       = 7.8
    Charset    = 0
    Weight     = 700
    Underline  = 0 'False
    Italic    = -1 'True
    Strikethrough = 0 'False
  EndProperty
  ForeColor  = &H0000C0C0&
  Height    = 855
  Left     = 4920

```

Programme permettant le déplacement des pipettes aux vitesses inférieures à celles prévues par le constructeur du micromanipulateur

```
TabIndex      = 5
Top           = 0
Width        = 1455
Begin VB.TextBox Text3
  BackColor   = &H00C0C0C0&
  BeginProperty Font
    Name       = "System"
    Size       = 9.6
    Charset    = 0
    Weight     = 700
    Underline  = 0 'False
    Italic     = 0 'False
    Strikethrough = 0 'False
  EndProperty
  ForeColor   = &H0000C0C0&
  Height      = 495
  Left        = 120
  TabIndex    = 6
  Top         = 240
  Width       = 1215
End
End
Begin VB.Frame Frame2
  Caption     = "current Y"
  BeginProperty Font
    Name       = "MS Sans Serif"
    Size       = 7.8
    Charset    = 0
    Weight     = 700
    Underline  = 0 'False
    Italic     = -1 'True
    Strikethrough = 0 'False
  EndProperty
  ForeColor   = &H000000FF&
  Height      = 855
  Left        = 3360
  TabIndex    = 3
  Top         = 0
  Width       = 1455
  Begin VB.TextBox Text2
    BackColor  = &H00C0C0C0&
    BeginProperty Font
      Name      = "System"
      Size      = 9.6
      Charset   = 0
      Weight    = 700
      Underline = 0 'False
      Italic    = 0 'False
      Strikethrough = 0 'False
    EndProperty
    ForeColor  = &H000000FF&
    Height     = 495
    Left       = 120
    TabIndex   = 4
    Top        = 240
    Width      = 1215
  End
End
End
Begin VB.CommandButton Command1
  Caption     = "Get current position"
  Height      = 855
```

```

    Left           = 0
    TabIndex      = 0
    Top           = 0
    Width         = 1695
End
Begin VB.Frame Frame1
    Caption       = "current X"
    BeginProperty Font
        Name       = "MS Sans Serif"
        Size       = 7.8
        Charset    = 0
        Weight     = 700
        Underline  = 0 'False
        Italic     = -1 'True
        Strikethrough = 0 'False
    EndProperty
    ForeColor     = &H00008000&
    Height        = 855
    Left         = 1800
    TabIndex     = 1
    Top          = 0
    Width        = 1455
    Begin VB.TextBox Text1
        BackColor  = &H00C0C0C0&
        BeginProperty Font
            Name    = "System"
            Size    = 9.6
            Charset = 0
            Weight  = 700
            Underline = 0 'False
            Italic  = 0 'False
            Strikethrough = 0 'False
        EndProperty
        ForeColor  = &H00008000&
        Height     = 495
        Left      = 120
        TabIndex  = 2
        Top       = 240
        Width     = 1215
    End
End
Begin MSCommLib.MSComm MSComm1
    Left       = 5640
    Top        = 4320
    _ExtentX   = 995
    _ExtentY   = 995
    _Version   = 327680
    CommPort   = 2
    DTREnable  = -1 'True
End
End
Attribute VB_Name = "Form1"
Attribute VB_GlobalNameSpace = False
Attribute VB_Creatable = False
Attribute VB_PredeclaredId = True
Attribute VB_Exposed = False

Private Sub Command1_Click()

' Utilise COM2.

```

Programme permettant le déplacement des pipettes aux vitesses inférieures à celles prévues par le constructeur du micromanipulateur

```
Call open_port_9600

'envoyer la demande de connaissance de la position
Form1.MSComm1.Output = "c" + Chr(13)

'petit délai d'attente pour la réception
Call attente_reception

'vérifier si il y a quelque chose dans le tampon de réception
If Form1.MSComm1.InBufferCount Then

    Call reception_3_integer
    Call steps_to_micron
    Call affichage_coords_micron

    DoEvents

ElseIf MSComm1.InBufferCount = 0 Then
    Form1.Text1.Text = "Problème de"
    Form1.Text2.Text = "communication"
    Form1.Text3.Text = "avec l'appareil"
Text4.Text = Str(Form1.MSComm1.InBufferCount)
Else
    Form1.Text1.Text = "?????????"
End If

Call close_port
End Sub

Public Function open_port_9600()

Form1.MSComm1.Settings = "9600,n,8,1"
Form1.MSComm1.PortOpen = 2
Form1.MSComm1.InputLen = 1 'lecture 1 chose apres l'autre

End Function

Public Function attente_reception()

duration! = Timer + 0.01 'temps en secondes intervalle
Do Until Timer > duration!
DoEvents
Loop

End Function

Public Function reception_3_integer()
```

```

Dim i, compteur As Byte
Dim inter As Long
Dim recu As String

'je met les données du tampon de reception une à une dans un
tableau

For i = 1 To 12 Step 1
    recu = MSComm1.Input
    inter = Asc(recu)
    tableau_recu(i) = CByte(inter)
Next

'je vide ensuite le tampon de reception du chr(13) qui reste (13 èmé donnée
du tampon)
recu = MSComm1.Input
recu = ""

'initialisation du tableau qui va contenir les coordonnées en steps

For i = 1 To 3 Step 1
    tableau_coords_steps(i) = 0
Next

'je vais maintenant transformer pour 4 bytes en un integer. je fais ca pour
x, y et z.

compteur = 1 'je commence pour les 4 bytes pour X

'je les tranforme pour avoir un integer
For i = 1 To 4 Step 1
    tableau_coords_steps(compteur) = tableau_coords_steps(compteur) +
tableau_recu(i) * 2 ^ ((i - 1) * 8)
Next

compteur = 2 'puis les 4 bytes pour Y

For i = 5 To 8 Step 1
    tableau_coords_steps(compteur) = tableau_coords_steps(compteur) +
tableau_recu(i) * 2 ^ ((i - 5) * 8)
Next

compteur = 3 'et enfin les 4 bytes pour Z

'je les tranforme pour avoir un integer
For i = 9 To 12 Step 1
    tableau_coords_steps(compteur) = tableau_coords_steps(compteur) +
tableau_recu(i) * 2 ^ ((i - 9) * 8)
Next

End Function

Public Function coords_long_to_byte()

Dim puissance As Long

```

Programme permettant le déplacement des pipettes aux vitesses inférieures à celles prévues par le constructeur du micromanipulateur

```
Dim fin As Boolean
Dim i As Long
Dim poids(1 To 4) As Byte
Dim tableau_coords_byte_transitoire(1 To 4) As Byte
Dim compteur_poids As Byte

For i = 1 To 12 Step 1
tableau_coords_byte(i) = 0

Next

'*****
fin = False

For i = 1 To 4 Step 1
    poids(i) = 0
    tableau_coords_byte_transitoire(i) = 0
Next

compteur_poids = 0

'pour x
'je vais chercher a decomposer la coordonnée x en puissance de deux
successives.

i = 1

Do

    puissance = -1 ' en partant de -1 pour la puissance, en ajoutant 1 deux
lignes après, je me retrouve avec une puissance égale à 0

    Do
        puissance = puissance + 1 'je regarde quel
est la plus grande puissance de deux qui puisse être supérieure à la
coordonnée
        If tableau_coords_steps(1) = 0 Then fin = True 'notre coordonnée
est égale à zéro, donc elle a été totalement définie par 1 ou plusieurs des
4 bytes. le passage de long a byte pour cette coordonnée est donc effectué.
        Loop Until 2 ^ puissance > tableau_coords_steps(1) 'la boucle s'arrête
quand on trouve une puissance de 2 supérieure à notre coordonnée

        If tableau_coords_steps(1) Then 'si la coordonnée n'est pas nulle
alors on déduit la puissance de 2 immédiatement inférieure à celle qui
était supérieure à notre coordonnée
            tableau_coords_steps(1) = tableau_coords_steps(1) - (2 ^ puissance
- 2 ^ (puissance - 1))

            If tableau_coords_byte_transitoire(i) + CByte(puissance - 1) <
256 Then 'si lorsque je j'ajoute la puissance au tableau de bytes, je
regarde si je suis au maximum de données que peuvent porter ce byte
                tableau_coords_byte_transitoire(i) = CByte(puissance - 1)
            Else
                i = i + 1 ' si le byte est plein, alors je prends le byte
qui va être de poids inférieur, donc celui de i supérieur
                tableau_coords_byte_transitoire(i) = CByte(puissance - 1)
            End If
        End If
    End Do
End Do
```

```

        End If

    Else
        tableau_coords_byte_transitoire(i) = 0
    End If

Loop Until fin = True

' détection du nombre de données
compteur_poids = 0 'le nombre de données contenue dans le tableau
transitoire va permettre de ranger ensuite les données selon leur poids,
donc sur l'ordre quel doivent avoir lors de l'envoi au controlleur

For i = 1 To 4 Step 1
    If tableau_coords_byte_transitoire(i) > 0 Then compteur_poids =
compteur_poids + 1
Next

'rangement dans le tableau des données : i petit => poids élevé
For i = compteur_poids To 1 Step -1
    tableau_coords_byte(i) = tableau_coords_byte_transitoire(compteur_poids
+ 1 - i)
Next

End Function

Public Function affichage_coords_micron()

Form1.Text1.Text = Str(tableau_coords_micron(1)) 'affiche X
Form1.Text2.Text = Str(tableau_coords_micron(2)) 'affiche y
Form1.Text3.Text = Str(tableau_coords_micron(3)) 'affiche z

End Function

Public Function close_port()
Form1.MSComm1.PortOpen = False

End Function

Private Sub Command3_Click()

Dim etir_longueur As Long
Dim longueur_chro_micron As Double
Dim vit_souhaitee As Double

Call Command1_Click 'récupération des coordonnées au moment de l'étirement

'récupération des paramètres d'étirement
longueur_chro_micron = Val(Form1.Text7.Text)
nombre_etir = Val(Form1.Text8.Text)
vit_souhaitee = Val(Form1.text9.Text)

'passage de µm en steps + prise de la partie entiere car mouvement de
fraction de steps impossible !

amplitude_move_steps = Int(longueur_chro_micron * 25) * Int(nombre_etir)
vit_steps = Int(vit_souhaitee)

```

```
'trouve le y final
Call coords_fin_move

'calcul des coordonnées pour un mouvement de 1 step dans la bonne direction.
Call coords_transitoires
Call coords_long_to_byte

'quel intervalle de temps entre les steps ?
interval_temps_steps = 1 / vit_steps

End Sub

Public Function deplacement()

End Function

Public Function coords_fin_move()
'calcul des coordonnées à atteindre à la fin du déplacement

'déplacement selon y
wished_y = tableau_coords_steps(2) + amplitude_move_steps

End Function

Public Sub coords_transitoires()

Dim x As Double

'je change les coordonnées de y d'une valeur 1 ou -1

If Form1.Check3.Value Then x = 1
If Form1.Check4.Value Then: x = -1

tableau_coords_steps(2) = tableau_coords_steps(2) + x

End Sub

Public Function steps_to_micron()
Dim i As Byte
For i = 1 To 3
tableau_coords_micron(i) = 0.04 * tableau_coords_steps(i)
Next
End Function
```

### 3. Programme permettant de mesurer les fluctuations d'un chromosome

Ce programme (© Sébastien Almagro, 2001) a été écrit sous *Microsoft® Visual Basic® 6 professionnel*. Il fonctionne avec *Microsoft® Visual Basic® 6* mais doit pouvoir fonctionner avec les versions 4 et 5 (attention à la gestion de l'opérateur « With » dans ces versions-ci). Pour récupérer le programme et le faire fonctionner, pour chaque rubrique correspondant à un fichier, copier le texte de chacune des rubriques et enregistrer le sous le nom du fichier donné (Angle\_evol.vbp, module1.bas, SEB.cls, Fit\_class.cls et form1.frm). Puis ouvrez le projet « Angle\_evol.vbp » avec *Microsoft® Visual Basic®*.

#### a. Fichier de projet : « Angle\_evol.vbp »

```
Type=Exe
Form=Form1.frm
Reference=*\G{00020430-0000-0000-C000-000000000046}#2.0#0#..\..\SYSTEM\StdOle2.Tlb#OLE Automation
Module=Module1; Module1.bas
Object={F9043C88-F6F2-101A-A3C9-08002B2F49FB}#1.2#0; COMDLG32.OCX
Class=SEB; SEB.cls
Class=Fit_class; Fit_class.cls
IconForm="F1"
Startup="F1"
HelpFile=""
Title="Projet1"
ExeName32="lp_seb_2.exe"
Path32=".."
Command32=""
Name="Projet1"
HelpContextID="0"
CompatibleMode="0"
MajorVer=1
MinorVer=0
RevisionVer=0
AutoIncrementVer=0
ServerSupportFiles=0
VersionCompanyName="SEB"
CompilationType=0
OptimizationType=0
FavorPentiumPro(tm)=0
CodeViewDebugInfo=0
NoAliasing=0
BoundsCheck=0
OverflowCheck=0
FlPointCheck=0
FDIVCheck=0
UnroundedFP=-1
StartMode=0
Unattended=0
Retained=0
ThreadPerObject=0
MaxNumberOfThreads=1
```

**b. Fichier de module : « module1.bas »**

```
Attribute VB_Name = "Module1"
Option Explicit

Public Const MAX_PATH = 260

Public Type FILETIME
    dwLowDateTime As Long
    dwHighDateTime As Long
End Type

Public Type WIN32_FIND_DATA
    dwFileAttributes As Long
    ftCreationTime As FILETIME
    ftLastAccessTime As FILETIME
    ftLastWriteTime As FILETIME
    nFileSizeHigh As Long
    nFileSizeLow As Long
    dwReserved0 As Long
    dwReserved1 As Long
    cFileName As String * MAX_PATH
    cAlternate As String * 14
End Type

Public Type POINTAPI
    X As Long
    Y As Long
End Type

Public pt1 As POINTAPI
Public pt2 As POINTAPI
Public pt3 As POINTAPI
Public pthG As POINTAPI
Public ptbD As POINTAPI
Public pt As POINTAPI
Public ERREUR As Boolean
Public datas() As Long
Public f() As String
Public chemin As String

Public results As String
Public tab_r() As Long
Public tab_m() As Double
'Public pix_val As Byte
Public tab_co() As Double
Public tab_test() As Double

'la méthode de détermination du minimum
'à l'aide d'1 pt est celle par défaut
Public methode_3_pts As Boolean
Public methode_corr_9_pix As Boolean

Public all_pics_in_memory As Boolean
Public tab_pics() As IPictureDisp

Public pt_view_results(0 To 2, 0 To 1) As Single
Public X_image As Single
Public Y_image As Single
Public marqueur As Long
```

```

Public taille_init_image(0 To 1) As Single
Public offset As Single

Public Fit_classe As Fit_class

Public Declare Function GetCursorPos Lib "user32" (lpPoint As POINTAPI) As
Long
Public Declare Function GetPixel Lib "gdi32" (ByVal hdc As Long, ByVal X As
Long, ByVal Y As Long) As Long
Public Declare Function GetDC Lib "user32" (ByVal hwnd As Long) As Long

Public Declare Function FindClose Lib "kernel32" (ByVal hFindFile As Long)
As Long
Public Declare Function FindFirstFile Lib "kernel32" Alias "FindFirstFileA"
(ByVal lpFileName As String, lpFindFileData As WIN32_FIND_DATA) As Long
Public Declare Function FindNextFile Lib "kernel32" Alias "FindNextFileA"
(ByVal hFindFile As Long, lpFindFileData As WIN32_FIND_DATA) As Long

Public Declare Sub Sleep Lib "kernel32" (ByVal dwMilliseconds As Long)
Public Declare Function SetPixel Lib "gdi32" (ByVal hdc As Long, ByVal X As
Long, ByVal Y As Long, ByVal crColor As Long) As Long

Public Declare Function GetTickCount Lib "kernel32" () As Long

Public Sub ouvrir_dossier()
Dim s As String
Dim pos As Long
Dim rep
Dim r As WIN32_FIND_DATA
Dim Handle As Long
Dim compt As Long
Dim i As Long
Dim i_error As Long

On Error GoTo error_handler

compt = 0

With F1.CD1
.DialogTitle = " choisissez un fichier pour tout avoir"
.FileName = ""
.Filter = "*.bmp|*.bmp"
.ShowOpen
If .FileName = "" Then Exit Sub
s = .FileName
End With
s = StrReverse(s)
pos = InStr(1, s, "\")
pos = pos - 1
s = StrReverse(s)
chemin = Left(s, Len(s) - pos)

Handle = FindFirstFile(chemin + "*.bmp", r)
If Handle < 2 Then
Handle = FindClose(Handle)
compt = 0
MsgBox CStr(compt) & "fichiers trouvés"
Exit Sub
End If

```

```
ReDim f(compt)
f(compt) = r.cFileName

Do

    rep = FindNextFile(Handle, r)
    If rep = 1 Then
        compt = compt + 1
        ReDim Preserve f(compt)
        f(compt) = r.cFileName
    Else
        Exit Do
    End If

Loop

Handle = FindClose(Handle)

'enlèvement des caractères nuls
'de la chaîne de longueur fixe
For i = 0 To compt
    pos = InStr(1, f(i), Chr(0), vbBinaryCompare)
    f(i) = Left(f(i), pos - 1)
Next i

With F1.scb1
    .min = 0
    .max = compt
End With

MsgBox Str(compt + 1) & "fichiers trouvés"

If all_pics_in_memory Then
    F1.Caption = "Allocation de la mémoire pour les images en cours ..."
    ReDim tab_pics(compt)

    For i = 0 To compt
        F1.Caption = "chargement en mémoire de l'image n°" + CStr(i)
        Set tab_pics(i) = LoadPicture(f(i))
    Next
    F1.Caption = "Angle évolution par Seb"
End If

With F1.Image1
    .Stretch = False
End With

DoEvents

marqueur = 256 ^ 3
F1.scb1_Change

taille_init_image(0) = F1.Image1.Height
taille_init_image(1) = F1.Image1.Width
Exit Sub

'gestion de l'erreur mémoire (erreur la + probable)
error_handler:
MsgBox "Erreur n°" & CStr(Err.Number) & ":" & Err.Description, vbCritical,
"Erreur", Err.HelpFile, Err.HelpContext
```

```

i_error = i - 1

F1.Caption = "Nettoyage de la mémoire..."

For i = i_error To 0 Step (-1)
    Set tab_pics(i) = Nothing
Next

ReDim tab_pics(0)

F1.Caption = "Angle évolution par Seb"

End Sub

Public Sub analyse()
Dim i As Long
Dim im As Long
Dim v As Long
Dim min As Long
Dim max As Long
Dim compt As Long
Dim j As Long

im = 0

min = pthG.Y
max = ptbD.Y
ReDim tab_r(2, (max - min))
ReDim tab_m(2, CLng(F1.scb1.max))

For im = 0 To F1.scb1.max
    If all_pics_in_memory Then
        F1.Image1 = tab_pics(im)
    Else
        F1.Image1 = LoadPicture(f(im))
    End If

    F1.Caption = Str(im)
    F1.Refresh
    DoEvents
    compt = -1
    For i = min To max
        compt = compt + 1
        v = GetPixel(GetDC(0), pt1.X, i)
        tab_r(0, compt) = v
        v = GetPixel(GetDC(0), pt2.X, i)
        tab_r(1, compt) = v
        v = GetPixel(GetDC(0), pt3.X, i)
        tab_r(2, compt) = v
    Next
    If methode_3_pts Then
        Fit_classe.trouve_min_3_pixels compt, im
    Else
        Fit_classe.trouve_min_1_pixel compt, im
    End If
    If ERREUR Then Exit Sub
Next

get_coords compt
calc_cosangle

```

```
affich_results

End Sub

Public Sub get_coords(compt)
Dim i
ReDim tab_co(CLng(F1.scb1.max - 1), 7) 'x1,y1,x2,y2,x3,y3,cos(angle_deg),l

For i = 0 To CLng(F1.scb1.max - 1)
    F1.Caption = "get_coords " + CStr(i)
    tab_co(i, 0) = CDb1(pt1.X)
    tab_co(i, 1) = tab_m(0, i)
    tab_co(i, 2) = CDb1(pt2.X)
    tab_co(i, 3) = tab_m(1, i)
    tab_co(i, 4) = CDb1(pt3.X)
    tab_co(i, 5) = tab_m(2, i)
Next i

End Sub

Public Sub calc_cosangle()
Dim scal As Double
Dim vect1 As Double
Dim vect2 As Double
Dim r As Double
Dim i As Long

For i = 1 To CLng(F1.scb1.max - 1) 'j'attaque à la seconde tjrs
    F1.Caption = "calc_cos_angle & longueur : " + CStr(i)
    scal = (tab_co(i, 4) - tab_co(i, 2)) * (tab_co(i, 0) - tab_co(i, 2)) +
(tab_co(i, 5) - tab_co(i, 3)) * (tab_co(i, 1) - tab_co(i, 3))
    vect1 = Sqr((tab_co(i, 4) - tab_co(i, 2)) ^ 2 + (tab_co(i, 5) -
tab_co(i, 3)) ^ 2)
    vect2 = Sqr((tab_co(i, 0) - tab_co(i, 2)) ^ 2 + (tab_co(i, 1) -
tab_co(i, 3)) ^ 2)
    tab_co(i, 6) = Round(scal / (vect1 * vect2), 3)
    tab_co(i, 7) = Round((vect1 + vect2), 3)
Next i

End Sub

Public Sub affich_results()
Dim i As Long
Dim s As String
Dim c As String * 1
Dim taille As Double

c = Chr(9)

results = "image" + c + "X1" + c + "Y1" + c + "X2" + c + "Y2" + c + "X3" +
c + "Y3" + c + "cosangle" + c + "longueur" + vbNewLine

For i = 0 To (F1.scb1.max - 1)
    F1.Caption = "affich_results " + CStr(i)
    s = ""
    s = CStr(i) + c
    s = s + CStr(tab_co(i, 0)) + c
    s = s + remove_virg_to_point(CStr(tab_co(i, 1))) + c
    s = s + CStr(tab_co(i, 2)) + c
```

```

    s = s + remove_virg_to_point(CStr(tab_co(i, 3))) + c
    s = s + CStr(tab_co(i, 4)) + c
    s = s + remove_virg_to_point(CStr(tab_co(i, 5))) + c
    s = s + remove_virg_to_point(CStr(tab_co(i, 6))) + c
    s = s + remove_virg_to_point(CStr(tab_co(i, 7))) + vbNewLine
    results = results + s
Next i

Clipboard.Clear
Clipboard.SetText results, vbCFTText

taille = CDBl(Len(results)) / 1024
taille = Int(taille)
F1.Caption = "affich_results : " + CStr(taille) + " Ko copiées dans le
presse papier."
End Sub

Public Sub view_movie_detection_results()
Dim i As Long
Dim X1 As Single
Dim Y1 As Single
Dim X2 As Single
Dim Y2 As Single
Dim x3 As Single
Dim y3 As Single

init_ronds

For i = 0 To (F1.scb1.max - 1)

    X1 = pt_view_results(0, 0) + F1.Imagel.Left
    Y1 = CSng(tab_co(i, 1)) * Screen.TwipsPerPixelY + F1.Imagel.Top
    X2 = pt_view_results(1, 0) + F1.Imagel.Left
    Y2 = CSng(tab_co(i, 3)) * Screen.TwipsPerPixelY + F1.Imagel.Top
    x3 = pt_view_results(2, 0) + F1.Imagel.Left
    y3 = CSng(tab_co(i, 5)) * Screen.TwipsPerPixelY + F1.Imagel.Top

    F1.Imagel = LoadPicture(f(i))
    F1.Imagel.Refresh
    DoEvents
    dessin_ronds X1, Y1, 0
    DoEvents
    dessin_ronds X2, Y2, 1
    DoEvents
    dessin_ronds x3, y3, 2
    DoEvents

    'Sleep 10
Next i

End Sub

Public Sub init_ronds()
Dim n As Integer

For n = 0 To 2
    F1.Shapel.Item(n).Visible = True
Next

```

```
End Sub
Public Sub cache_ronds()
Dim n As Integer

    For n = 0 To 2
        F1.Shapel.Item(n).Visible = False
    Next

End Sub

Public Sub dessin_ronds(X As Single, Y As Single, n As Integer)
On Error Resume Next
    F1.Shapel.Item(n).Top = Y - Int(F1.Shapel.Item(n).Height / 2) + (offset
* Screen.TwipsPerPixelY)
    F1.Shapel.Item(n).Left = X - Int(F1.Shapel.Item(n).Width / 2)

End Sub

Public Function remove_virg_to_point(s As String) As String
Dim pos As Long
Dim s2 As String
Dim s3 As String

Do
    pos = InStr(1, s, ",", vbBinaryCompare)
    If pos > 0 Then
        s2 = Left(s, pos - 1)
        s3 = Right(s, Len(s) - pos)
        s = s2 & "." & s3
    End If

Loop Until pos < 1

remove_virg_to_point = s

End Function

Public Sub correlation_9_pixels()
Dim a(0 To 2) As SEB
Dim i As Long
Dim min As Long
Dim max As Long
Dim t_init As Long
Dim t As Long
Dim t_tot As Double
Dim r_time As Long
Dim remaining_time As Double

t_init = GetTickCount
'initialisation des classes
For i = 0 To 2
    Set a(i) = New SEB
Next i

'création des images de références
a(0).create_ref pt1.X, pt1.Y
a(1).create_ref pt2.X, pt2.Y
a(2).create_ref pt3.X, pt3.Y

'scan des images
```

```

min = pthG.Y
max = ptbD.Y

ReDim tab_co(CLng(F1.scb1.max - 1), 7) 'x1,y1,x2,y2,x3,y3,cos(angle_deg),l

For i = 0 To (F1.scb1.max - 1)
  'affichage de l'image
  If all_pics_in_memory Then
    F1.Image1 = tab_pics(i)
  Else
    F1.Image1 = LoadPicture(f(i))
  End If
  t = GetTickCount
  t_tot = CDb1(t)
  t_tot = t_tot - CDb1(t_init)
  t_tot = t_tot / (i + 1)
  remaining_time = (CDbl(F1.scb1.max - 1) - CDb1(i)) * t_tot
  remaining_time = remaining_time / 1000
  remaining_time = Round(remaining_time, 1)

  F1.Caption = "Correlating image n°" + CStr(i) + ", remaining time=" +
  CStr(remaining_time) + " s"

  F1.Refresh

  DoEvents

  'recherche et affectation des points

  tab_co(i, 0) = CDb1(pt1.X)
  tab_co(i, 1) = a(0).scan_verticale(pt1.X, min, max)
  tab_co(i, 2) = CDb1(pt2.X)
  tab_co(i, 3) = a(1).scan_verticale(pt2.X, min, max)
  tab_co(i, 4) = CDb1(pt3.X)
  tab_co(i, 5) = a(2).scan_verticale(pt3.X, min, max)

Next i

'destruction des classes

For i = 0 To 2
  Set a(i) = Nothing
Next i

Call calc_cosangle
Call affich_results

End Sub

Public Sub generate_curve_test_for_a_min()

  'Fonction permettant de récupérer
  'le profil d'intensité de niveau
  'de gris pour la détermination du point.
  'Utilisée à des fin de test uniquement

  Dim i As Long
  Dim s As String
  Dim c As String * 1

  c = Chr(9)

```

```
For i = LBound(tab_test) To UBound(tab_test)
    s = s + remove_virg_to_point(CStr(tab_test(i))) + c
Next i

Clipboard.Clear
Clipboard.SetText s, vbCFTText

End Sub
```

### **c. Fichier de classe : « SEB.cls »**

```
VERSION 1.0 CLASS
BEGIN
    MultiUse = -1 'True
    Persistable = 0 'NotPersistable
    DataBindingBehavior = 0 'vbNone
    DataSourceBehavior = 0 'vbNone
    MTSTransactionMode = 0 'NotAnMTSObject
END
Attribute VB_Name = "SEB"
Attribute VB_GlobalNameSpace = False
Attribute VB_Creatable = True
Attribute VB_PredeclaredId = False
Attribute VB_Exposed = False
'remplissage du carré
'   0 1 2
'X  3 4 5
'   6 7 8
'       Y
Private Const big_double = 1E+22

Private zone_carree(0 To 8) As Long
Private zone_ref(0 To 8) As Long

Private tab_soustrac() As Double
Private n_im As Long
Private hscan As Long

Private Sub Class_Initialize()

    ReDim tab_soustrac(0)

    For i = 0 To 8
        zone_carree(i) = 0
        zone_ref(i) = 0
    Next i

End Sub

Public Sub create_ref(X As Long, Y As Long)

    zone_ref(0) = GetPixel(GetDC(0), X - 1, Y - 1)
    zone_ref(1) = GetPixel(GetDC(0), X, Y - 1)
    zone_ref(2) = GetPixel(GetDC(0), X + 1, Y - 1)
    zone_ref(3) = GetPixel(GetDC(0), X - 1, Y)
    zone_ref(4) = GetPixel(GetDC(0), X, Y)
    zone_ref(5) = GetPixel(GetDC(0), X + 1, Y)
    zone_ref(6) = GetPixel(GetDC(0), X - 1, Y + 1)
```

```

zone_ref(7) = GetPixel(GetDC(0), X, Y + 1)
zone_ref(8) = GetPixel(GetDC(0), X + 1, Y + 1)

End Sub

Private Sub acquire_carre(X As Long, Y As Long)

Dim X1 As Long
Dim X2 As Long
Dim Y1 As Long
Dim Y2 As Long

X1 = X - 1
X2 = X + 1
Y1 = Y - 1
Y2 = Y + 1

'la ligne supérieure
zone_carree(0) = GetPixel(GetDC(0), X1, Y1)
zone_carree(1) = GetPixel(GetDC(0), X, Y1)
zone_carree(2) = GetPixel(GetDC(0), X2, Y1)

'la ligne centrale
zone_carree(3) = GetPixel(GetDC(0), X1, Y)
zone_carree(4) = GetPixel(GetDC(0), X, Y)
zone_carree(5) = GetPixel(GetDC(0), X2, Y)

'laligne inférieure
zone_carree(6) = GetPixel(GetDC(0), X1, Y2)
zone_carree(7) = GetPixel(GetDC(0), X, Y2)
zone_carree(8) = GetPixel(GetDC(0), X2, Y2)

End Sub

Public Function scan_verticale(X As Long, y_start As Long, y_fin As Long)
As Double
Dim v2 As Double
Dim v_3pts As Double
Dim v As Double
Dim pos As Long
Dim i As Long
Dim k As Long
Dim Y As Long

ReDim tab_soustrac(y_fin - y_start)

'scan de la verticale
For Y = y_start To y_fin

acquire_carre X, Y

v2 = 0
v = 0

'soustraction à la référence
For i = 0 To 8
v2 = CDb1(zone_ref(i)) - CDb1(zone_carree(i))
v2 = v2 ^ 2
v = v + v2
Next i

```

```
'stockage de la valeur soustraite
tab_soustrac(Y - y_start) = v

Next Y

' recherche du minimum

v = big_double

For i = 1 To CLng(y_fin - y_start - 1)

    v_3pts = 0

    For k = (i - 1) To (i + 1)
        v_3pts = v_3pts + tab_soustrac(k)
    Next

    If v_3pts < v Then
        pos = i
        v = tab_soustrac(i)
    End If

Next i

scan_verticale = CDb1(pos)

End Function

Private Sub Class_Terminate()

    ReDim tab_soustrac(0)
    Erase tab_soustrac

End Sub
```

#### **d. Fichier de classe : « Fit\_class.cls »**

```
VERSION 1.0 CLASS
BEGIN
    MultiUse = -1 'True
    Persistable = 0 'NotPersistable
    DataBindingBehavior = 0 'vbNone
    DataSourceBehavior = 0 'vbNone
    MTSTransactionMode = 0 'NotAnMTSObject
END
Attribute VB_Name = "Fit_class"
Attribute VB_GlobalNameSpace = False
Attribute VB_Creatable = True
Attribute VB_PredeclaredId = False
Attribute VB_Exposed = False

Public Sub trouve_min_1_pixel(compt As Long, num_im As Long) 'trouve le
minimum d'intensité en utilisant un seul pixel.
Dim i As Long
Dim j As Long
```

```

Dim v As Long
Dim vmin As Long

For j = 0 To 2
    vmin = 256 ^ 3
    For i = 0 To compt
        v = tab_r(j, i)
        If v < vmin Then
            vmin = v
            tab_m(j, num_im) = CDb1(i)
        End If
    Next i

    fit_x2_to_find_best_pos j, tab_m(j, num_im), num_im
    If ERREUR Then Exit Sub
Next j

End Sub

Public Sub trouve_min_3_pixels(compt As Long, num_im As Long) 'trouve le
minimum d'intensité en utilisant un pixel de chaque côté.
Dim i As Long
Dim j As Long
Dim v As Double
Dim vmin As Double

'ReDim tab_test(compt)

For j = 0 To 2
    vmin = (256 ^ 3) * 3
    For i = 1 To (compt - 1) 'comme je prends un pixel de chaque côté je
raccourcis les bornes de 1
        v = CDb1(tab_r(j, i))
        v = v + CDb1(tab_r(j, i - 1))
        v = v + CDb1(tab_r(j, i + 1))
        'tab_test(i) = v

        If v < vmin Then
            vmin = v
            tab_m(j, num_im) = CDb1(i)
        End If
    Next i

    fit_x2_to_find_best_pos j, tab_m(j, num_im), num_im
    If ERREUR Then Exit Sub
Next j

End Sub

Private Sub fit_x2_to_find_best_pos(j As Long, i_op As Double, num_im As
Long)
Dim i As Long
Dim X_init As Double
Dim X As Double
Dim a As Double
Dim b As Double
Dim c As Double

```

```
Dim i_opt As Long

Dim n As Double
Dim Alpha As Double
Dim Beta As Double
Dim Gamma As Double
Dim Delta As Double
Dim Epsilon As Double
Dim Teta As Double
Dim Phi As Double

Dim denominateur As Double

Dim t1 As Double
Dim t2 As Double

Dim ok As Boolean

Dim miny As Double
Dim minx As Double

ok = False

i_opt = CLng(i_op)

'equation forme ax2+bx+c

Select Case j
    Case 0
        X_init = CDb1(pt1.X)
    Case 1
        X_init = CDb1(pt2.X)
    Case 2
        X_init = CDb1(pt3.X)
End Select

If ((CDbl(i_opt - 6)) < 0) Or ((CDbl((i_opt) + 6)) > (UBound(tab_r, 2)))
Then 'condition au bord de l'image, pas de fit possible
    Exit Sub 'je conserve la valeur obtenue par la méthode précédente de
détermination du minimum
End If

For i = i_opt - 5 To (i_opt + 5) 'je prends 5 points de chaque côté du
minimum
    X = CDb1(i)
    Alpha = Alpha + (X ^ 4) 'somme des Xi puissance 4
    Beta = Beta + (X ^ 3) 'somme des Xi puissance 3
    Gamma = Gamma + (X ^ 2) 'somme des Xi puissance 2
    Delta = Delta + X 'somme des Xi
    Epsilon = Epsilon + ((X ^ 2) * (CDbl(tab_r(j, i)))) 'somme des Xi au
carré * Yi
    Teta = Teta + (X * (CDbl(tab_r(j, i))))
    Phi = Phi + (CDbl(tab_r(j, i)))
    n = n + 1
Next

'Résolution du système d'équation à 3 inconnues
'matrice 3 * 3 :
'alpha beta gamma
'beta gamma delta
```

```

'gamma delta n
'puis inversion de la matrice

'calcul du dénominateur
denominateur = (-1) * n * (Beta ^ 2)
denominateur = denominateur + (n * Alpha * Gamma)
denominateur = denominateur - (Gamma ^ 3)
denominateur = denominateur + (2 * Beta * Gamma * Delta)
denominateur = denominateur - (Alpha * (Delta ^ 2))

If denominateur = 0 Then
    MsgBox "denominateur = 0, arrêt de la procédure
fit_x2_to_find_best_pos", vbCritical
    ERREUR = True
    Exit Sub
End If

'calcul de a
a = ((n * Gamma - (Delta ^ 2)) * Epsilon) / denominateur
a = a + ((((-1) * n * Beta) + (Gamma * Delta)) * Teta) / denominateur
a = a + ((((-1) * Gamma ^ 2) + (Beta * Delta)) * Phi) / denominateur

'calcul de b
b = ((((-1) * n * Beta) + (Gamma * Delta)) * Epsilon) / denominateur
b = b + (((n * Alpha) - (Gamma ^ 2)) * Teta) / denominateur
b = b + ((Beta * Gamma) - (Alpha * Delta)) * Phi) / denominateur

'test
't1 = a * Beta + b * Gamma + c * Delta - Teta '=0 normalement
't2 = a * Gamma + b * Delta + c * n - Phi

'If ((Abs(t1)) < tolerance_fit) And ((Abs(t2)) < tolerance_fit) Then ok =
True ' je ne peux pas mettre t1 ou t2 =0 car malgré le type double il y a
des arrondis

'If Not ok Then MsgBox "problème avec le fit ax²+bx+c" + vbNewLine + "t1="
+ CStr(t1) + vbNewLine + "t2=" + CStr(t2)

'trouver le minimum en X et Y d'un équation du second degré
'minx = (4 * a * c - b ^ 2) / (4 * a)
miny = (-1 * b) / (2 * a)

'position
'cas où le minimum trouve un point trop grand
'je garde alors la valeur du minimum obtenu par l'autre méthode
If miny > (Cdbl(taille_init_image(0)) / Cdbl(Screen.TwipsPerPixelY))
Then Exit Sub

miny = Round(miny, 3)
'sinon, c'est le fit est bon
tab_m(j, num_im) = miny

End Sub

```

### e. Fichier de form : « form1.frm »

```

VERSION 5.00
Object = "{F9043C88-F6F2-101A-A3C9-08002B2F49FB}#1.2#0"; "COMDLG32.OCX"
Begin VB.Form F1

```

```
Caption           = "Angle évolution par Seb"
ClientHeight      = 8952
ClientLeft        = 60
ClientTop         = 348
ClientWidth       = 12108
LinkTopic         = "Form1"
ScaleHeight       = 8952
ScaleWidth        = 12108
StartUpPosition  = 3  'Windows Default
WindowState        = 2  'Maximized
Begin VB.CommandButton Command6
    Caption        = "mask/wiew points"
    Height         = 372
    Left           = 9000
    TabIndex       = 28
    Top            = 1200
    Width          = 2772
End
Begin VB.Timer Timer1
    Left           = 6240
    Top            = 240
End
Begin VB.Frame Frame9
    Caption        = "Offset view results"
    Height         = 615
    Left           = 3000
    TabIndex       = 25
    Top            = 2520
    Width          = 3015
    Begin VB.HScrollBar HScroll11
        Height      = 255
        LargeChange = 10
        Left        = 120
        Max         = 100
        TabIndex    = 26
        Top         = 240
        Value       = 50
        Width       = 2775
    End
End
Begin VB.Frame Frame8
    Caption        = "Taille en % de l'original"
    Height         = 615
    Left           = 0
    TabIndex       = 22
    Top            = 2520
    Width          = 2895
    Begin VB.CommandButton Command5
        Caption      = "Apply"
        Height       = 255
        Left         = 1800
        TabIndex     = 24
        Top          = 240
        Width        = 975
    End
End
Begin VB.TextBox Text1
    Height         = 285
    Left           = 720
    TabIndex       = 23
    Text           = "100"
    Top            = 240
```

```

        Width          = 615
    End
End
Begin VB.CommandButton Command4
    Caption          = "View Results"
    Height           = 495
    Left             = 9000
    TabIndex        = 20
    Top              = 600
    Width           = 2772
End
Begin VB.Frame Frame7
    Caption          = "toutes les images en mémoire"
    Height           = 492
    Left             = 6240
    TabIndex        = 18
    Top              = 2160
    Width           = 2652
    Begin VB.CheckBox Check7
        Caption      = "OUI"
        Height       = 192
        Left         = 960
        TabIndex    = 19
        Top          = 240
        Width       = 732
    End
End
Begin VB.Frame Frame6
    Caption          = " Détermination du Minimum"
    Height           = 972
    Left             = 6240
    TabIndex        = 16
    Top              = 1200
    Width           = 2652
    Begin VB.CheckBox Check8
        Caption      = "Activer corrélation 9 pixels"
        Height       = 252
        Left         = 120
        TabIndex    = 27
        Top          = 600
        Width       = 2172
    End
    End
    Begin VB.CheckBox Check6
        Caption      = "Activer Méthode 3 points"
        Height       = 252
        Left         = 120
        TabIndex    = 17
        Top          = 240
        Width       = 2172
    End
End
Begin VB.Frame Frame2
    Caption          = "5 Points de repères"
    Height           = 1332
    Left             = 0
    TabIndex        = 6
    Top              = 1080
    Width           = 6012
    Begin VB.Frame Frame5
        Caption      = "Point de bords"
        Height       = 972
    End
End

```

```
Left          = 3480
TabIndex     = 12
Top          = 240
Width        = 2412
Begin VB.CheckBox Check3
    Caption    = "Bord 2"
    Height     = 375
    Left       = 1440
    TabIndex   = 14
    Top        = 360
    Width      = 732
End
Begin VB.CheckBox Check1
    Caption    = "Bord1"
    Height     = 375
    Left       = 120
    TabIndex   = 13
    Top        = 360
    Width      = 732
End
Begin VB.Shape Shape1
    BackColor  = &H00FFFF00&
    BackStyle  = 1 'Opaque
    BorderColor = &H00FFFF00&
    Height     = 72
    Index      = 5
    Left       = 1800
    Shape      = 3 'Circle
    Top        = 840
    Width      = 72
End
Begin VB.Shape Shape1
    BackColor  = &H000000FF&
    BackStyle  = 1 'Opaque
    BorderColor = &H000000FF&
    Height     = 72
    Index      = 3
    Left       = 360
    Shape      = 3 'Circle
    Top        = 840
    Width      = 72
End
End
Begin VB.Frame Frame4
    Caption    = "Point central"
    Height     = 972
    Left       = 2160
    TabIndex   = 10
    Top        = 240
    Width      = 1212
    Begin VB.CheckBox Check2
        Caption    = "Centre"
        Height     = 375
        Left       = 240
        TabIndex   = 11
        Top        = 360
        Width      = 732
    End
    Begin VB.Shape Shape1
        BackColor  = &H0000FF00&
        BackStyle  = 1 'Opaque
```

```

        BorderColor      =   &H0000FF00&
        FillColor        =   &H0000FF00&
        Height           =   72
        Index            =   4
        Left              =   600
        Shape             =   3 'Circle
        Top               =   840
        Width             =   72
    End
End
Begin VB.Frame Frame3
    Caption              =   "Région d'intérêt"
    Height               =   972
    Left                 =   120
    TabIndex             =   7
    Top                  =   240
    Width                =   1812
    Begin VB.CheckBox Check5
        Caption           =   "Bas-Droite"
        Height            =   252
        Left               =   240
        TabIndex          =   9
        Top                =   600
        Width              =   1092
    End
    Begin VB.CheckBox Check4
        Caption           =   "Haut-Gauche"
        Height            =   252
        Left               =   240
        TabIndex          =   8
        Top                =   240
        Width              =   1332
    End
End
End
Begin VB.Frame Frame1
    Caption              =   "Défilement des images"
    Height               =   972
    Left                 =   0
    TabIndex             =   4
    Top                  =   0
    Width                =   6012
    Begin VB.HScrollBar scb1
        Height            =   255
        Left               =   120
        TabIndex          =   5
        Top                =   240
        Width              =   5772
    End
    Begin VB.Label Label1
        Caption           =   "Label1"
        Height            =   252
        Left               =   120
        TabIndex          =   21
        Top                =   600
        Width              =   2292
    End
    Begin VB.Label Label2
        Caption           =   "Image n°"
        Height            =   255
        Left               =   2760
    End
End

```

```
        TabIndex      = 15
        Top            = 600
        Width         = 1695
    End
End
Begin VB.CommandButton Command3
    Caption           = "Voir les coordonnées des points"
    Height            = 492
    Left              = 6120
    TabIndex          = 3
    Top               = 600
    Width             = 2772
End
Begin VB.TextBox Text4
    Height            = 375
    Left              = 6120
    TabIndex          = 2
    Text              = "Text4"
    Top               = 2760
    Width             = 5655
End
Begin MSComDlg.CommonDialog CD1
    Left              = 6120
    Top               = 120
    _ExtentX          = 847
    _ExtentY          = 847
    _Version           = 393216
End
Begin VB.CommandButton Command2
    Caption           = "Ouvrir"
    Height            = 372
    Left              = 6120
    TabIndex          = 1
    Top               = 120
    Width             = 2772
End
Begin VB.CommandButton Command1
    Caption           = "GO !"
    Height            = 375
    Left              = 9000
    TabIndex          = 0
    Top               = 120
    Width             = 2772
End
Begin VB.Shape Shape1
    BackColor         = &H00FFFF00&
    BackStyle         = 1 'Opaque
    BorderColor       = &H00FFFF00&
    Height            = 48
    Index             = 1
    Left              = 1440
    Shape             = 3 'Circle
    Top               = 3480
    Width             = 48
End
Begin VB.Shape Shape1
    BackColor         = &H0000FF00&
    BackStyle         = 1 'Opaque
    BorderColor       = &H0000FF00&
    FillColor         = &H0000FF00&
    Height            = 48
```

```

        Index          = 2
        Left           = 1080
        Shape          = 3 'Circle
        Top            = 3480
        Width          = 48
    End
    Begin VB.Shape Shape1
        BackColor      = &H000000FF&
        BackStyle      = 1 'Opaque
        BorderColor    = &H000000FF&
        Height         = 48
        Index          = 0
        Left           = 720
        Shape          = 3 'Circle
        Top            = 3480
        Width          = 48
    End
    Begin VB.Image Image1
        Height         = 1800
        Left           = 120
        MousePointer   = 2 'Cross
        Picture         = "Form1.frx":0000
        Top            = 3360
        Width          = 1800
    End
End
Attribute VB_Name = "F1"
Attribute VB_GlobalNameSpace = False
Attribute VB_Creatable = False
Attribute VB_PredeclaredId = True
Attribute VB_Exposed = False

Private Sub Check6_Click()

If F1.Check6.Value = 1 Then
    methode_3_pts = True
    MsgBox "Méthode 3 points activée"
Else
    methode_3_pts = False
    MsgBox "Méthode 1 point activée"
End If

End Sub

Private Sub Check7_Click()

If F1.Check7.Value = 1 Then
    all_pics_in_memory = True
    MsgBox "Cette option rend le traitement plus rapide mais requiert
beaucoup de mémoire !!!" + vbNewLine + "Si une erreur de chargement
apparaît, décochez cette option.", vbExclamation
Else
    all_pics_in_memory = False
End If

End Sub

Private Sub Check8_Click()

If F1.Check8.Value = 1 Then

```

```
        methode_corr_9_pix = True
        MsgBox "Méthode de corrélation 2D à 9 pixels activée "
Else
        methode_corr_9_pix = False
        MsgBox "Méthode de corrélation 2D à 9 pixels désactivée "
End If

End Sub

Private Sub Command1_Click()

Set Fit_classe = New Fit_class

Call cache_ronds

DoEvents

If methode_corr_9_pix Then
        Call correlation_9_pixels
Else
        Call analyse
End If

If ERREUR Then
        ERREUR = False
        MsgBox "arrêt du calcul, erreur détectée", vbCritical
End If

Set Fit_classe = Nothing

End Sub

Private Sub Command2_Click()
Call ouvrir_dossier
End Sub

Private Sub Command3_Click()
Text4.Text = "Pt1 : X=" + Str(pt1.X) + " Y=" + CStr(pt1.Y) + vbNewLine
Text4.Text = Text4.Text + "Pt2 : X=" + Str(pt2.X) + " Y=" + CStr(pt2.Y) +
vbNewLine
Text4.Text = Text4.Text + "Pt3 : X=" + Str(pt3.X) + " Y=" + CStr(pt3.Y) +
vbNewLine
Text4.Text = Text4.Text + "PthG : X=" + Str(pthG.X) + " Y=" + CStr(pthG.Y)
+ vbNewLine
Text4.Text = Text4.Text + "Ptbd : X=" + Str(ptbd.X) + " Y=" + CStr(ptbd.Y)
+ vbNewLine
Text4.Text = Text4.Text + "pix_val= " + Str(pix_val)
End Sub

Private Sub Command4_Click()

        Call view_movie_detection_results

End Sub

Private Sub Command5_Click()
With F1.Image1
        .Stretch = True
        .Height = taille_init_image(0) * Int(CSng(F1.Text1.Text) / 100)
        .Width = taille_init_image(1) * Int(CSng(F1.Text1.Text) / 100)
End With
```

```
F1.HScroll11.max = 50 * CSng(F1.Text1.Text) / 100
F1.HScroll11.LargeChange = F1.HScroll11.max / 10
F1.HScroll11.Value = F1.HScroll11.max / 2
End Sub

Private Sub Command6_Click()
Dim i As Integer

    For i = 0 To 2
        If F1.Shape1.Item(i).Visible Then
            F1.Shape1.Item(i).Visible = False
        Else
            F1.Shape1.Item(i).Visible = True
        End If
    Next

End Sub

Private Sub Form_Load()
Dim i As Integer

cache_ronds

End Sub

Private Sub Form_QueryUnload(Cancel As Integer, UnloadMode As Integer)
    End
End Sub

Private Sub HScroll11_Change()

    offset = CSng(F1.HScroll11.Value) - 50 * CSng(F1.Text1.Text) / 100

End Sub

Private Sub Image1_Click()
Dim rep As Long

rep = GetCursorPos(pt)

If F1.Check1.Value = 1 Then
    pt1 = pt
    pt_view_results(0, 0) = X_image 'coords point de références pour
affichage du film de résultats
    pt_view_results(0, 1) = Y_image
End If

If F1.Check2.Value = 1 Then
    pt2 = pt
    pt_view_results(1, 0) = X_image 'coords point de références pour
affichage du film de résultats
    pt_view_results(1, 1) = Y_image
End If

If F1.Check3.Value = 1 Then
    pt3 = pt
```

```
    pt_view_results(2, 0) = X_image 'coords point de références pour
affichage du film de résultats
    pt_view_results(2, 1) = Y_image
End If

If F1.Check4.Value = 1 Then pthG = pt
If F1.Check5.Value = 1 Then ptbD = pt

Call Command3_Click
End Sub

Private Sub Image1_MouseMove(Button As Integer, Shift As Integer, X As
Single, Y As Single)
Dim a As POINTAPI
Dim rep As Long
X_image = X
Y_image = Y
rep = GetCursorPos(a)
F1.Label1.Caption = "X=" + CStr(a.X) + "(" + CStr(X) + ")" + " Y=" +
CStr(a.Y) + "(" + CStr(Y) + ")"

End Sub

Public Sub scb1_Change()

If marqueur = 256 ^ 3 Then
    F1.Image1.Picture = LoadPicture(f(0))
    F1.Label2.Caption = "Image n° 0"
    F1.Refresh
    marqueur = 0
Else

    F1.Image1.Picture = LoadPicture(f(CLng(F1.scb1.Value)))
    F1.Label2.Caption = "Image n°" + CStr(F1.scb1.Value)
    F1.Refresh

End If

End Sub
```