



Diffusion de l'enzyme de restriction EcoRV sur des molécules d'ADN étirées

Aurélien Crut

► To cite this version:

Aurélien Crut. Diffusion de l'enzyme de restriction EcoRV sur des molécules d'ADN étirées. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2005. Français. NNT : . tel-00011594

HAL Id: tel-00011594

<https://theses.hal.science/tel-00011594>

Submitted on 13 Feb 2006

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

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



Laboratoire Kastler Brossel

Thèse de doctorat
de l'Université Pierre et Marie Curie
Spécialité : Physique

présentée par

Aurélien Crut

*pour obtenir le grade de docteur
de l'Université Pierre et Marie Curie.*

Sujet de la thèse :

**Diffusion de l'enzyme de restriction EcoRV
sur des molécules d'ADN étirées**

soutenue le 15 novembre 2005 devant le jury composé de :

M. Jean-François Joanny	président
Mme Catherine Royer	rapporteur
Mme Laurence Salomé	rapporteur
M. Didier Chatenay	examineur
M. Pierre Desbiolles	co-directeur de thèse
Mme Valérie Lefèvre	directrice de thèse



Laboratoire Kastler Brossel

Thèse de doctorat
de l'Université Pierre et Marie Curie
Spécialité : Physique

présentée par

Aurélien Crut

*pour obtenir le grade de docteur
de l'Université Pierre et Marie Curie.*

Sujet de la thèse :

**Diffusion de l'enzyme de restriction EcoRV
sur des molécules d'ADN étirées**

soutenue le 15 novembre 2005 devant le jury composé de :

M. Jean-François Joanny	président
Mme Catherine Royer	rapporteur
Mme Laurence Salomé	rapporteur
M. Didier Chatenay	examineur
M. Pierre Desbiolles	co-directeur de thèse
Mme Valérie Lefèvre	directrice de thèse

*A Emilie,
pour sa précieuse amitié*

Remerciements

Mes premières pensées de gratitude sont pour Valérie Lefèvre, qui m'a permis de pénétrer dans le monde fascinant de l'ADN en acceptant la responsabilité administrative de ma thèse, et Frank Laloë, le directeur du laboratoire Kastler-Brossel. Je remercie tout aussi sincèrement Catherine Royer et Laurence Salomé qui ont accepté la tâche coûteuse en temps de rapporteurs de cette thèse, ainsi que Jean-François Joanny et Didier Chatenay pour leur participation à mon jury.

Pierre Desbiolles a assuré la direction scientifique de cette thèse. Au cours de ces années j'ai pu apprécier ses explications toujours claires et sa rigueur scientifique, et profiter aussi de ses vastes connaissances dans de nombreux domaines de la physique ainsi que de sa grande ingéniosité expérimentale. Je lui souhaite de grands succès à la tête de l'activité "ADN" de l'équipe Optique et Biologie. J'ai également eu de nombreuses discussions intéressantes avec le second membre fondateur du groupe Optique et Biologie, Maxime Dahan, dont j'ai pu admirer à de multiples reprises l'enthousiasme et l'extraordinaire énergie.

Malgré la relative bizarrerie que constitue la présence d'un groupe de biophysique au LKB, l'équipe Optique et Biologie s'est développée de manière continue entre le début et la fin de ma thèse, avec un approximatif triplement de ses effectifs entre ces deux limites, ce qui m'a permis de côtoyer un nombre croissant de collègues. Au tout début du projet, j'ai eu la chance de travailler en binôme avec David Lasne, dont j'ai beaucoup apprécié la motivation et la bonne humeur permanentes. Par la suite, j'ai à nouveau travaillé en compagnie de sympathiques stagiaires, Amodsen Chotia puis David Sebiskveradze, et avec Isabelle Bonnet à qui je souhaite bonne chance aux commandes du "microscope ADN" pour la suite de sa thèse ! J'ai également été heureux de côtoyer en GH 22 ou dans les environs Marc Humbert, les septentrionaux Makrina Anastassiadou, Massimo Galimberti et Camilla Luccardini, Marcel Zevenbergen (de nouveau collègue à Delft), Garence Mine, Sébastien Courty, et le trio de mes voisins de bureau doctorants Marie-Virginie Ehrensperger (experte du trafic synaptique et reine des powerballs), Cédric Bouzigues (spécialiste des cônes de croissances et Zidane des Clafootis, l'équipe de foot du groupe dont mon départ devrait améliorer les résultats) et Stéphane Bonneau (éminent analyste d'images dont l'esprit acerbe est heureusement fort divertissant). Etre entouré d'un tel groupe de personnes scientifiquement talentueuses et humainement agréables aura été une grande chance pour moi, et un contrepoids appréciable face aux inévitables difficultés qui jalonnent les recherches scientifiques en général et les thèses en particulier. J'ai également éprouvé beaucoup de plaisir à travailler avec nos "voisins" biologistes du Museum National d'Histoire Naturelle, Bénédicte Géron-Landre et Christophe Escudé. La période durant laquelle nous avons ensemble mis progressivement au point la détection d'ADN peigné avec des nanocristaux demeurera un excellent

souvenir tant sur le plan scientifique qu'humain. Enfin, la richesse scientifique des cimes de la montagne Sainte-Geneviève m'a permis d'avoir des discussions très instructives avec Jean-François Allemand, Vincent Croquette, David Bensimon, François Heslot, Claude Bouchiat ainsi qu'avec Pierre Nassoy, Ewa Paluch, Cécile Leduc et Hadia Gérardin de l'institut Curie.

Le début de ma thèse a été agrémenté par le proche voisinage de l'équipe "réseaux optiques" et de ses membres Laurent Sanchez-Palencia, Michele Schiavoni, cordon bleu des pâtes à l'italienne et grand expert footballistique, et "le directeur" Ferruccio Renzoni à l'esprit caustique sans égal en ce monde, avec qui a débuté la tradition des discussions caféinées au pied du désormais célèbre "panneau syndical". Au cours de mes allées et venues à travers le Département de Physique, j'ai également été heureux de cotoyer Xavier Brokmann, Laurent Colen et Jean-Pierre Hermier, Bertrand Boursin (le plus souvent en salle blanche, alors que nous étions habillés à la mode des stations spatiales), mes ex-collègues de DEA Sébastien Gleyzes et Julien Gabelli ainsi que Marie Abboud, Yacine Amarouchene, Julien Husson, Yann Gambin, Timothée Lionnet, Guiseppe Lia et Omar Saleh. Je n'oublie pas non plus tous ceux à qui je suis redevable de précieux services : l'équipe du secrétariat Linda Krikorian, Thierry Tardieu et Vera Da Costa, qui ont fort à faire entre commandes et ordres de mission, monsieur Point et Didier Courtiade à qui le laboratoire devrait je pense ériger un monument tant ils se sont investis pour lui, madame Guérard pour sa veille attentive sur l'arrivée des produits bio qui ont toujours pu être congelés rapidement, et Jack Olejnik pour sa disponibilité pour imprimer les posters.

En marge de l'étirement des molécules d'ADN, j'ai également enseigné les bases de la physique aux jeunes étudiants de Paris 6 et j'ai beaucoup apprécié cette activité. Je garde aussi un souvenir formidable des deux écoles d'été auxquelles j'ai eu la chance de participer, aux Houches puis à Cargèse l'année suivante, qui constituent très certainement la manière la plus agréable d'étudier la physique. Ces séjours ont été le point de départ d'amitiés durables et précieuses, en particulier avec Sigolène, Kirone et Kadri.

Hors de la communauté scientifique, je souhaite aussi remercier l'ensemble de mes colocataires pendant mon existence parisienne (une quinzaine au total, à présent dispersés aux quatre coins de l'Hexagone), la communauté des échecs bordelais (et notamment les deux Stéphane, Eleonore, Sandrine et Arnaud), JP et JC (partenaires d'une mémorable traversée Helsinki-Tallinn), Emilie, ma famille et tous mes amis. Tous m'ont permis de me souvenir que la vie ne se limitait pas à l'interaction ADN-protéines lorsque j'avais tendance à l'oublier.

J'ai certainement oublié des gens dans toutes ces listes à l'instant où j'écris ces lignes, j'espère qu'ils voudront bien me pardonner en se disant que la mémoire m'est certainement revenue au moment où eux les liront !

Table des matières

Préambule	5
1 Problématique biologique	7
1.1 Localisation par les protéines de séquences-cibles sur l'ADN . . .	9
1.1.1 Phase initiale : diffusion tridimensionnelle en solution . . .	10
1.1.1.1 Diffusion des protéines en solution	10
1.1.1.2 Estimation du taux d'association maximal par diffusion tridimensionnelle pure	11
1.1.2 Diffusion dans le domaine délimité par une molécule d'ADN	12
1.1.2.1 Description des mécanismes possibles	12
1.1.2.2 Modélisation	14
1.2 Enzymes de restriction de type II	20
1.2.1 Systèmes de restriction-modification chez les bactéries . . .	20
1.2.2 Intérêt des enzymes de restriction de type II	21
1.2.3 Mise en évidence expérimentale de l'interaction des enzymes de restriction avec l'ADN non spécifique	22
1.2.4 Mise en évidence expérimentale du sliding	23
1.2.4.1 Action sur des molécules d'ADN contenant deux séquences-cibles proches d'une extrémité	24
1.2.4.2 Influence de la présence d'obstacles le long de l'ADN	24
1.2.4.3 Utilisation d'une enzyme liée à l'ADN de manière covalente	25
1.2.4.4 Pertinence de ces études pour l'interaction ADN-protéines <i>in vivo</i>	25
1.2.5 Mise en évidence expérimentale du hopping	26
1.2.5.1 Action sur différents substrats d'ADN	26
1.2.5.2 Effet du surenroulement de l'ADN	26
1.2.6 Quelle est l'importance respective des mécanismes 1D et 3D ?	27
1.2.6.1 Importance des conditions expérimentales	27
1.2.6.2 expériences de processivité	27
1.3 expériences à l'échelle de la molécule unique	30
1.3.1 Méthodes non optiques	30
1.3.1.1 Microscopie de force atomique	30
1.3.1.2 Techniques de micromanipulation (pinces optiques et magnétiques)	31

1.3.2	Méthodes optiques	32
1.3.2.1	Utilisation de fluorophores pour la visualisation des biomolécules	32
1.3.2.2	Utilisation des méthodes optiques en vue de l'étude de la dynamique des interactions ADN-protéines	33
1.3.2.3	Stratégie utilisée dans nos expériences	36
2	Etirement de l'ADN et	
	Détection par des NCS	37
2.1	Etirement des molécules d'ADN	39
2.1.1	Observation de molécules d'ADN individuelles en microscopie de fluorescence	39
2.1.1.1	Marquage fluorescent de l'ADN	39
2.1.1.2	Microscopie de fluorescence	40
2.1.2	Peignage	41
2.1.2.1	Réalisation expérimentale	41
2.1.2.2	Ancrage spécifique des extrémités de l'ADN	42
2.1.2.3	Etat des molécules peignées	44
2.1.2.4	Matériel et méthodes pour le peignage	45
2.1.3	Etirement	46
2.1.3.1	Principe	46
2.1.3.2	Résultats expérimentaux	47
2.1.3.3	Matériel et méthodes pour l'étirement	49
2.1.4	Conclusion	51
2.2	Analyse des fluctuations transverses	51
2.2.1	Elasticité de l'ADN	52
2.2.1.1	Modèle de la chaîne librement jointe	52
2.2.1.2	Modèle du ver	53
2.2.2	Modèle utilisé pour l'analyse des fluctuations transverses	54
2.2.2.1	Description	54
2.2.2.2	Choix du nombre de billes	55
2.2.2.3	Dynamique	55
2.2.2.4	Discussion : pertinence de la description hydrodynamique	56
2.2.2.5	Résultats du modèle pour une élasticité linéaire des ressorts	56
2.2.2.6	Analyse dans le cas de l'élasticité réelle (non linéaire) de l'ADN	57
2.2.2.7	Simulations numériques	57
2.2.3	Résultats expérimentaux	58
2.2.3.1	Analyse des films expérimentaux	58
2.2.3.2	Etirement de l'ADN dans le flux hydrodynamique	58
2.2.3.3	Caractéristiques moyennes des fluctuations	59
2.2.3.4	Estimation de la longueur des molécules d'ADN à partir de l'amplitude des fluctuations transverses	61

TABLE DES MATIÈRES

2.2.3.5	Effet du taux d'étirement sur les temps de corrélation	61
2.2.4	Conclusion	62
2.3	Détection de molécules d'ADN peigné à l'aide de nanocristaux	62
2.3.1	Fluorophores organiques vs nanocristaux	63
2.3.1.1	Inconvénients des fluorophores organiques	63
2.3.1.2	Les nanocristaux : des fluorophores aux propriétés optiques remarquables	64
2.3.2	Mise en oeuvre expérimentale	65
2.3.2.1	Préparation d'ADN avec extrémités biotine et/ou digoxigénine (B. Geron-Landre)	65
2.3.2.2	Attachement des NCs sur les molécules d'ADN peignées	66
2.3.2.3	Matériels et méthodes	69
2.3.3	Résultats	72
2.3.3.1	Efficacité de détection des extrémités modifiées	72
2.3.3.2	Détection de l'ADN par les NCs	75
2.3.3.3	Estimation de la probabilité de localisation correcte des molécules d'ADN	77
2.3.4	Détection d'ADN étiré	78
2.3.5	Conclusions	79
2.4	Conclusion générale du chapitre	79
	Annexe : Décomposition du contour d'ADN en modes de Fourier et calcul des fonctions d'autocorrélation	81
3	Interaction NC-EcoRV/ADN étiré	83
3.1	Couplage d'EcoRV à un fluorophore	85
3.1.1	L'enzyme de restriction EcoRV	85
3.1.2	Couplage des protéines à des fluorophores : impératifs et difficultés	85
3.1.2.1	Choix du fluorophore	86
3.1.2.2	Intérêt d'un couplage site-spécifique de la protéine	88
3.1.3	Couplage d'EcoRV biotinylées à des nanocristaux	89
3.1.3.1	Synthèse d'enzymes EcoRV biotinylées (Wolfgang Wende et Alfred Pingoud, Justus-Liebig Universität Giessen, Allemagne)	89
3.1.3.2	Couplage aux nanocristaux	90
3.1.3.3	Matériel et méthodes	91
3.1.3.4	Tests biochimiques de l'activité des NC-EcoRV	92
3.2	Interaction des NC-EcoRV avec l'ADN de T7	94
3.2.1	Choix de l'ADN utilisé et de son mode de détection	94
3.2.1.1	Choix de l'ADN du bactériophage T7	94
3.2.1.2	Détection de l'ADN par le SYBR Gold	95
3.2.2	Choix des conditions d'interaction	95
3.2.2.1	Traitement des surfaces	95
3.2.2.2	pH d'interaction	95

TABLE DES MATIÈRES

3.2.2.3	Concentration des NC-EcoRV	96
3.2.3	Films expérimentaux	97
3.2.4	Matériel et méthodes	98
3.2.4.1	Interaction des NC-EcoRV avec l'ADN	98
3.2.4.2	Réalisation des films expérimentaux	98
3.2.4.3	Programme d'analyse	99
3.2.4.4	Estimation de la résolution spatiale	99
3.3	Résultats	102
3.3.1	Durées d'interaction des NC-EcoRV avec l'ADN	102
3.3.1.1	Méthode d'analyse	102
3.3.1.2	Résultats	103
3.3.1.3	Discussion	103
3.3.2	Mise en évidence du mouvement des NC-EcoRV le long de l'ADN	106
3.3.2.1	Modélisation du mouvement thermique d'un point d'une molécule d'ADN étirée	107
3.3.2.2	Une grandeur appropriée pour l'analyse : le déplacement quadratique moyen	109
3.3.2.3	Résultats	112
3.3.3	Discussion	118
3.3.3.1	Effet du couplage à un nanocristal sur les caractéristiques de la diffusion d'EcoRV	118
3.3.3.2	Discussion de la distribution large des coefficients de diffusion	121
3.3.3.3	Implications biologiques de nos expériences	122
3.4	Améliorations expérimentales (en cours)	123
3.4.1	Étirement d'ADN biotinylé sur des surfaces streptavidinées	123
3.4.1.1	Conception de surfaces streptavidinées	123
3.4.1.2	Résultats expérimentaux	124
3.4.2	Application aux expériences d'interaction ADN/ protéines	125
3.4.2.1	Matériels et méthodes pour l'étirement d'ADN sur des surfaces recouvertes de streptavidine	126
Annexe 1 : effets de la taille d'une protéine sur son temps d'interaction avec l'ADN		128
Annexe 2 : erreurs statistiques sur le calcul du déplacement quadratique moyen		129
Conclusions et perspectives		133
Bibliographie		137

Préambule

Les interactions ADN/protéines jouent un rôle essentiel dans de très nombreux processus biologiques. Leur étude fait depuis de nombreuses années l'objet d'une intense activité de recherche en biologie moléculaire et cellulaire. Ce domaine de recherche a connu récemment des avancées remarquables avec l'apparition de techniques de micromanipulation des molécules d'ADN individuelles telles que les pinces optiques et magnétiques, et le développement des techniques de microscopie de fluorescence, qui permettent désormais le suivi de biomolécules individuelles. Si ces techniques ont initialement permis de sonder les propriétés de l'ADN [1–7], ces méthodes permettent désormais l'étude dynamique des interactions ADN-protéines à l'échelle de la molécule individuelle. A travers ces expériences, des informations quantitatives, complémentaires des expériences de biochimie réalisées sur les mêmes systèmes biologiques, peuvent être obtenues. On peut citer par exemple l'étude des interactions avec l'ADN de protéines aussi diverses que les protéines de compaction [8,9], les polymérases [10–13], les topoisomérases [14,15], les hélicases [16,17], ou encore les enzymes de restriction [18,19].

Au cours de cette thèse, nous avons abordé par des méthodes optiques un problème biologique qui fait l'objet de débats depuis de nombreuses années : comment les protéines localisent-elles leurs séquences-cibles sur les molécules d'ADN ? Certaines protéines agissent en effet sur des séquences d'ADN spécifiques et sont capables de localiser ces séquences-cibles avec une efficacité très supérieure à celle qui résulterait d'une diffusion tridimensionnelle, et ce sans consommer d'énergie. Les études de biochimie menées jusqu'à présent ont permis de montrer que le processus de localisation est facilité par l'interaction avec l'ADN non spécifique entourant la séquence-cible. Cependant, l'interprétation des résultats fournis par ces expériences repose sur des modèles discutés. Ces études indirectes ne permettent pas de conclure avec certitude quant aux mécanismes microscopiques à l'œuvre.

Ce mémoire décrit les expériences menées dans notre équipe pour observer directement la dynamique de l'interaction entre l'enzyme de restriction EcoRV et l'ADN. Ce système modèle a été intensément étudié par les biochimistes durant les deux dernières décennies pour caractériser la diffusion facilitée de cette enzyme sur l'ADN. Nos études, menées par microscopie de fluorescence et à l'échelle de la molécule individuelle, ont permis l'observation directe de mécanismes élémentaires proposés par les biochimistes pour expliquer leurs résultats. En particulier, nous avons observé et caractérisé la diffusion d'enzymes

couplées à des nanocristaux le long d'ADN ne contenant pas de séquence-cible.

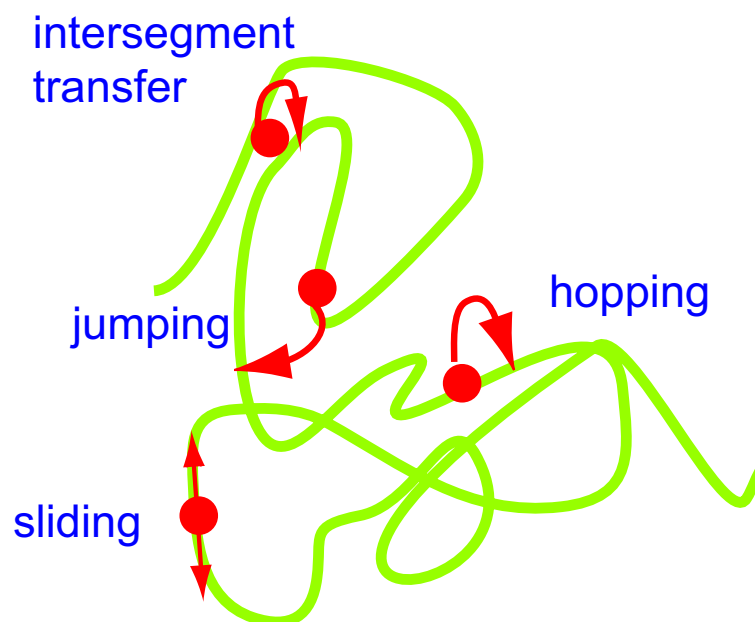
Le premier chapitre présente la problématique biologique liée à la localisation rapide de séquences-cibles par les protéines. Il expose les mécanismes proposés par les biochimistes pour décrire cette localisation, et les expériences menées pour mettre en évidence ces mécanismes et évaluer leur importance respective. Nous verrons comment certaines de ces expériences ont été analysées de manière contradictoire, de sorte qu'aucune conclusion définitive n'a pu en être tirée. L'intérêt d'expériences à l'échelle de la molécule unique est exposé, et le choix de méthodes optiques est justifié.

Le deuxième chapitre expose dans une première partie la technique que nous avons développée au laboratoire pour étirer des molécules d'ADN individuelles. Cette nouvelle méthode repose sur l'attachement spécifique des extrémités des molécules à une surface et sur l'étirement des molécules dans un flux hydrodynamique. Le mouvement des molécules étirées est analysé en détail. La seconde partie de ce chapitre est consacrée à la détection de molécules d'ADN peignées à l'aide de nanocristaux. La validité de cette approche est démontrée, et l'avantage des nanocristaux par rapport aux fluorophores organiques généralement utilisés pour marquer l'ADN est discuté. Deux articles écrits au sein du groupe décrivant ces techniques sont insérés à la fin de ce chapitre.

Enfin, le dernier chapitre présente les résultats obtenus sur l'étude de la dynamique des interactions entre des enzymes de restriction EcoRV couplées à des nanocristaux et de l'ADN dépourvu de séquences-cibles. Nous détaillons nos expériences et l'analyse statistique de nos données. Cette analyse permet de caractériser quantitativement un processus de diffusion d'EcoRV le long de l'ADN. La pertinence biologique des valeurs obtenues est discutée. Nous discutons enfin les améliorations expérimentales actuellement développées et les perspectives ouvertes par nos résultats.

Chapitre 1

Comment les protéines
localisent-elles leur
séquence-cible sur l'ADN ?



1.1. LOCALISATION PAR LES PROTÉINES DE SÉQUENCES-CIBLES SUR L'ADN

1.1 Localisation par les protéines de courtes séquences-cibles sur l'ADN

Le bon fonctionnement des cellules requiert l'action d'un grand nombre de protéines sur l'ADN, assurant des fonctions aussi diverses que la réplication, la transcription, la réparation de l'ADN cellulaire, ou encore, chez les procaryotes, la destruction de l'ADN viral. Dans de nombreux cas, l'action des protéines nécessite la localisation de courtes séquences, en général de quelques paires de bases, sur des molécules d'ADN pouvant en compter plusieurs milliers (ADN des bactériophages), voire plusieurs millions (ADN chromosomique). Par exemple, les protéines répresseurs s'associent à des séquences appelées opérateurs afin de contrôler l'expression du gène associé, les ARN polymérases doivent localiser leur promoteur pour débiter la transcription, les enzymes de restriction doivent atteindre la séquence-cible où elles clivent l'ADN viral...

Parmi ces protéines, beaucoup localisent leur séquence-cible avec une efficacité extraordinaire, et ce sans consommer d'énergie. Ainsi, Riggs et al. ont observé dès 1970 que l'association du répresseur Lac sur l'ADN est caractérisée par une constante d'association $k_A = 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [20]. Cette constante d'association, remarquablement élevée, ne peut être expliquée par un modèle de diffusion tridimensionnelle des enzymes vers leur site d'activité, qui conduirait à des valeurs de 10^7 à $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [21]. A la suite de cette étude, de nombreux biochimistes se sont interrogés sur les mécanismes à l'origine de cette localisation accélérée.

L'association rapide des protéines à leur séquence-cible soulève la question suivante : le mécanisme de localisation implique-t-il l'interaction des protéines avec la seule séquence-cible ou avec l'ensemble de la molécule d'ADN ? Pour répondre à cette interrogation, plusieurs groupes ont analysé l'association de protéines à une séquence-cible entourée d'une longueur variable d'ADN dépourvu de cibles, qualifié de "non spécifique". La plupart de ces études ont été menées sur le répresseur Lac [22] et sur des enzymes de restriction [23–25]. Une accélération nette de la localisation des séquences-cibles a été observée lorsque celles-ci sont entourées de fragments d'ADN non spécifiques de plus en plus longs, l'effet s'atténuant au-delà de quelques centaines de paires de bases. Les résultats obtenus par les biochimistes sur l'enzyme de restriction EcoRV sont présentés dans la partie 1.2.3 de ce chapitre. Ces expériences mettent en relief le rôle essentiel de l'ADN non spécifique dans le processus de localisation des séquences-cibles. Néanmoins, elles ne donnent aucune indication sur les mécanismes microscopiques à l'œuvre. Nous allons à présent passer en revue quelques mécanismes, proposés par les biochimistes, susceptibles d'accélérer la localisation des séquences-cibles.

Dans cette partie, nous nous intéressons tout d'abord à la diffusion tridimensionnelle des protéines en solution, et nous déterminons le taux d'association maximal des protéines à leur séquence-cible lorsque ce seul processus est pris en compte. Nous décrivons ensuite les modèles proposés pour rendre compte de l'association plus rapide des protéines à leur séquence-cible. Dans tous ces modèles, la localisation des séquences-cibles se déroule en deux étapes : les protéines dif-

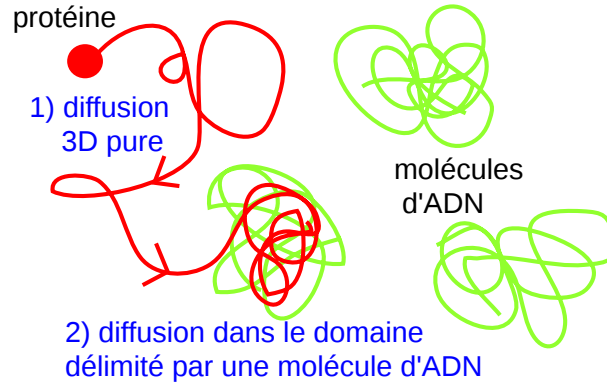


FIG. 1.1 – Vue générale de la diffusion des protéines. La localisation d’une séquence-cible implique deux phases : diffusion tridimensionnelle en solution, puis diffusion dans le domaine constitué par une molécule d’ADN.

fusent d’abord tridimensionnellement en solution jusqu’à rencontrer une molécule d’ADN, puis elles diffusent à l’intérieur du domaine délimité par cette molécule, chaque molécule constituant un domaine séparé pour des solutions d’ADN suffisamment diluées [26,27] (figure 1.1). Plusieurs mécanismes de diffusion (“sliding”, “hopping”, “intersegment transfer”...) ont été proposés pour décrire l’interaction des protéines avec l’ADN et leur diffusion dans ce domaine, et seront décrits en détail un peu plus loin. La phase de diffusion à l’intérieur du domaine délimité par la molécule d’ADN prend fin soit lorsque la protéine trouve sa séquence-cible, soit lorsqu’elle quitte ce domaine et reprend une diffusion tridimensionnelle en solution.

1.1.1 Phase initiale : diffusion tridimensionnelle en solution

Nous allons estimer le coefficient de diffusion des protéines en solution et en déduire le taux d’association d’une protéine à sa cible qui résulterait de la seule diffusion tridimensionnelle, sans prendre en compte ici les interactions avec les parties non spécifiques des molécules d’ADN.

1.1.1.1 Diffusion des protéines en solution

Le coefficient de diffusion d’une molécule en solution est relié à son rayon hydrodynamique R_h par la formule d’Einstein : $D = k_B T / 6\pi\eta R_h$. Une protéine globulaire de masse 10-100 kD a un rayon hydrodynamique R_h de l’ordre de 5 nm [28]. A des températures biologiquement pertinentes ($k_B T = 4 \cdot 10^{-21}$ J) et dans l’eau (de viscosité $\eta = 10^{-3}$ kg.m⁻¹.s⁻¹), le coefficient de diffusion D peut donc être estimé à $D = 5 \cdot 10^{-11}$ m².s⁻¹ = 50 μ m².s⁻¹.

1.1. LOCALISATION PAR LES PROTÉINES DE SÉQUENCES-CIBLES SUR L'ADN

1.1.1.2 Estimation du taux d'association maximal par diffusion tridimensionnelle pure

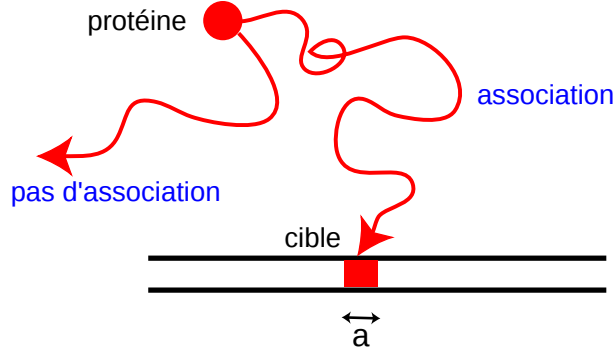


FIG. 1.2 – Diffusion 3D pure.

La probabilité pour une protéine de localiser une cible de taille a , initialement distante de r (figure 1.2) peut être estimée en décomposant l'espace en un réseau de maille a [29] et en considérant que :

- le temps passé dans une zone de taille a est de l'ordre de a^2/D .
- le temps passé dans la zone de taille r autour de la cible, supposée immobile par commodité, est de l'ordre de r^2/D .

Le nombre de sites de taille a explorés pendant ce temps est donc $(r/a)^2$, la zone en comptant au total $(r/a)^3$. Cette estimation simple donne la probabilité de collision avec la cible : $P = (a/r)$. Comme l'a montré Berg [30], il s'agit en fait un résultat exact. Si c est la concentration des cibles en solution, chaque protéine est en moyenne à une distance de l'ordre de $r = (1/c)^{1/3}$ d'une cible, chaque cible occupant un volume $1/c$. Ce volume est en moyenne exploré en un temps r^2/D . Durant cet intervalle de temps, la cible est localisée avec une probabilité a/r . Le temps nécessaire à la localisation d'une cible est donc de l'ordre de $(r^2/D) \times (r/a) = 1/(Dac)$. Le taux d'association (en $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) est donc de l'ordre de $k_A = Da$. Un calcul plus détaillé, dû à Smoluchowski, montre que [31] :

$$k_A = 4\pi Da. \quad (1.1)$$

En prenant pour la cible une taille de $a=2$ nm, correspondant à 6 paires de bases sur l'ADN, soit la longueur de la séquence-cible d'une enzyme de restriction, et en convertissant k_A en $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, il vient $k_A \simeq 2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Il s'agit là de la valeur maximale associée à la diffusion 3D pure. En fait, des contraintes supplémentaires, non prises en compte par ce modèle, régissent ce taux d'association. Ainsi, la liaison d'une protéine à l'ADN n'est possible que si sa conformation interne et son orientation par rapport à la molécule d'ADN le permettent. Le taux d'association maximal peut donc être considérablement réduit par rapport à cette valeur.

Pour le répresseur Lac, des mesures ont permis d'estimer que $k_A \simeq 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [20]. La diffusion tridimensionnelle ne peut donc pas rendre compte à

elle seule de l'efficacité de localisation de sa séquence-cible. Cette conclusion est valable pour beaucoup d'autres protéines. Par exemple, si les enzymes de restriction EcoRI et EcoRV se lient à de courts oligonucléotides avec des constantes k_A de l'ordre de $10^8 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$, proche du maximum accessible par diffusion 3D [32] elles localisent en revanche leurs séquences-cibles 5 à 10 fois plus rapidement sur de longues molécules d'ADN [24].

1.1.2 Diffusion dans le domaine délimité par une molécule d'ADN

Plusieurs mécanismes de diffusion dans le domaine d'une molécule d'ADN ont été proposés pour expliquer ces taux d'association élevés : diffusion unidimensionnelle le long des molécules d'ADN ("sliding"), diffusion tridimensionnelle ("hopping"), liaison simultanée à deux sites distants d'une même molécule d'ADN ("intersegment transfer") (figure 1.3). Nous avons conservé dans ce mémoire la terminologie anglo-saxonne de ces processus. Dans la littérature, ces processus de diffusion sont définis un peu différemment d'un article à l'autre. La classification utilisée ici est celle de Steven Halford [29, 33] et Alfred Pingoud [34].

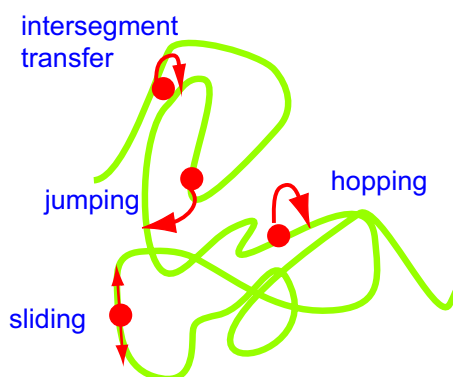


FIG. 1.3 – Mécanismes de diffusion à l'intérieur d'une pelote d'ADN.

1.1.2.1 Description des mécanismes possibles

a) Diffusion unidimensionnelle le long de l'ADN (sliding)

La première collision d'une protéine avec une molécule d'ADN a une probabilité très faible de se produire au voisinage immédiat d'une séquence-cible. Le modèle du "sliding" consiste à supposer qu'après cette collision initiale la protéine reste fixée à la molécule d'ADN, et peut diffuser le long de son contour jusqu'à ce qu'elle atteigne la séquence-cible (figure 1.4). Ce processus peut faciliter considérablement la localisation de la séquence-cible, puisque la dimension de l'espace de recherche est réduite de 3 à 1. La plupart des modèles de sliding utilisés jusqu'à présent supposent que les protéines se déplacent le long du grand

1.1. LOCALISATION PAR LES PROTÉINES DE SÉQUENCES-CIBLES SUR L'ADN

sillon de l'ADN. A petite échelle, le mouvement est donc hélicoïdal. Cependant, le mouvement pourrait aussi avoir lieu sur la surface entière des molécules d'ADN (mouvement 2D sur un cylindre), comme cela a été suggéré récemment [35], voire dans un petit volume autour des molécules d'ADN [36].

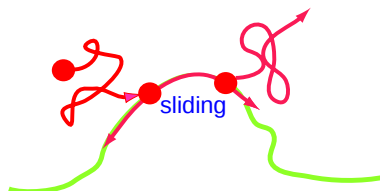


FIG. 1.4 – Sliding.

b) Succession d'associations et de dissociations à l'intérieur du domaine constitué par une molécule d'ADN (hopping)

En solution aqueuse, les molécules d'ADN adoptent une conformation repliée en "pelote" si leur taille est grande devant la longueur de persistance de l'ADN (50 nm soit 150 paires de bases). A l'intérieur d'une telle pelote, la dissociation d'une protéine a une grande probabilité d'être suivie d'une réassociation rapide (figure 1.5). En effet, la concentration en nucléotides, avec lesquels la protéine interagit attractivement, est localement élevée.

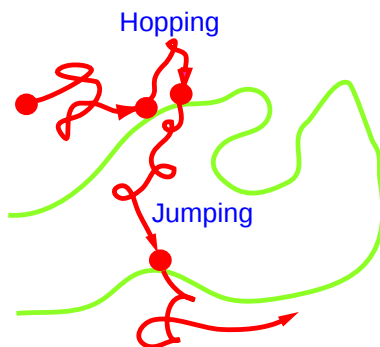


FIG. 1.5 – Hopping.

Les protéines se réassocient en général non loin du site dont elles se sont dissociées; à l'occasion, elles peuvent aussi atteindre des sites distants de plus de 20 paires de bases. La terminologie de "jumping" est parfois utilisée dans la littérature pour désigner ces sauts "longs". La limite de 20 paires de bases fixée pour séparer sémantiquement ces deux processus est purement arbitraire [33]. La localisation d'une séquence-cible à l'intérieur d'une pelote d'ADN par une telle succession d'associations/dissociations est plus rapide que la localisation d'une séquence-cible ponctuelle par la diffusion tridimensionnelle pure en solution diluée d'ADN, présentée dans le paragraphe précédent. En effet, les protéines

sont piégées à l'intérieur des pelotes, où se trouvent leurs cibles. La diffusion des protéines est donc confinée dans un proche voisinage de leurs cibles.

c) Intersegment transfer (figure 1.6)

Ce processus est réservé aux protéines possédant deux sites de liaison à l'ADN, comme le répresseur Lac ou l'enzyme de restriction SfiI [37]. Il leur permet de passer d'une zone de la molécule à une autre temporairement proche dans l'espace. L'ADN ne pouvant être courbé que sur des longueurs supérieures à sa longueur de persistance (50 nm soit 150 paires de bases), ce processus ne peut connecter que des sites relativement éloignés. C'est peut-être pour pouvoir utiliser ce mécanisme que de nombreuses enzymes de restriction possèdent deux sites de liaison à l'ADN [38]. Cependant, ce processus ne peut s'appliquer à des enzymes de restriction comme EcoRI ou EcoRV, dont la structure ne présente qu'un seul site de liaison à l'ADN.

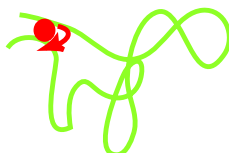


FIG. 1.6 – Intersegment transfer.

1.1.2.2 Modélisation

La modélisation du sliding et du hopping permet de mettre en évidence les caractéristiques essentielles de ces deux mécanismes. Un modèle simple permet de montrer qu'une efficacité maximale de localisation est obtenue par une combinaison optimale de ces deux mécanismes.

a) Sliding

Dans ce modèle, les protéines demeurent de manière permanente au voisinage immédiat des molécules d'ADN. On suppose en général un déplacement élémentaire le long de l'ADN ("pas") d'une paire de bases, soit 0.34 nm. A chaque instant, le mouvement de l'enzyme est régi par trois possibilités : un pas dans une direction, un pas dans la direction opposée ou l'interruption du mouvement de sliding par dissociation enzyme-ADN (probabilité P_{-1}). La probabilité P_{-1} est déterminée physiquement par l'énergie de la liaison protéine-ADN non spécifique. Elle détermine le nombre moyen de pas N effectués avant la dissociation (figure 1.7). Ainsi la probabilité d'un mouvement de N pas et plus est $(1 - P_{-1})^N$. Jeltsch et Pingoud ont proposé pour P_{-1} une valeur de l'ordre de 10^{-6} pour l'enzyme EcoRV, à partir de l'analyse de leurs expériences [39]. Si l'on appelle $x(n)$ la position sur la molécule d'ADN (en paires de bases (pb)) après n pas, la valeur moyenne de $x(n)$ reste égale à $x(0)$ quel que soit n , en revanche la position de

1.1. LOCALISATION PAR LES PROTÉINES DE SÉQUENCES-CIBLES SUR L'ADN

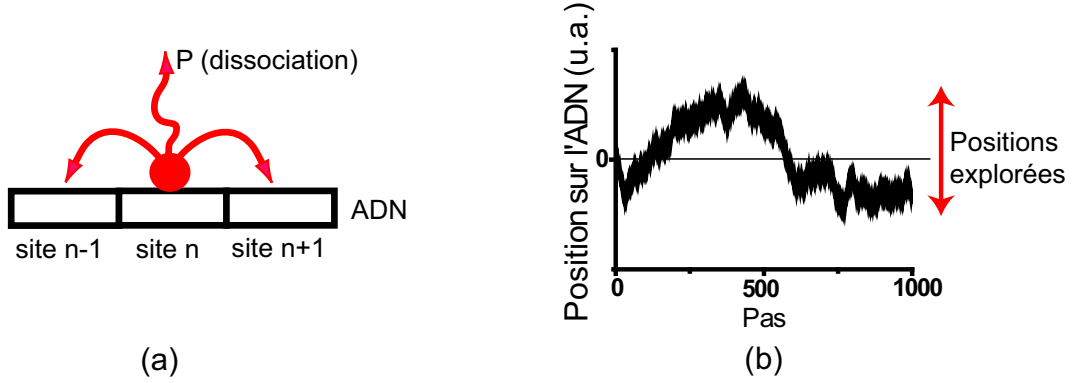


FIG. 1.7 – Modélisation (a) et simulation (b) du sliding.

la protéine après n pas est régie par une distribution gaussienne dont la largeur augmente au cours du temps (figure 1.8) :

$$P(x) \propto e^{-\frac{(x(n)-x(0))^2}{2D_1n}}. \quad (1.2)$$

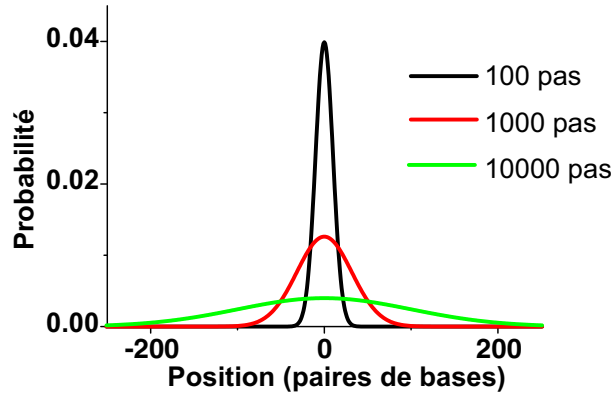


FIG. 1.8 – Distribution de la position sur l'ADN après 100, 1000 et 10000 pas d'un mouvement de diffusion 1D (0 : position initiale).

En particulier, le déplacement quadratique moyen vérifie :

$$\langle (x(n) - x(0))^2 \rangle = 2D_1n. \quad (1.3)$$

Dans ces deux équations, D_1 représente le coefficient de diffusion le long de l'ADN (exprimé ici en $\text{pb}^2 \cdot \text{pas}^{-1}$). Le nombre de sites différents explorés pour un total de N pas est donc de l'ordre de $\sqrt{N}$. Cela fait du sliding un processus extrêmement efficace sur de petites longueurs, car la zone de recherche est réduite à une dimension et la zone bordant le site d'accrochage sur l'ADN est entièrement explorée. Néanmoins ce mécanisme est de moins en moins efficace au fur et à mesure que N augmente, car l'exploration devient alors très redondante et les mêmes sites sont testés de nombreuses fois.

b) Hopping

Les sauts qu'effectue la protéine peuvent l'amener partout sur la molécule d'ADN, même si la réassociation sur des sites proches du site dont elle s'est dissociée est plus probable (figure 1.9). Une protéine située à une distance r d'une cible de taille a a une probabilité $P = a/r$ de l'atteindre au cours d'un mouvement de diffusion 3D [30, 33]. La distance moyenne entre deux sites d'un

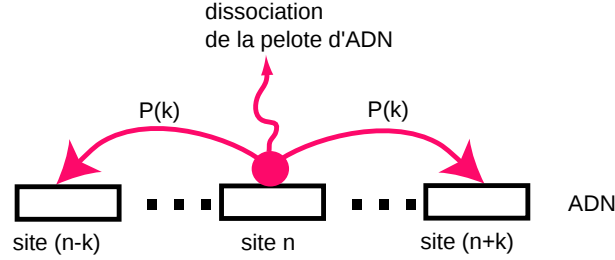


FIG. 1.9 – Modélisation du hopping.

polymère parfait séparés par n monomères varie comme $\sqrt{n}$. La probabilité de sauts connectant deux sites d'un ADN en pelote séparés de n paires de bases est donc approximativement proportionnelle à $1/\sqrt{n}$. Cette approche proposée par Halford [33] permet de modéliser simplement le processus de hopping.

Nous avons effectué des simulations numériques (en C++), utilisant la loi de probabilité $P(n) \propto 1/\sqrt{n}$ ci-dessus. Ces simulations démontrent qu'après quelques sauts la position de la protéine n'est quasiment plus corrélée avec celle à laquelle elle s'est initialement associée (figure 1.10). Après 10 sauts, la distribution de sa position est quasiment uniforme sur une molécule de 1000 paires de bases.

En effet, il est extrêmement probable que l'un de ce sauts au moins ait été un saut "long" ("jumping") conduisant la protéine loin de sa position initiale. En guise de démonstration, calculons la probabilité pour une protéine initialement située à une extrémité d'une molécule d'ADN longue de N paires de bases de rester sur la même moitié (probabilité P_1) ou de gagner la moitié opposée (probabilité P_2) de la molécule d'ADN à l'issue d'un saut :

$$P_1 = \frac{\int_0^{N/2} dn/\sqrt{n}}{\int_0^N dn/\sqrt{n}} = \frac{\sqrt{2}}{2}, \quad P_2 = \frac{\int_{N/2}^N dn/\sqrt{n}}{\int_0^N dn/\sqrt{n}} = \frac{2 - \sqrt{2}}{2}. \quad (1.4)$$

La valeur élevée de P_2 (environ 30%) montre que le hopping ne cantonne pas l'exploration autour du site d'association mais au contraire permet, en quelques sauts, d'explorer des zones éloignées.

Après n sauts, le hopping conduit à l'exploration de n sites sur l'ADN (on suppose ici que $n \ll N$, de sorte que les sites explorés sont disjoints). On pourrait avoir l'impression que le hopping est un processus plus efficace que le sliding, qui ne conduit qu'à l'exploration d'un nombre de sites de l'ordre de $\sqrt{n}$ après n pas.

1.1. LOCALISATION PAR LES PROTÉINES DE SÉQUENCES-CIBLES SUR L'ADN

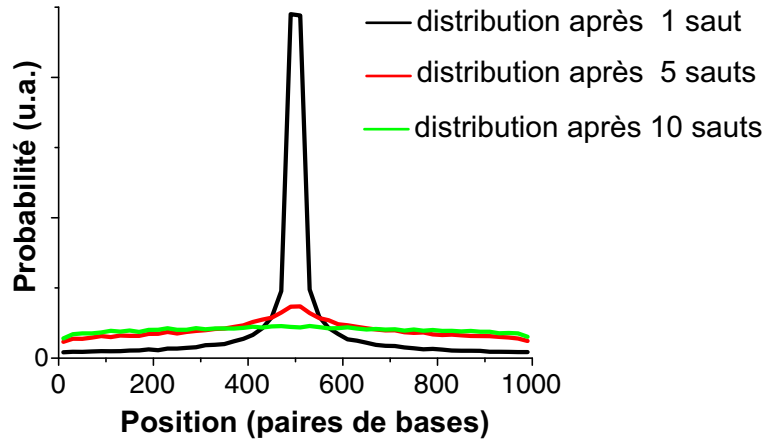


FIG. 1.10 – Distribution de la position de l'enzyme après 1, 5 et 10 sauts (simulations réalisées avec une molécule d'ADN de 1000 paires de bases, enzyme initialement située au centre de la molécule).

Néanmoins, le temps moyen requis pour un saut (hopping) est très supérieur à celui nécessaire pour un pas (sliding). Avec un modèle aussi simple, il n'est donc pas facile de conclure quant à la supériorité d'un processus sur l'autre. Nous allons voir en faisant intervenir les durées associées à ces processus que l'efficacité de localisation des séquences-cibles est optimisée par un mécanisme combinant sliding et hopping.

d) Modèle mixtes sliding-hopping

Description du modèle : Ce n'est que récemment que les expériences de biochimie ont commencées à être analysées en terme d'une combinaison de mécanismes 1D et 3D, qui permet de minimiser le temps nécessaire à la localisation des séquences-cibles [29, 40]. En effet, la succession d'associations et de dissociations (hopping) permet d'explorer successivement par sliding des petits domaines généralement différents, rendant la recherche moins redondante que dans un mouvement de "sliding" seul. L'exploration d'un domaine étendu avant la dissociation de la protéine rend également ce processus plus rapide que le hopping seul, en raison de la durée requise pour les phases de diffusion en solution (figure 1.11).

Un modèle simple permet d'estimer le temps nécessaire à l'exploration d'une molécule d'ADN de longueur L grande devant la longueur de persistance de l'ADN. Dans ce modèle, une protéine alterne des phases de diffusion le long de l'ADN (sliding) et des phases de diffusion 3D (hopping) à l'intérieur du domaine constitué par la molécule d'ADN. On néglige toute dissociation de la protéine hors de ce domaine. Les phases de sliding sont caractérisées par un coefficient de diffusion D_1 le long de l'ADN et une longueur moyenne l_1 de la zone explorée

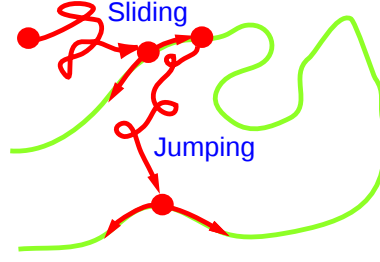


FIG. 1.11 – Localisation des séquences-cibles par alternance de phases de diffusion 1D (sliding) et 3D (hopping).

avant dissociation. Les phases de hopping sont caractérisées par un coefficient de diffusion tridimensionnelle D et une distance moyenne l entre les sites de dissociation et de réassociation. Cette longueur l dépend de la conformation de la molécule d'ADN et de sa longueur ; sa valeur est évaluée ci-dessous. La durée moyenne d'une phase de sliding est l_1^2/D_1 , et la durée moyenne d'une phase de hopping est l^2/D .

Pour simplifier le calcul, nous faisons l'hypothèse que les zones explorées par sliding sont disjointes ; la molécule entière est alors explorée à l'issue de L/l_1 événements d'association. Cette hypothèse sera discutée à la fin de cette partie. Le temps nécessaire à la localisation de la séquence-cible est donc de l'ordre de :

$$\tau(l_1) = L/l_1(l_1^2/D_1 + l^2/D). \quad (1.5)$$

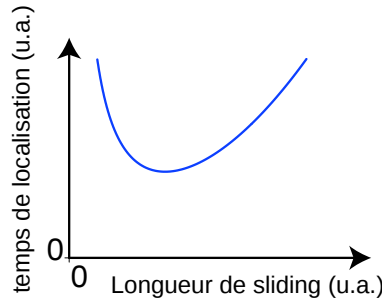


FIG. 1.12 – Temps nécessaire à la localisation d'une séquence-cible en fonction de la longueur moyenne de sliding.

Ce temps devient très élevé pour $l_1 \rightarrow 0$ (hopping seul), car le nombre d'événements d'association/dissociation, de durée non nulle, est alors très grand, et pour $l_1 \rightarrow L$ (sliding seul) en raison de la durée en l_1^2 des phases de sliding. Il passe par un unique minimum (figure 1.12) pour

$$l_1 = l\sqrt{\frac{D_1}{D}}. \quad (1.6)$$

1.1. LOCALISATION PAR LES PROTÉINES DE SÉQUENCES-CIBLES SUR L'ADN

Cette condition correspond à une durée moyenne identique des phases de diffusion 1D sur l'ADN (sliding) et 3D dans la pelote (hopping).

Prédiction de la longueur optimale de sliding : à partir de ce résultat, on peut estimer la longueur explorée par sliding qui optimise l'exploration d'une molécule d'ADN. Pour cela, la longueur moyenne l des sauts doit être évaluée. Les sauts peuvent connecter n'importe quels sites de l'ADN, mais leur probabilité diminue à mesure que la distance entre sites augmente (figure 1.13). Si l'on suppose qu'un saut a lieu à partir de l'extrémité de l'ADN, sa longueur moyenne, pour une conformation donnée de la molécule d'ADN, est donnée par :

$$l = \frac{\int_0^L x(s)P(s) ds}{\int_0^L P(s) ds}, \quad (1.7)$$

où :

- L est la longueur de contour de la molécule d'ADN.
- s est l'abscisse curviligne le long de ce contour, dans une configuration donnée.
- x est la distance entre les points d'abscisse curviligne 0 et s .
- P est la probabilité d'un tel saut.

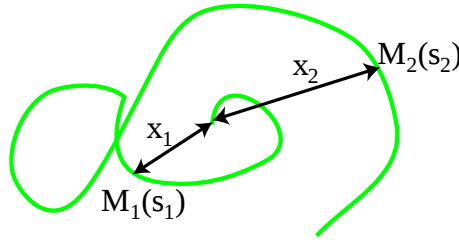


FIG. 1.13 – Modèle utilisé pour le calcul de l : pour simplifier, les sauts ont lieu à partir d'une extrémité de l'ADN. Ils peuvent connecter n'importe quel site, les sauts vers des sites d'abscisse curviligne faible ayant une probabilité plus grande car ces sites sont en moyenne plus proches.

La conformation d'une pelote d'ADN en solution peut être décrite à l'aide du modèle de la "chaîne librement jointe". Ce modèle sera détaillé dans le chapitre suivant. Brièvement, il consiste à décomposer une molécule d'ADN en segments de longueur $2L_p$ ($L_p = 50$ nm étant la "longueur de persistance" de l'ADN) d'orientations indépendantes. Ce modèle indique qu'en moyenne $x^2(s) = 2sL_p$. Par ailleurs, nous avons vu que la probabilité $P(x)$ varie comme $1/x$. On a donc, en injectant la valeur moyenne de $x(s)$ dans l'équation précédente :

$$l = \frac{\int_0^L ds}{\int_0^L ds / \sqrt{2L_p s}} = \sqrt{LL_p/2}. \quad (1.8)$$

Pour une molécule d'ADN du bactériophage T7 utilisé dans nos expériences, de longueur 40 kb soit $13\ \mu\text{m}$, l est de l'ordre de $0.6\ \mu\text{m}$. Le rapport D_1/D peut être estimé à l'aide de considérations hydrodynamiques [21], sur lesquelles nous reviendrons en détail dans la dernière partie de ce travail. Il dépend de la taille de la protéine impliquée et a une valeur d'environ 1/10 pour une protéine de taille nanométrique. Finalement, $l_1 \simeq 0.2\ \mu\text{m} \simeq 600$ paires de bases. Ce modèle simple permet de prédire une longueur de sliding optimale de l'ordre du millier de paires de bases sur les ADN de bactériophages. Comme nous le verrons dans la partie suivante, cette valeur est cohérente avec celle qui a été prévue par Jeltsch et Pingoud pour l'enzyme EcoRV [39].

Remarque : Pour simplifier les calculs, nous n'avons pas pris en compte le fait que les zones explorées ne sont sans doute pas disjointes, c'est-à-dire que le processus de hopping ramène la protéine vers une zone d'ADN déjà explorée. Des calculs préliminaires, non exposés ici, montrent que l'ordre de grandeur de l_1 reste le même.

1.2 Des protéines bien adaptées à cette étude : les enzymes de restriction de type II

1.2.1 Systèmes de restriction-modification chez les bactéries

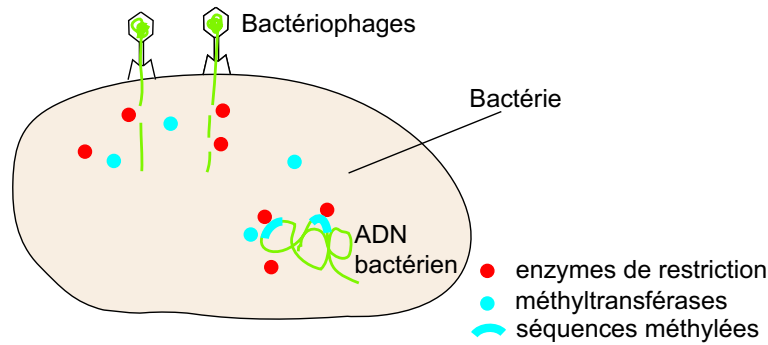


FIG. 1.14 – Système de restriction-modification de type II.

Les bactériophages sont des virus capables d'injecter leur matériel génétique à l'intérieur d'une bactérie, dans le but d'utiliser sa machinerie pour se multiplier. Pour se protéger de leurs attaques, les bactéries utilisent des systèmes de restriction-modification qui permettent de détruire l'ADN viral (activité de restriction), tout en protégeant l'ADN bactérien (activité de modification). Il existe trois types différents de systèmes de restriction/modification. Dans les systèmes de types I et III, les activités de modification et de restriction sont assurées par la même enzyme, dont l'activité requiert la consommation d'ATP. Les systèmes de type II sont des systèmes composés de deux enzymes distinctes opérant sur

1.2. ENZYMES DE RESTRICTION DE TYPE II

une même séquence-cible : une enzyme de restriction et une méthyltransférase. Le principe de leur action est le suivant (figure 1.14) :

- Les enzymes de restriction sont chargées de détruire l'ADN des bactériophages. Chaque enzyme de restriction reconnaît et clive une séquence spécifique de 4 à 8 pb (paires de bases). Contrairement aux enzymes de type I et III, les enzymes de restriction de type II ne consomment pas d'ATP, et se déplacent donc de manière purement diffusive.
- L'ADN bactérien est protégé par une seconde classe d'enzymes, les méthyltransférases, qui empêchent le clivage de l'ADN par la méthylation de la séquence-cible précédente.

Comme la longueur de la séquence-cible d'une enzyme de restriction est courte, il est statistiquement probable qu'elle existe sur un ADN viral pris au hasard. Ainsi, une séquence de 6 bp se rencontre en moyenne tous les $4^6=4096$ pb sur l'ADN, longueur inférieure à celle des ADN viraux (quelques dizaines de kilobases). De plus, de nombreuses enzymes de restriction différentes, une centaine par exemple chez *Escherichia coli*, sont présentes à l'intérieur des bactéries, ce qui permet potentiellement de cliver quasiment n'importe quel ADN viral.

Cependant, une action rapide des enzymes de restriction suite à une attaque virale est indispensable. D'une part, le bactériophage doit être dégradé avant qu'il ne parvienne à se multiplier, et d'autre part les enzymes de restriction sont en compétition cinétique avec les méthyltransférases également présentes dans la cellule, potentiellement capables de protéger l'ADN viral. Dans la cas des enzymes de restriction, la localisation rapide d'une séquence-cible conditionne donc directement la survie cellulaire.

1.2.2 Intérêt des enzymes de restriction de type II

Pour des raisons à la fois fondamentales et pratiques, les enzymes de restriction de type II sont bien adaptées à l'étude des processus de localisation des séquences-cibles sur l'ADN. Tout d'abord, ces enzymes constituent un parfait exemple de protéines devant localiser de courtes séquences-cibles sur de longues molécules d'ADN. En effet, alors que les ADN viraux ont en général une longueur de plusieurs dizaines de kilobases, les séquences-cibles des enzymes de restriction ont quant à elles une taille typique de 4 à 8 pb, et leur nombre et leur emplacement sont parfaitement connus si l'on connaît la séquence de l'ADN viral. Ensuite, le fait que l'action des enzymes de restriction consiste en un clivage des molécules d'ADN possède un grand intérêt pratique, puisqu'il autorise l'utilisation de l'une des techniques de biochimie les plus standards, les gels d'électrophorèse, qui permet de mesurer la distribution des tailles des molécules d'ADN présentes dans un échantillon donné. Cette technique simple, utilisée dans la plupart des expériences de biochimie présentées ici, donne accès à des informations quantitatives sur l'action des enzymes de restriction sur l'ADN. Enfin, certains des gènes codant pour ces enzymes ayant été isolés, plusieurs groupes de biochimistes sont capables de les produire en quantités importantes, ainsi que d'en synthétiser des mutants.

Depuis le début des années 80, un nombre important de biochimistes se sont

intéressés au problème de la localisation des séquences-cibles par les enzymes de restriction de type II, et en particulier EcoRI et EcoRV. Un grand nombre de ces expériences ont démontré la possibilité d'un mouvement de sliding *in vitro*, alors que les expériences récentes de Steven Halford ont mis en évidence l'implication des processus 3D (hopping), également *in vitro*. S'il est à présent établi que la localisation des séquences-cibles utilise conjointement ces deux mécanismes, leur importance respective fait en revanche l'objet de vifs débats depuis quelques années, comme en témoigne le nombre élevé de publications récentes sur ce sujet [29, 33, 34, 39, 41].

Dans cette partie, nous allons tout d'abord brièvement présenter les expériences qui ont permis de mettre en évidence l'interaction des enzymes de restriction avec l'ADN non spécifique. Nous décrirons ensuite les expériences, essentiellement conduites dans le groupe d'Alfred Pingoud à Giessen (Allemagne), qui ont démontré l'implication du processus de sliding. Puis nous présenterons les expériences menées dans le groupe de Steven Halford à Bristol (Royaume-Uni), qui mettent en évidence le rôle joué par les mécanismes de hopping. Enfin, nous décrirons des expériences de biochimie permettant en principe de déterminer l'importance respective de ces mécanismes. Nous montrerons comment les résultats de ces expériences ont été interprétés par les deux groupes mentionnés ci-dessus, avec des conclusions opposées.

1.2.3 Mise en évidence expérimentale de l'interaction des enzymes de restriction avec l'ADN non spécifique

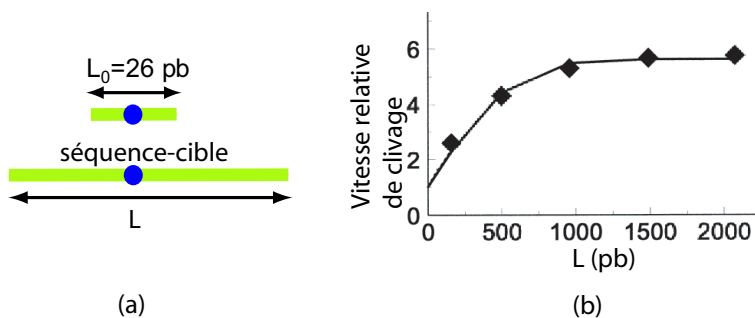


FIG. 1.15 – Vitesse de clivage de molécules d'ADN par EcoRV en fonction de leur longueur [39]. (a) Une unique séquence-cible pour EcoRV est insérée sur des molécules d'ADN de différentes longueurs. La molécule de référence est un oligonucléotide de longueur $L_0 = 26$ pb. (b) Vitesse relative (par rapport à l'oligonucléotide de référence) du clivage par EcoRV de sa séquence-cible sur les différentes molécules d'ADN. Les traits pleins sont une interpolation utilisant le modèle du sliding.

Afin de tester l'implication de l'ADN non spécifique dans le processus de localisation des séquences-cibles, plusieurs groupes ont réalisé des expériences où la

1.2. ENZYMES DE RESTRICTION DE TYPE II

séquence-cible d'une enzyme de restriction est insérée sur des molécules d'ADN de tailles différentes. La vitesse avec laquelle cette séquence-cible est clivée est mesurée en fonction de la longueur des molécules d'ADN. La figure 1.15 présente les résultats des expériences de A. Jeltsch et A. Pingoud, réalisées avec EcoRV [39]. Comme l'indique cette figure, l'allongement des molécules d'ADN accélère le clivage de la séquence-cible, jusqu'à environ 1000 pb. Ce résultat prouve l'implication de l'ADN non spécifique dans le processus par lequel EcoRV localise sa séquence-cible. En revanche, même si les résultats semblent bien interprétés avec le modèle de sliding, rien ne prouve que ce mécanisme soit le seul à même d'en rendre compte. Nous allons à présent passer en revue les expériences menées pour mettre en évidence spécifiquement le sliding ou le hopping.

1.2.4 Mise en évidence expérimentale du sliding

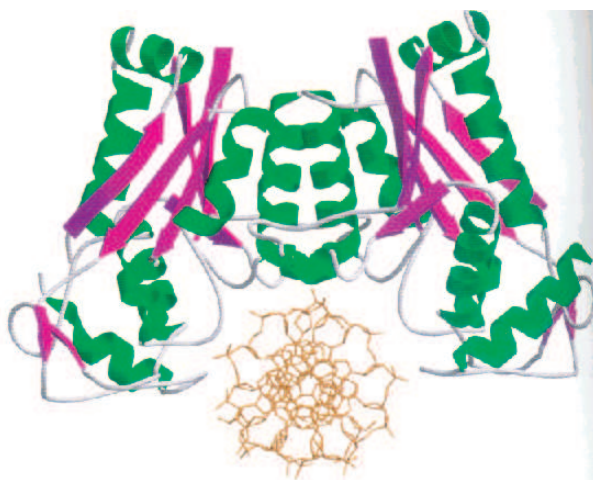


FIG. 1.16 – Structure du complexe non spécifique BamHI-ADN (l'ADN est représenté en bas sur ce schéma), obtenue après cristallisation. La manière dont l'enzyme entoure l'ADN est compatible avec sa diffusion le long de la molécule d'ADN.

La structure de quelques complexes non spécifiques protéine-ADN a pu être obtenue par cristallisation. Viadu et Aggarwal ont ainsi cristallisé en 2000 l'enzyme BamHI liée à un fragment d'ADN non spécifique. Selon ces auteurs, la configuration de l'enzyme dans ce complexe, intermédiaire entre sa configuration libre et celle qu'elle adopte sur sa séquence-cible, ne permet pas le clivage de l'ADN, mais suggère la possibilité d'un sliding de BamHI le long de l'ADN (figure 1.16) [42]. Cet argument semble aussi valable pour EcoRV, dont la structure est présentée au début du dernier chapitre de ce mémoire. Ces spéculations géométriques ont été complétées par des expériences qui ont montré l'implication du sliding *in vitro*.

1.2.4.1 Action sur des molécules d'ADN contenant deux séquences-cibles proches d'une extrémité

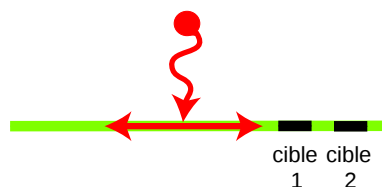


FIG. 1.17 – Action d'une enzyme sur une molécule d'ADN contenant deux séquences-cibles proches d'une extrémité.

Ces expériences consistent à synthétiser des molécules d'ADN contenant deux séquences-cibles proches d'une extrémité (figure 1.17), et à comparer la vitesse de clivage de ces deux cibles. Le groupe d'A. Pingoud a ainsi analysé en 1994 l'action d'EcoRI sur des molécules d'ADN de 900 pb avec deux sites à 5 et 13 pb d'une même extrémité [43], puis en 1998 celle d'EcoRV sur des substrats similaires [39]. Dans les deux cas, une coupure préférentielle de la séquence-cible "intérieure" est observée. Ce résultat est interprété par l'existence de sliding. En effet, les processus de hopping n'ont aucune raison de favoriser fortement une des cibles par rapport à l'autre, alors que le sliding induit en revanche une nette préférence pour la cible "intérieure". En effet, une enzyme s'étant associée au centre de la molécule d'ADN atteindra d'abord la cible "intérieure" par sliding. Après son clivage, elle n'atteindra pas nécessairement la seconde séquence-cible : elle peut se dissocier de la molécule d'ADN après le clivage de la première cible, ou rester sur le fragment qui ne contient pas la seconde séquence-cible.

1.2.4.2 Influence de la présence d'obstacles le long de l'ADN

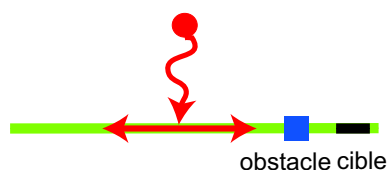


FIG. 1.18 – Action d'une enzyme sur une molécule d'ADN contenant une séquence-cible en présence d'un obstacle.

En 1994, l'équipe d'A. Pingoud a également analysé l'action d'EcoRI sur des molécules d'ADN contenant une séquence-cible proche d'une extrémité de la molécule, et une triple hélice à son voisinage (figure 1.18) [43]. Ces expériences indiquent que la présence d'une triple hélice réduit fortement l'efficacité de la

1.2. ENZYMES DE RESTRICTION DE TYPE II

localisation des séquences-cibles. La modification réalisée n'a *a priori* aucun effet sur les mécanismes 3D (hopping). On conçoit en revanche que les triples hélices constituent un obstacle pour la diffusion unidimensionnelle le long des molécules d'ADN. Les résultats observés peuvent donc être interprétés par la réduction du sliding sur l'ADN.

1.2.4.3 Utilisation d'une enzyme liée à l'ADN de manière covalente

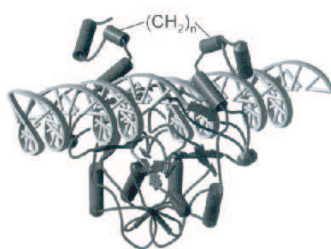


FIG. 1.19 – Représentation schématique de l'expérience menée par Schulze et al.. Les bras de l'enzyme EcoRV ont été liés de manière covalente autour de l'ADN.

En 1998, Schulze et al. ont réussi à produire un mutant d'EcoRV dont les bras sont liés de manière covalente autour d'une molécule d'ADN contenant une séquence-cible (figure 1.19). Cette liaison élimine toute possibilité de déplacement tridimensionnel [44]. Le fait que ces enzymes soient malgré tout capables de localiser et de cliver leur séquence-cible démontre la possibilité pour une enzyme de localiser sa cible par sliding uniquement, sans toutefois prouver que ce processus seul résume la dynamique des enzymes sauvages.

1.2.4.4 Pertinence de ces études pour l'interaction ADN-protéines *in vivo*

In vivo, l'ADN cellulaire est recouvert de nombreuses protéines [45], qui constituent des obstacles à la diffusion 1D le long du grand sillon de l'ADN. Le sliding, s'il consiste en une diffusion le long du grand sillon de l'ADN, ne peut donc avoir lieu *in vivo* que sur des longueurs inférieures à celles séparant ces obstacles. Il est cependant raisonnable de penser que l'ADN des bactériophages est exempt de protéines juste après son injection dans les bactéries, de sorte que le sliding pourrait être utilisé *in vivo* par les enzymes de restriction sur l'ADN des bactériophages exactement comme *in vitro*. [43, 46]. De plus, une étude récente de M. Kampmann [35] montre que le sliding pourrait avoir lieu à deux dimensions sur toute la surface des molécules d'ADN plutôt que dans leur grand sillon ; en effet, cet auteur a montré que des obstacles insérés dans le grand sillon qui n'encerclent pas entièrement le double-brin d'ADN peuvent être dépassés par sliding. Notons que ceci n'est pas le cas pour les triples hélices utilisées comme obstacles

par l'équipe d'A. Pingoud (voir plus haut), peut-être parce que ces obstacles encerclent complètement l'ADN et empêchent même la diffusion 2D à la surface des molécules d'ADN.

1.2.5 Mise en évidence expérimentale du hopping

1.2.5.1 Action sur différents substrats d'ADN

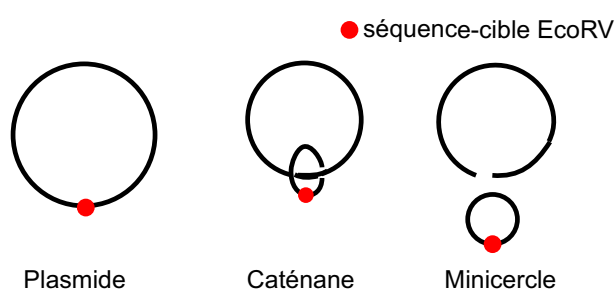


FIG. 1.20 – Molécules d'ADN utilisées par Gowers et Halford [41].

En 2003, Gowers et Halford ont comparé l'action de EcoRV sur trois substrats d'ADN (figure 1.20) [41] :

- un plasmide avec une séquence-cible pour EcoRV (3400 pb),
- une "caténane" constituée d'un minicercle avec une séquence-cible pour EcoRV (300 pb) accroché autour d'un plasmide plus grand (3100 pb),
- le même minicercle séparé du plasmide.

Les auteurs ont observé une coupure de la séquence-cible plus efficace sur le plasmide et la caténane que sur le minicercle. Ces résultats sont compatibles avec le modèle de hopping : le minicercle occupant un volume plus réduit dans l'espace, l'enzyme s'en dissociera plus vite. Ils sont en revanche incompatibles avec un modèle de sliding pur, car l'action sur le plasmide serait alors plus rapide que sur la caténane et le minicercle.

1.2.5.2 Effet du surenroulement de l'ADN

Dans le même article, Gowers et Halford ont également montré que les protéines localisaient plus rapidement leurs cibles sur des molécules d'ADN surenroulées que sur des molécules relâchées. Or le surenroulement des molécules d'ADN (*a priori* sans effet sur le sliding) réduit le volume qu'elles occupent dans l'espace, et favorise donc la diffusion par hopping.

1.2. ENZYMES DE RESTRICTION DE TYPE II

1.2.6 Quelle est l'importance respective des mécanismes 1D et 3D ?

L'ensemble des expériences décrites ci-dessus suggère une implication conjointe des mécanismes 1D et 3D dans la localisation des séquences-cibles. Leur importance relative dépend des conditions expérimentales, qui régissent la force des interactions non spécifiques ADN-protéine. Plusieurs groupes ont tenté de mesurer cette importance relative dans des conditions expérimentales fixées, par le biais d'expériences de processivité. Comme nous le verrons, ces expériences permettent théoriquement de séparer les contributions des mécanismes 1D/3D, mais leur interprétation est délicate et aucune conclusion définitive n'a pu en être tirée.

1.2.6.1 Importance des conditions expérimentales

Les interactions entre les enzymes de restriction et l'ADN sont essentiellement de nature électrostatique. La force de ces interactions dépend donc fortement des conditions expérimentales, et en tout premier lieu des concentrations ioniques. Les travaux de Engler et al. ont notamment montré que l'association d'EcoRV à l'ADN non spécifique est fortement réduite à haute salinité. En revanche le pH influe peu sur ces interactions [47]. C'est pourquoi la plupart des expériences visant à mettre en évidence le sliding, qui exige une forte affinité protéine/ADN, se placent dans des conditions de faible salinité (0-50 mM). Les processus 3D, qui exigent seulement des associations brèves protéine/ADN, sont potentiellement à l'œuvre sur une gamme de salinités plus large (typiquement 0-100 mM).

1.2.6.2 expériences de processivité

La mesure de l'importance respective des processus 1D et 3D à l'aide d'expériences de biochimie nécessite une expérience où les contributions de ces processus puissent être séparées et quantifiées. Dans ce but, des expériences de "processivité" ont été développées par les biochimistes.

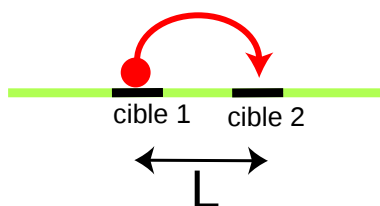


FIG. 1.21 – expériences de processivité.

Les expériences de processivité utilisent des molécules d'ADN comportant deux séquences-cibles pour l'enzyme étudiée. Elles mesurent la processivité de l'enzyme, c'est-à-dire sa capacité à couper successivement les deux séquences-cibles en fonction de la distance qui les sépare (figure 1.21). Ces expériences

sont réalisées en large excès d'ADN, dans des conditions où la coupure des deux séquences-cibles ne peut être imputée qu'à l'action processive d'une même enzyme. Le facteur de processivité, qui représente la probabilité pour une enzyme, après avoir coupé la première séquence-cible, d'atteindre et de couper la seconde séquence-cible avant de se dissocier de la molécule d'ADN, est mesuré sur un gel d'électrophorèse. Les différents modèles de diffusion prédisent des dépendances très différentes du facteur de processivité en fonction de la distance séparant les deux séquences-cibles. L'intérêt de ces expériences est donc de pouvoir potentiellement discriminer les contributions des différents mécanismes de diffusion. Le groupe de S. Halford a analysé en 2000 la processivité d'EcoRV sur des molécules d'ADN avec deux séquences-cibles séparées par des distances de 54 à 764 pb [33]. Les résultats de cette étude sont résumés dans la figure 1.22.

a) Analyse initiale

S. Halford a avancé que les résultats observés n'étaient pas compatibles avec le modèle du sliding. L'analyse a été réalisée avec l'hypothèse suivante : EcoRV reste associée à l'ADN après coupure de la première séquence-cible, et a une probabilité $1/2$ de rester sur le fragment d'ADN contenant la seconde séquence-cible (qu'elle peut atteindre par sliding), et $1/2$ de rester sur l'autre fragment (dans ce cas, elle ne peut atteindre la seconde séquence-cible par sliding). Dans ce modèle, la processivité liée à la coupure successive de deux séquences très proches est donc $1/2$. Avec cette hypothèse selon laquelle la processivité tend vers $1/2$ lorsque la distance inter-sites tend vers 0, le modèle du sliding décrit plus haut dans ce chapitre s'avère incapable d'interpoler l'ensemble des points expérimentaux, quelque soit la longueur moyenne du processus de sliding utilisée pour l'interpolation. Le groupe de S. Halford conclut donc que la localisation des séquences-cibles utilise essentiellement les processus 3D, le sliding n'ayant qu'une importance très marginale. Ces analyses prédisent en effet une longueur parcourue par sliding inférieure à 25 paires de bases avant dissociation.

b) Nouvelle analyse des résultats

En fait, comme l'ont noté Jeltsch et Urbanke [34], EcoRV pratiquant une coupure franche de sa séquence-cible, elle n'a que peu de chances de rester sur l'ADN après coupure ; le plus probable est sa dissociation, éventuellement suivie d'une réassociation rapide sur la même molécule d'ADN, qui a d'ailleurs une probabilité forte d'avoir lieu non loin de la première séquence-cible. Dans ce cas, la processivité maximale n'est pas égale à $1/2$, et ce paramètre doit être laissé libre pour l'analyse des résultats. Il devient alors possible d'interpoler plus convenablement les données expérimentales avec le modèle du sliding (figure 1.23). Selon les auteurs, la déviation entre le premier point expérimental (distance inter-sites de 56 pb) et l'interpolation issue d'un modèle de sliding est imputable à la probabilité non négligeable pour une aussi courte distance de trouver la seconde cible par diffusion tridimensionnelle.

1.2. ENZYMES DE RESTRICTION DE TYPE II

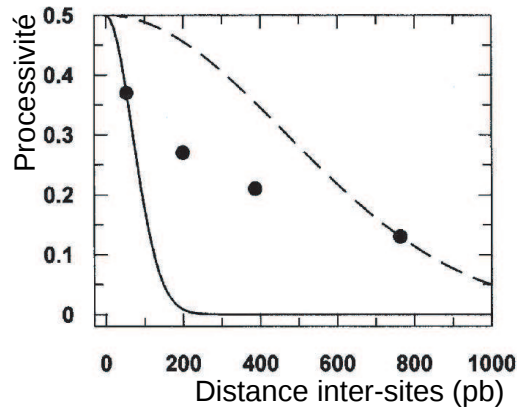


FIG. 1.22 – Mesures de processivité ; les points sont les mesures expérimentales ; les courbes solides et pointillées sont des interpolations (infructueuses) utilisant un modèle de sliding avec deux longueurs moyennes différentes (expériences et analyses du groupe de S. Halford [33]).

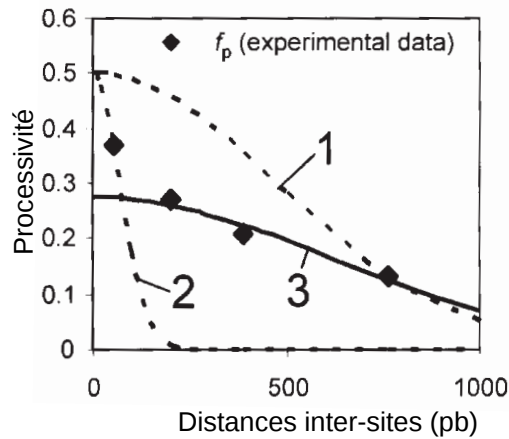


FIG. 1.23 – Nouvelle analyse des résultats de S. Halford en n'imposant pas une processivité maximale de $1/2$ (courbe 3). Les courbes 1 et 2 correspondent aux deux tentatives infructueuse d'interpolation par un modèle de sliding où la processivité maximale est fixée à $1/2$. D'après [34].

c) Conclusion

Les expériences de processivité, bien qu'elles offrent théoriquement la possibilité de trancher entre les mécanismes de sliding et de hopping, n'ont pas permis jusque là de déterminer leurs contributions respectives. Nous allons à présent montrer comment des expériences menées à l'échelle de la molécule unique peuvent contribuer significativement à la résolution du débat, toujours actuel, sur les

mécanismes de localisation de leurs séquences-cibles par les enzymes de restriction.

1.3 expériences à l'échelle de la molécule unique

Les expériences de biochimie présentées plus haut ont une limitation fondamentale : l'interprétation de leurs résultats nécessite leur confrontation aux prédictions issues des modèles décrivant les différents mécanismes microscopiques possibles, afin de voir quel modèle fournit le meilleur accord avec les résultats. Cependant, les modèles utilisés ont le double désavantage d'être souvent complexes et de faire appel à des paramètres mal connus expérimentalement, tels que le coefficient de diffusion lié au sliding et la durée des phases d'association. L'interprétation de ces expériences est donc fondamentalement délicate et conduit à des conclusions divergentes suivant les groupes. En effet, pour le groupe d'Alfred Pingoud, la localisation *in vitro* des séquences-cibles se fait essentiellement par diffusion unidimensionnelle le long de l'ADN (sliding). Ce groupe conclut à une exploration d'environ 1000 paires de bases avant dissociation pour les enzymes EcoRI et EcoRV. Selon Steven Halford la localisation des séquences-cibles utilise essentiellement les processus 3D, le sliding n'ayant qu'une importance très marginale. Son groupe prédit en définitive une longueur parcourue par événement de sliding inférieure à 25 paires de bases. Les expériences à l'échelle de la molécule unique sont en mesure de fournir un accès direct aux caractéristiques microscopiques de la diffusion, par exemple pour la diffusion 1D sa durée et son coefficient de diffusion... A l'heure actuelle, plusieurs groupes dans le monde utilisent ces techniques en vue de déterminer précisément les mécanismes à l'œuvre pour la localisation des séquences-cibles, sans que ces travaux n'aient encore donné lieu à des publications.

1.3.1 Méthodes non optiques

Plusieurs techniques expérimentales ont été développées puis appliquées à l'étude des interactions ADN-protéines ces dernières années. Nous allons passer en revue les principales d'entre elles, et montrer pourquoi les techniques optiques sont adaptées au problème biologique qui nous intéresse.

1.3.1.1 Microscopie de force atomique

La microscopie de force atomique (AFM) est une technique utilisée pour imager des surfaces. Elle repose sur le balayage d'une pointe nanométrique au-dessus de l'échantillon étudié. La résolution spatiale obtenue par AFM est excellente, de l'ordre du nanomètre. En revanche la résolution temporelle est médiocre, plusieurs secondes séparant deux images consécutives). Guthold et al. ont utilisé cette technique en 1994 pour l'étude de l'interaction ARN polymérase-ADN [48]. Ceci a permis à ce groupe d'observer qualitativement le sliding de l'ARN polymérase sur

1.3. EXPÉRIENCES À L'ÉCHELLE DE LA MOLÉCULE UNIQUE

l'ADN, dans des conditions toutefois où les interactions ADN-protéines, et notamment leur durée (plusieurs dizaines de minutes au lieu de quelques secondes), sont fortement modifiées à cause de l'interaction des protéines avec les surfaces de mica utilisées. Des résultats similaires ont été obtenus en 1998 par Van Noort et al. sur l'interaction photolyase-ADN [49].

Cette technique n'est pas adaptée à l'étude dynamique de courts événements d'interaction protéine-ADN, dont la durée est au maximum de l'ordre de la seconde.

1.3.1.2 Techniques de micromanipulation (pinces optiques et magnétiques)

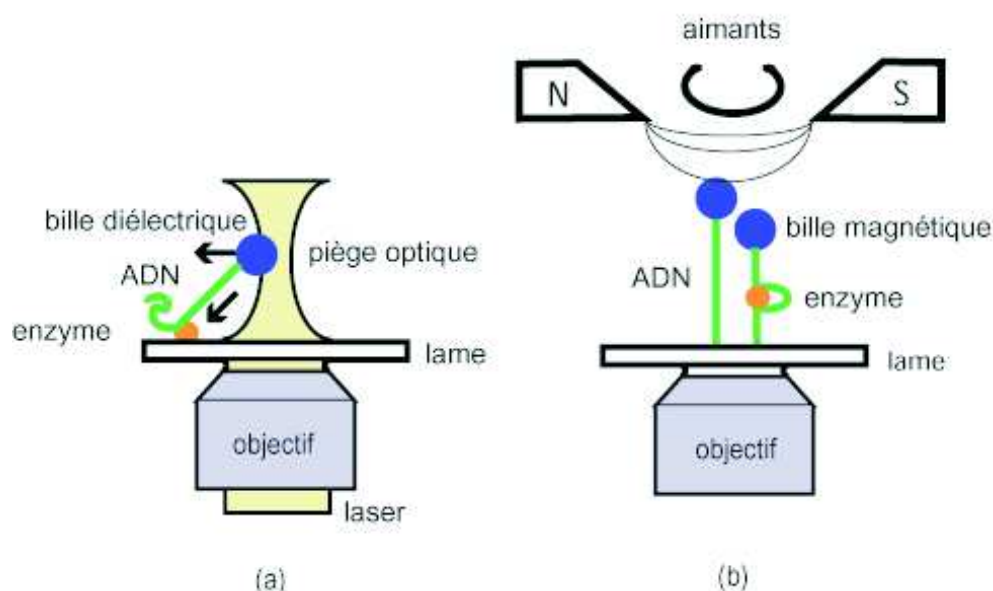


FIG. 1.24 – Principe des pinces optiques (a) et magnétiques (b).

Depuis une dizaine d'années sont apparus des dispositifs qui permettent de manipuler des macromolécules isolées. Deux d'entre eux sont très utilisés pour l'étude des interactions ADN-protéines : les pinces optiques et les pinces magnétiques. Les principes de ces deux dispositifs sont identiques : des billes (diélectriques/magnétiques) sont greffées à l'extrémité des molécules d'ADN. Un champ (électrique/magnétique) permet d'agir sur ces billes (figure 1.24). Il est donc possible d'étirer, et même de tordre (dans le cas des pinces magnétiques) les molécules d'ADN. Ces dispositifs ont permis de sonder les propriétés physiques de l'ADN (élasticité [5,50], réponse à une torsion [7,51]). Ils ont également été utilisés pour caractériser l'action d'enzymes sur l'ADN, par exemple la polymérisation d'ARN par une polymérase [12] ou la relaxation d'ADN surenroulé par des topoisomérases [14,15]. Ces techniques sont cependant réservées à l'étude de protéines

exerçant sur l'ADN des forces de l'ordre du pN, produites généralement grâce à la consommation d'ATP. Elles ne sont pas adaptées à l'étude du mouvement d'enzymes qui diffusent le long de l'ADN sans exercer de forces de cette amplitude ni modifier la longueur de l'ADN.

1.3.2 Méthodes optiques

Les méthodes optiques consistent à coupler les biomolécules d'intérêt à un ou quelques fluorophore(s) et à suivre ce(s) fluorophore(s) au cours du temps. Contrairement aux techniques de pinces optiques et magnétiques, ces méthodes permettent la visualisation directe du mouvement des enzymes sur l'ADN, et donnent des informations locales sur les processus en jeu. Elles sont donc bien adaptées à l'étude de phénomènes diffusifs.

1.3.2.1 Utilisation de fluorophores pour la visualisation des biomolécules

Les molécules biologiques ne sont en général pas fluorescentes dans le visible. Les méthodes optiques consistent à les coupler à des molécules fluorescentes (appelées "fluorophores") afin de pouvoir suivre leur mouvement au cours du temps. Il existe une très large gamme de fluorophores commercialement disponibles,

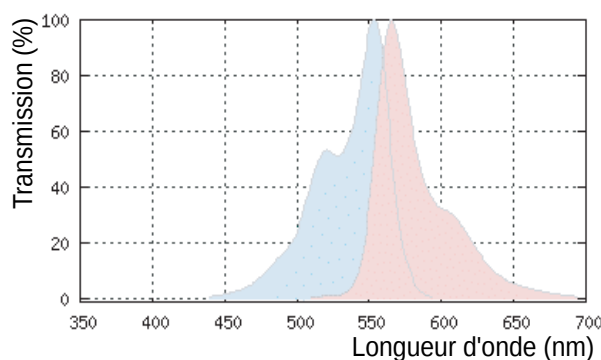


FIG. 1.25 – Spectres d'excitation (bleu) et d'émission (rose) du Cy3.

absorbant et émettant à différentes longueurs d'onde. En guise d'exemple, les spectres d'absorption et d'émission d'un fluorophore d'usage courant en biophysique, le Cy3, sont représentés sur la figure 1.25. Les propriétés les plus importantes d'un fluorophore sont :

- son absorbance, qui représente sa capacité à absorber des photons,
- son rendement quantique, c'est-à-dire la proportion de photons de fluorescence émis par photon absorbé ; en effet l'émission d'un photon de fluorescence est concurrencée par des processus de désexcitation non radiatives,

1.3. EXPÉRIENCES À L'ÉCHELLE DE LA MOLÉCULE UNIQUE

- sa photostabilité, qui représente sa capacité à émettre un nombre de photons plus ou moins grand avant l'arrêt définitif de sa fluorescence (phénomène de photoblanchiment),
- son déplacement de Stokes, c'est-à-dire l'écart spectral entre les longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Plus cet écart est grand, plus il est facile de séparer au moyen de filtres la lumière de fluorescence émise par le fluorophore de la lumière utilisée pour l'exciter.

Les progrès technologiques considérables accomplis dans le domaine de l'imagerie de fluorescence au cours de la dernière décennie permettent désormais la détection de fluorophores individuels. En outre, les "bons" fluorophores, c'est-à-dire ceux dont les propriétés optiques répertoriées ci-dessus sont bonnes, peuvent être détectés avec des résolutions spatiale et temporelle compatibles avec l'étude dynamique de l'interaction entre protéines et ADN. Ainsi, comme nous le verrons ultérieurement, le travail présenté dans cette thèse doit beaucoup à l'utilisation de nanocristaux, qui sont des fluorophores inorganiques dont les propriétés optiques (absorbance, rendement quantique, photostabilité et séparation des spectres d'excitation et d'émission) sont excellentes. Nous sommes parvenus à coupler ces fluorophores à des enzymes EcoRV, et à suivre leur dynamique avec des résolutions spatiale et temporelle respectivement de 10 nm et 20 ms.

1.3.2.2 Utilisation des méthodes optiques en vue de l'étude de la dynamique des interactions ADN-protéines

Ces dernières années, plusieurs groupes ont utilisé les méthodes optiques afin d'étudier l'action de diverses protéines sur l'ADN. Ce paragraphe décrit trois de ces expériences. Dans tous les cas, deux grandes étapes sont nécessaires à la réalisation de telles expériences :

- Les molécules d'ADN sont sous forme de pelotes en solution. Or le contour de telles pelotes ne peut pas être observé en microscopie optique. Il est donc nécessaire de déplier les molécules d'ADN.
- Les biomolécules que l'on souhaite observer doivent être couplées à un ou quelques fluorophore(s).

Observation du mouvement de l'enzyme de restriction EcoRI le long de l'ADN (groupe de M. Washizu, Japon, 2000)

Kabata et al. ont étiré des molécules d'ADN parallèlement entre deux électrodes. Ils ont ensuite introduit au voisinage de ces molécules des enzymes EcoRI couplées à quelques molécules de rhodamine, dans un flux de direction différente de celle des molécules d'ADN étirées. Comme le montre la figure 1.26, la trajectoire des enzymes marquées alterne des mouvements dans la direction du flux, interprétés comme un mouvement en solution, des mouvements dans la direction de l'ADN, interprétés comme le glissement d'enzymes liées à l'ADN, et des pauses interprétées comme la fixation d'EcoRI à sa séquence-cible [18]. Cette expérience semble démontrer la possibilité pour EcoRI d'un mouvement le long de l'ADN.

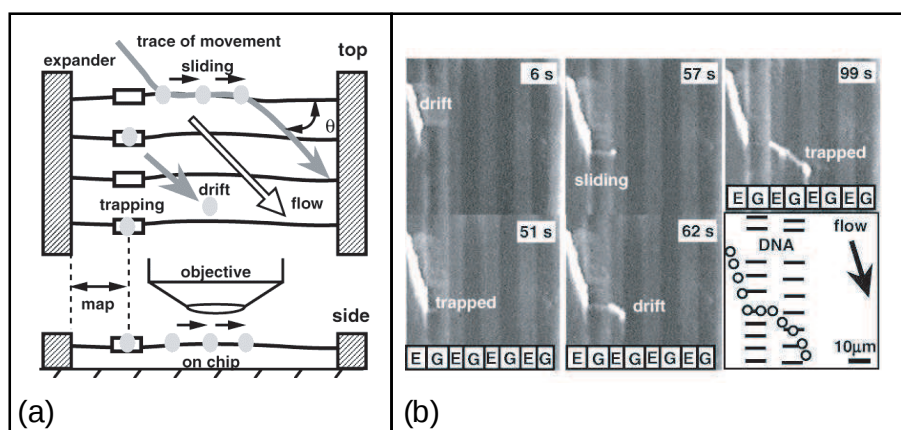


FIG. 1.26 – expérience de M. Washizu : (a) Observation du mouvement d'enzymes marquées dans un flux en présence de molécules d'ADN étirées dans une direction non parallèle au flux. (b) Une des trajectoires observées.

Cependant, la présence d'un flux dans cette expérience induit une direction privilégiée pour le mouvement d'EcoRI. Le sliding d'EcoRI le long de l'ADN est donc biaisé par la présence de ce flux, de sorte que cette expérience ne permet pas d'accéder directement aux caractéristiques de la diffusion d'EcoRI le long de l'ADN.

Observation du sliding d'une ARN polymérase le long de l'ADN (groupe de T. Yanagida, Japon, 1999)

L'expérience de Harada et al. présentée sur la figure 1.27 combine l'utilisation de techniques de micromanipulation pour étirer l'ADN, et de techniques optiques pour observer l'interaction avec l'ADN d'une ARN polymérase marquée avec du Cy3. La combinaison de ces deux techniques n'est expérimentalement pas aisée. L'équipe de T. Yanagida y est néanmoins parvenue en étirant les molécules d'ADN au-dessus de surfaces structurées, ce qui permet de limiter l'illumination des enzymes marquées au voisinage de la molécule d'ADN par l'utilisation d'une onde évanescente. Ce mode de détection supprime le fond lumineux dû aux enzymes situées loin de cette molécule et améliore donc la précision avec laquelle les enzymes marquées interagissant avec l'ADN peuvent être localisées [11]. Cette expérience a permis d'observer le sliding d'ARN polymérases individuelles le long de l'ADN. Cependant, le coefficient de diffusion correspondant n'a été caractérisé que semi-quantitativement au terme de cette étude.

Observation de la polymérisation d'ARN par une ARN polymérase (groupe de B. Berge, Lyon, 2002)

Guérout et al. ont réalisé en 2002 une expérience visant à étudier l'action d'une ARN polymérase par microscopie de fluorescence. Ils ont pour cela déplié et accroché sur une surface des molécules d'ADN en utilisant la technique de "peignage

1.3. EXPÉRIENCES À L'ÉCHELLE DE LA MOLÉCULE UNIQUE

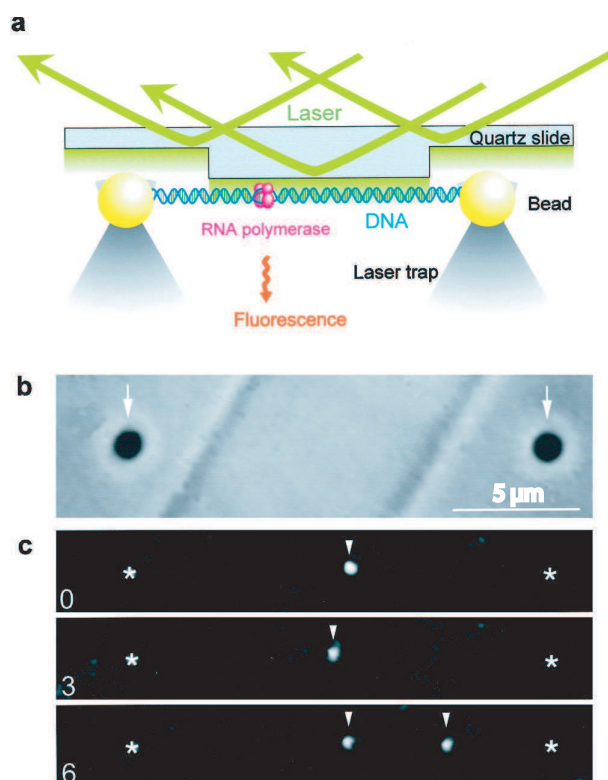


FIG. 1.27 – expérience de T. Yanagida : (a) L'ADN est couplé à deux billes diélectriques et étiré au moyen de pinces optiques au-dessus d'une surface présentant une "marche", ce qui permet l'utilisation d'une onde évanescence. (b) Observation des billes. (c) Trois images extraites d'un film, montrant le déplacement d'ARN polymérases marquées (pointées par des flèches) le long de l'ADN.

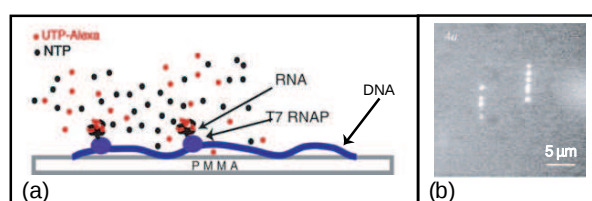


FIG. 1.28 – expérience de B. Berge : (a) Principe de l'expérience : des molécules d'ADN peignées sont mises en présence d'ARN polymérase et de nucléotides fluorescents. (b) Les images réalisées montrent que les ARN polymérases ont réussi à synthétiser des molécules d'ADN (points lumineux).

moléculaire", qui sera décrite dans le chapitre suivant de cette thèse. L'incorporation de nucléotides fluorescents par une polymérase non marquée conduit à la présence de chapelets de molécules d'ARN fluorescentes le long des molécules d'ADN (figure 1.28) [13]. Cette expérience démontre qu'il est possible de faire

agir des protéines sur des molécules d'ADN individuelles peignées sur une surface. Néanmoins, cette étude était essentiellement "statique". La cinétique de la polymérisation d'ARN n'a pas été examinée : il semble en effet très difficile de quantifier la quantité d'ARN produite au cours du temps dans cette expérience. Notons de plus que dans cette expérience, ce n'est pas l'enzyme étudiée qui a été visualisée, mais les brins d'ARN produits par son action. Une telle approche n'est pas possible avec une enzyme de restriction.

1.3.2.3 Stratégie utilisée dans nos expériences

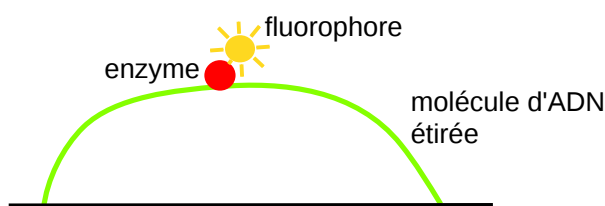


FIG. 1.29 – Stratégie expérimentale.

Notre expérience vise à l'observation directe du sliding d'une enzyme de restriction EcoRV le long d'une molécule d'ADN individuelle. Une représentation très schématique du dispositif utilisé est donnée sur la figure 1.29. Nous avons utilisé des protocoles d'étirement de l'ADN et de couplage des enzymes à des fluorophores un peu différents de ceux présentés dans le paragraphe précédent.

Etirement de l'ADN

Nous avons développé une technique pour placer les molécules d'ADN dans une configuration étirée "en arche", qui permet leur interaction ultérieure avec des protéines. La description de cette technique fait l'objet du chapitre suivant.

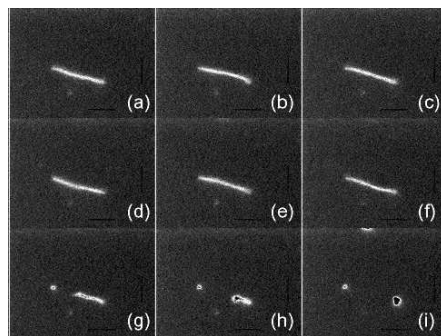
Cette méthode d'étirement est plus simple à mettre en œuvre expérimentalement que celle utilisée par T. Yanagida, qui requiert l'utilisation de pinces optiques et la fabrication de surfaces structurées. Elle conduit de plus à un accrochage spécifique des extrémités de l'ADN, et non à de nombreux points d'ancrage des molécules d'ADN sur les surfaces comme c'est le cas avec la technique utilisée par Guérout et al..

Couplage d'EcoRV à un fluorophore

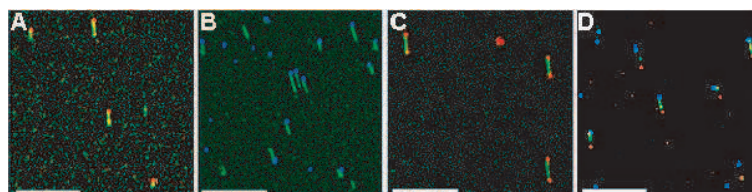
Les deux impératifs majeurs liés à ce couplage sont de ne pas gêner l'action des enzymes et de permettre leur détection avec des résolutions spatiale et temporelle suffisantes pour caractériser quantitativement leurs mouvements sur l'ADN. Ces contraintes ont pu être satisfaites par le couplage d'EcoRV à des nanocristaux, qui sont des fluorophores inorganiques dont les propriétés d'absorbance et de photostabilité sont excellentes. Le dernier chapitre de ce mémoire est consacré aux résultats obtenus.

Chapitre 2

Comment placer les molécules d'ADN dans une configuration optimale pour l'observation de leur interaction avec les protéines ?



Observation de molécules d'ADN étirées



Détection de molécules d'ADN avec des nanocristaux

2.1 Etirement des molécules d'ADN

En solution aqueuse, les molécules d'ADN se présentent sous forme de pelotes, dont la position et la conformation varient rapidement au cours du temps. Ces pelotes ne peuvent pas être résolues en microscopie optique. Il est donc nécessaire de les déplier et de les immobiliser. Pour cela, des techniques très différentes ont déjà été mises en œuvre : couplage de billes diélectriques/magnétiques (manipulables avec des pinces optiques/magnétiques) aux extrémités des molécules d'ADN [5, 52, 53], ancrage sur une surface d'une extrémité des molécules puis étirement dans un champ électrique [54, 55] ou dans un écoulement [2, 56].

L'observation en microscopie de fluorescence de l'interaction de protéines avec des molécules d'ADN étirées par ces différentes méthodes n'est pas aisée. En effet, les billes couplées aux molécules d'ADN dans les dispositifs de pinces optiques/magnétiques diffusent fortement la lumière, dégradant le rapport signal à bruit de détection en épifluorescence. Leur taille micrométrique ne rend possible l'utilisation d'une imagerie en onde évanescence qu'au prix d'un dispositif expérimental complexe [11]. La préparation de surfaces permettant l'utilisation de techniques électrophorétiques est longue et délicate, et les champs électriques élevés utilisés (supérieurs à 10^6 V/m dans [54]) peuvent avoir un effet perturbateur. Enfin, l'interaction des protéines avec l'ADN est fortement modifiée dans un écoulement, en raison de la force hydrodynamique qui s'exerce alors sur les protéines.

Le peignage moléculaire constitue une autre technique permettant de déplier les molécules d'ADN, [57, 58]. Cette technique permet d'étirer parallèlement un grand nombre de molécules d'ADN sur une surface. Le peignage est une technique simple à mettre en œuvre puisqu'il ne requiert que l'utilisation de surfaces hydrophobes et ne nécessite aucune modification chimique des molécules d'ADN. Nous avons fait usage à plusieurs reprises de cette technique, notamment pour accrocher des nanocristaux aux extrémités de molécules d'ADN peignées (cf partie 2.3). Néanmoins, le surétirement des molécules d'ADN et leurs nombreux points d'ancrage à la surface limitent l'utilisation du peignage pour observer l'interaction ADN-protéines. C'est pourquoi nous avons développé une nouvelle technique, baptisée "étirement", qui repose sur un principe voisin mais ne souffre pas de ces inconvénients. Cette partie décrit brièvement le dispositif expérimental utilisé pour observer les molécules d'ADN en fluorescence, puis les techniques de peignage et d'étirement. L'analyse détaillée de la conformation étirée des molécules fera l'objet de la partie suivante.

2.1.1 Observation de molécules d'ADN individuelles en microscopie de fluorescence

2.1.1.1 Marquage fluorescent de l'ADN

Dans ces expériences, nous avons utilisé des molécules d'ADN linéaires de 10 à 50 kb -les molécules plus courtes ne sont pas appropriées à des études quantitatives

CHAPITRE 2. ETIREMENT DE L'ADN ET DÉTECTION PAR DES NCS

sur leur dynamique, les molécules plus longues sont trop fragiles. Notre choix s'est porté sur l'ADN du bactériophage λ , un ADN commercial de 48502 paires de bases, soit une longueur de contour de $16\text{ }\mu\text{m}$. Ces molécules ont été rendues fluorescentes par couplage avec le YOYO-1 (dimère d'oxazole jaune, Molecular Probes).

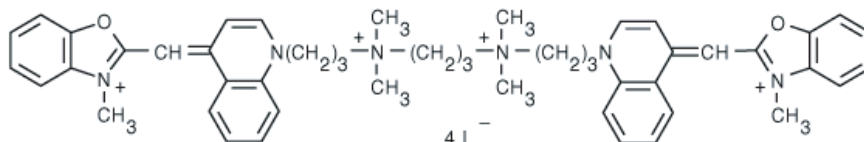


FIG. 2.1 – Structure chimique du YOYO-1.

Ce fluorophore est chargé positivement et possède des cycles (figure 2.1). Il interagit attractivement avec l'ADN chargé négativement et s'intercale le long des molécules d'ADN *via* ses cycles ; il devient alors beaucoup plus fluorescent (de l'ordre de 1000 fois) qu'en solution. Nous l'avons utilisé à un ratio statistique de 1 molécule de YOYO-1 toutes les 10 paires de bases. Dans ces conditions, la longueur de contour de l'ADN est légèrement augmentée ($18\text{ }\mu\text{m}$ [2]). Remarque : pour les expériences d'interaction de l'ADN avec des enzymes, décrites dans le chapitre 3, nous avons préféré au YOYO-1 le SYBR Gold, un fluorophore qui s'insère dans le petit sillon des molécules d'ADN.

2.1.1.2 Microscopie de fluorescence

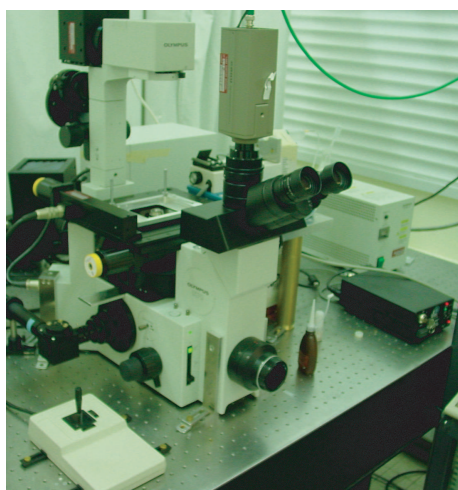


FIG. 2.2 – Microscope inversé utilisé.

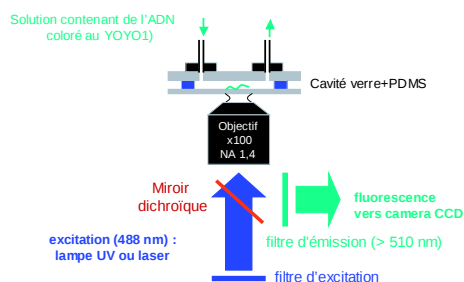


FIG. 2.3 – Schéma du dispositif optique utilisé pour étirer les molécules d'ADN et les observer.

Nous avons utilisé des techniques d'épifluorescence standard, sur un microscope inversé (Olympus) (figure 2.2). Pour exciter les molécules de YOYO-1, nous utilisons une lampe à mercure filtrée à la longueur d'onde d'excitation de ce

2.1. ETIREMENT DES MOLÉCULES D'ADN

fluorophore (filtre centré à 475 nm, de largeur 40 nm). La lumière de fluorescence est détectée à l'aide d'un filtre d'émission de 535 nm (largeur 45 nm). Le miroir dichroïque utilisé (505 nm) laisse passer la lumière émise par les fluorophores mais réfléchit la lumière d'excitation. Les fluorophores peuvent alors être observés dans l'oculaire du microscope ou imagés sur une camera CCD (figure 2.3).

2.1.2 Peignage

Le peignage est une technique simple et reproductible permettant de linéariser un grand nombre de molécules d'ADN sur une surface. Cette technique a été développée à l'ENS par l'équipe de David Bensimon et Vincent Croquette il y a une dizaine d'années [57, 58].

2.1.2.1 Réalisation expérimentale

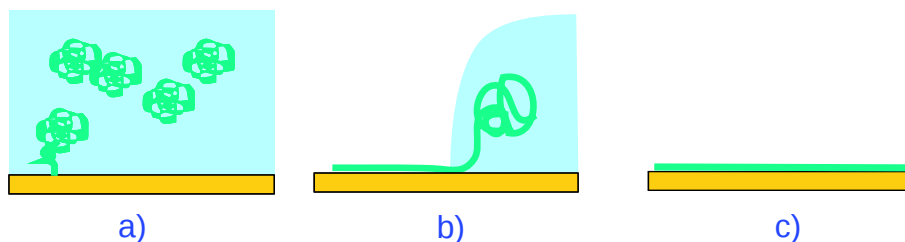


FIG. 2.4 – Principe du peignage. (a) les molécules d'ADN en solution peuvent s'accrocher à la surface ; (b) le passage du ménisque les déplie complètement ; (c) à la fin, la molécule d'ADN est linéaire et surétirée.

Le peignage consiste à placer des molécules d'ADN au voisinage d'une surface dans des conditions où elles peuvent s'y accrocher spécifiquement par leurs extrémités. Le passage d'un ménisque air-eau permet ensuite de les déplier entièrement (figure 2.4). Expérimentalement, on peut soit plonger une lame de verre rendue hydrophobe dans une solution d'ADN à un pH bien spécifique ($\text{pH}=5.5$) durant quelques minutes puis la retirer, soit déposer une microgoutte d'une solution d'ADN ($1\ \mu\text{l}$) sur une lame similaire et attendre son évaporation (figure 2.5).

L'efficacité du peignage dépend de manière cruciale de la nature des surfaces utilisées, et en particulier de leur caractère hydrophobe. Nos meilleurs résultats ont été obtenus sur des surfaces de polystyrène, déposé par spin-coating sur des lames de verre (figure 2.6). Nous avons également fabriqué des surfaces de PMMA (polyméthylmethacrylate), sur lesquelles le peignage était en général beaucoup moins dense. Le protocole utilisant l'évaporation de microgouttes est moins consommateur en ADN et très facile à mettre en œuvre. De plus, bien que les surfaces utilisées soient les mêmes, ce protocole est beaucoup moins sensible

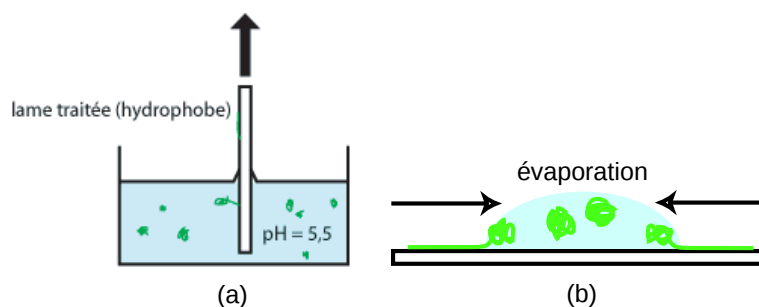


FIG. 2.5 – Techniques de peignage utilisées : (a) lame hydrophobe plongée dans une solution d'ADN puis retirée ; (b) évaporation de microgouttes.

au pH que le peignage en cuve. Ainsi, sans que la raison nous en apparaisse clairement, il est possible de peigner les molécules d'ADN à pH 7.5. Le peignage en cuve doit cependant être utilisé si l'on souhaite obtenir des molécules peignées parallèles sur l'ensemble de la lame, ou si l'on souhaite utiliser le dodécanol, un surfactant permettant de réduire le surétirement des molécules peignées [13].

Nous avons observé une dispersion importante sur les tailles apparentes des molécules peignées. Cette dispersion ne peut être expliquée que par le fait que certaines molécules d'ADN cassent au cours du processus de peignage et ne sont donc pas toutes entières.

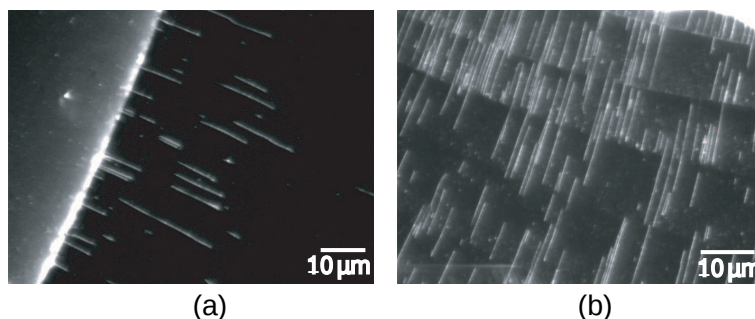


FIG. 2.6 – Peignage d'ADN par évaporation de microgouttes, à moyenne (a) et forte (b) concentrations d'ADN, sur des lames de verre recouvertes de polystyrène.

2.1.2.2 Ancrage spécifique des extrémités de l'ADN

a) pH de peignage

L'utilisation de surfaces hydrophobes permet d'ancrer spécifiquement les extrémités de molécules d'ADN sans avoir besoin de les modifier chimiquement. Le comportement de molécules d'ADN en solution au-dessus de telles surfaces est très dépendant du pH de la solution [59, 60] :

- A pH supérieur à 5.5, les molécules d'ADN n'interagissent pas avec la surface. Après passage du ménisque, la surface est exempte de molécules d'ADN.

2.1. ETIREMENT DES MOLÉCULES D'ADN

- A pH inférieur à 5.5, les molécules d'ADN sont adsorbées rapidement et irréversiblement sur la surface, sous forme de pelotes. Le passage du ménisque ne parvient pas à déplier ces pelotes.

- Dans une étroite zone d'environ 0.2 unités de pH autour de 5.5, les molécules d'ADN s'accrochent spécifiquement par leurs extrémités. Dans ce dernier cas seulement, les molécules accrochées ont une configuration linéaire après passage du ménisque.

b) Mécanisme microscopique

A ce jour, le mécanisme physique permettant cet accrochage spécifique n'est pas établi avec certitude. Cependant, le pH pour lequel il a lieu étant le même pour un grand nombre de surfaces hydrophobes [60], le mécanisme d'accrochage semble faire intervenir essentiellement les propriétés des molécules d'ADN. A pH neutre, les molécules d'ADN sont sous forme de double hélice, dont les deux brins sont appariés par l'intermédiaire de liaisons hydrogène entre bases azotées complémentaires. La partie extérieure de la double hélice (en contact avec la solution) étant hydrophile, il est énergétiquement plus favorable pour ces molécules de rester en solution que de s'adsorber à une surface.

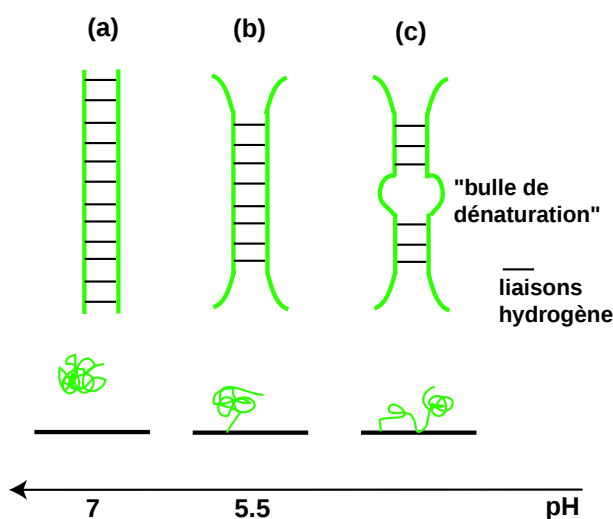


FIG. 2.7 – (a) A pH neutre, le double-brin d'ADN est entièrement apparié et donc sans affinité pour les surfaces ; (b) à mesure que le pH diminue apparaissent des parties dégrafées capables de s'accrocher à la surface, spécifiquement aux extrémités des molécules, (c) puis sur toute leur longueur.

Aux pH acides, une partie des bases azotées est protonée (notamment la cytosine qui a un pK_a de 4.5) ; dans cette configuration, ces bases ne peuvent plus former de liaisons hydrogène. L'appariement entre les deux brins complémentaires est donc perturbé et des "bulles de dénaturation" apparaissent le long du double brin d'ADN. Pour des raisons entropiques, le dégrafage du double brin est plus facile aux extrémités des molécules d'ADN, les zones dégrafées apparaissent donc

d'abord aux extrémités, puis, à mesure que le pH diminue, des "bulles de dénaturation" apparaissent sur toute la longueur des molécules [61] (figure 2.7). L'ADN simple brin présentant des parties hydrophobes en contact avec le solvant, les zones dégrafées vont avoir une forte affinité pour les surfaces. Ce mécanisme ne dépend pas de la nature cohésive ou non (c'est-à-dire avec ou sans dépassement d'une partie simple brin) des extrémités de l'ADN [60].

2.1.2.3 Etat des molécules peignées



FIG. 2.8 – Conformation de la double hélice d'ADN dans les formes B (à gauche) et S (à droite).

Pendant le passage du ménisque, des forces considérables, de l'ordre de 500 pN [58], s'appliquent sur les molécules d'ADN, initialement en pelote et dans leur forme canonique notée B, dans laquelle la double hélice d'ADN est caractérisée par une hélicité de 1 tour/10.5 pb. Sous l'effet de ces forces, les molécules d'ADN subissent un changement structural vers un état noté S, dans lequel l'ADN double-brin forme encore une double-hélice, mais dont l'hélicité (1 tour/38 pb) diffère de celle de l'état B (figure 2.8). A la fin du processus, les molécules sont dans une configuration linéaire, uniforme et surétirée (150 % de leur longueur de contour) [4].

Le peignage est un processus utilisable pour une très grande gamme de tailles des molécules d'ADN (jusqu'aux Megabases). Le taux d'étirement résultant de ce processus est indépendant de la taille des molécules utilisées, et homogène sur toute leur longueur. La configuration peignée est donc propice à des études "statiques" sur l'ADN. L'hybridation de sondes fluorescentes fluorescente sur l'ADN peigné (baptisée FISH pour Fluorescence In Situ Hybridization) permet par exemple la localisation précise de courtes séquences sur les molécules d'ADN [62, 63]. Dans certaines conditions, notamment l'ajout d'un surfactant pendant le peignage pour réduire le taux de surétirement, les protéines peuvent agir sur l'ADN peigné; ainsi, le groupe de B. Berge a pu observer de l'ARN synthétisé par des ARN polymérases agissant sur des molécules peignées [13].

2.1. ETIREMENT DES MOLÉCULES D'ADN

Néanmoins, les molécules d'ADN peignées conservent un grand nombre de points d'ancrage à la surface après leur réhydratation, et l'activité enzymatique est très perturbée au voisinage de ces points [64]. L'ADN peigné est donc loin d'être une configuration idéale pour observer l'interaction ADN-protéines. Nous avons donc développé une technique alternative, baptisée "étirement", qui repose sur des principes similaires mais à l'issue de laquelle les molécules d'ADN n'ont pas d'autres points d'ancrage que leurs extrémités. Cette configuration en "arche" nous a permis d'observer l'interaction des molécules d'ADN avec l'enzyme de restriction EcoRV, comme nous le verrons dans le chapitre 3.

2.1.2.4 Matériel et méthodes pour le peignage

a) Traitement des lamelles pour les rendre hydrophobes

Des lamelles couvre-objets circulaires (diamètre 22 mm) sont nettoyées dans un nettoyeur à plasma (Harrick Scientific). Elles sont rendues hydrophobes par spin-coating de quelques gouttes d'une solution de polystyrène (Sigma) dilué à 50 g/L dans du toluène (à 3000 tours/s pendant 20 s). Les lamelles sont ensuite recuites à 105 °C pendant au moins 1h (sans cette étape importante, le polystyrène a tendance à se décrocher des lames ultérieurement). Elles sont utilisées dans les jours suivant leur traitement.

b) Marquage de l'ADN au YOYO-1

1 μ g d'ADN λ et 1 μ l de solution commerciale de YOYO-1 (Molecular Probes) sont mélangés (ces quantités conduisent à un ratio (statistique) de 1 molécule de YOYO-1 toutes les 10 paires de bases). Le mélange est réalisé dans 100 μ l de tampon PBS (pH 7.4). Après 1 h de à température ambiante, la solution est stockée au réfrigérateur, et utilisée dans les jours suivants.

c) Peignage par immersion des lames dans une cuve

Une lamelle recouverte de polystyrène, fixée à une pince, est immergée pendant 3 minutes dans une cuve contenant 3 ml d'une solution d'ADN λ (50 ng/3 ml) tamponnée à pH 5.5 (MES 50 mM pH 5.5, EDTA 1 mM). Elle est ensuite retirée progressivement de la solution d'ADN.

d) Peignage par évaporation de microgouttes

L'ADN λ est dilué à 50 ng /ml dans une solution de MES 5 mM pH 5.5 EDTA 1 mM. Une dizaine de microgouttes (1 μ l) sont déposées sur la lame. Après quelques minutes, l'évaporation commence. Elle cesse lorsque le tampon MES atteint une concentration trop élevée dans le volume de liquide non évaporé, c'est pourquoi nous l'utilisons ici à 5 mM seulement dans la solution initiale.

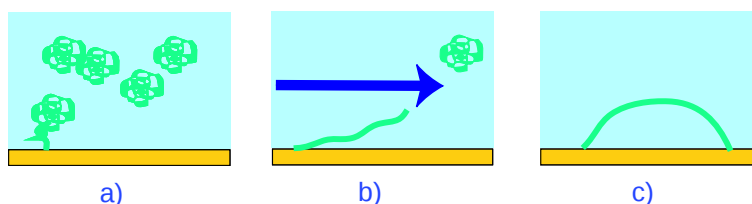


FIG. 2.9 – Principe de l'étirement. (a) les molécules d'ADN en solution peuvent s'accrocher à la surface ; (b) un flux hydrodynamique les déplie partiellement ; (c) si sa deuxième extrémité s'accroche, la molécule d'ADN accède à une configuration en arche.

2.1.3 Etirement

2.1.3.1 Principe

La technique d'étirement que nous avons développée au laboratoire s'inspire du peignage en ce qui concerne l'accrochage des molécules d'ADN à la surface, mais se déroule intégralement en solution, à l'intérieur d'une cavité à écoulement. Les mêmes conditions que précédemment (lame hydrophobe, pH 5.5) permettent l'ancrage par leurs extrémités des molécules d'ADN à la surface. Les molécules sont ensuite dépliées à l'aide d'un flux hydrodynamique ; au cours de cette phase, une partie des molécules accrochées à la surface s'accrochent par leur seconde extrémité, formant ainsi des arches qui persistent après la suppression du flux (figure 2.9).

a) Avantages

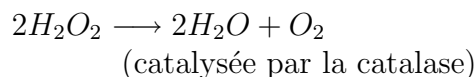
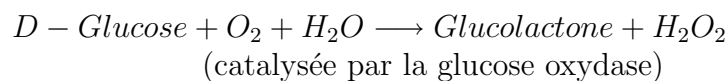
Cette technique permet, tout comme le peignage, d'étirer parallèlement de nombreuses molécules d'ADN. Les forces exercées sur l'ADN par l'application d'un flux hydrodynamique sont beaucoup plus faibles (en général inférieures à 1 pN) que celles produites dans le cas du peignage par le passage d'un ménisque air-eau ; le surétirement des molécules d'ADN, résultant de leur changement d'état $B \rightarrow S$ à force élevée ($\simeq 100$ pN) est donc évité. L'ajustement du flux appliqué pendant la phase d'étirement des molécules permet de choisir le taux d'étirement des molécules étirées. De plus, cette technique évite la formation de points d'ancrage multiples à la surface le long des molécules d'ADN. La plus grande partie de chaque molécule étirée est donc libre et (en moyenne) éloignée de la surface (par rapport au peignage). Cette technique permet d'étirer des molécules d'ADN même non entières, ce qui peut être à la fois un avantage car cela conduit à une densité élevée de molécules sur la surface, et un inconvénient car la longueur des molécules étirées diffère d'une molécule à l'autre.

b) Photoblanchiment des fluorophores

On appelle photoblanchiment d'un fluorophore l'arrêt brutal et irréversible

2.1. ETIREMENT DES MOLÉCULES D'ADN

de sa fluorescence sous excitation lumineuse. Ce phénomène est causé par une réaction photochimique du fluorophore dans son état excité avec l'oxygène présent en solution. Le photoblanchiment des fluorophores utilisés pour marquer l'ADN (YOYO-1, SYBR Gold) peut conduire à la photodestruction des molécules d'ADN. Dans le cas de l'ADN étiré, le photoblanchiment a un effet dramatique, conduisant à la cassure du double brin d'ADN et donc à la perte de la configuration en arche (figure 2.12). Le photoblanchiment peut être fortement réduit par l'ajout d'un agent réducteur comme le DTT (dithiothreitol) et surtout d'un mélange d'enzymes (glucose oxydase et catalase, agissant sur du glucose) éliminant l'oxygène présent en solution par la combinaison des deux réactions suivantes :



La succession de ces deux réactions consomme donc 1/2 molécule d'oxygène par cycle, l'espèce très réactive H_2O_2 produite dans la première réaction étant éliminée par la seconde. Le protocole d'utilisation de ces enzymes est donné dans la section 2.1.3.3.

2.1.3.2 Résultats expérimentaux

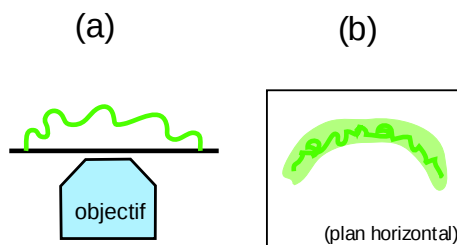


FIG. 2.10 – Les molécules d'ADN sont observées par le bas (a). L'image résultante (b) est une projection des molécules dans le plan de la surface (clair) ; la conformation réelle à basse échelle n'est pas accessible (foncé).

Les molécules d'ADN étirées préalablement marquées au YOYO-1 sont aisément détectables en excitant ce fluorophore avec une lampe à mercure et en collectant la fluorescence. Elles sont imagées avec une résolution temporelle pouvant atteindre 20 ms si l'on utilise une camera CCD intensifiée. Cela permet d'observer précisément le contour apparent des molécules. Cependant, la résolution spatiale est limitée par le critère de Rayleigh : l'image d'un fluorophore nanométrique donnée par le système optique a une extension de 300 nm environ dans les conditions expérimentales. Les images de deux fluorophores séparés par

CHAPITRE 2. ETIREMENT DE L'ADN ET DÉTECTION PAR DES NCS

des distances inférieures ne sont pas séparées. Il n'est donc pas possible de distinguer la conformation de l'ADN à des échelles nanométriques (figure 2.10).

La durée des films réalisées, limitée par la photodestruction des molécules d'ADN marquées, est de l'ordre de la minute. La densité des molécules d'ADN étirées sur la surface peut être contrôlée expérimentalement en ajustant la concentration d'ADN utilisée et sa durée d'interaction au-dessus de la surface. Les films réalisés démontrent clairement l'absence de point d'ancrage à la surface le long des molécules étirées (cf figure 2.12). Une fois le processus d'étirement à pH 5.5 terminé, le rinçage de la cavité à écoulement avec une solution de pH 7.0-8.0 n'affecte pas la configuration en arche des molécules étirées. A ces pH, le dépôt sur la surface de protéines chargées négativement (BSA, caséine) conduit en revanche au décrochage d'une partie des molécules étirées, très probablement en raison de la répulsion électrostatique ADN/surface qui en résulte. Le passage d'une bulle d'air dans la cavité (qui de toutes façons ne se produit pas si l'on travaille soigneusement) est encore plus catastrophique, le ménisque air/eau peignant irréversiblement les molécules étirées sur la surface. Comme le montre la

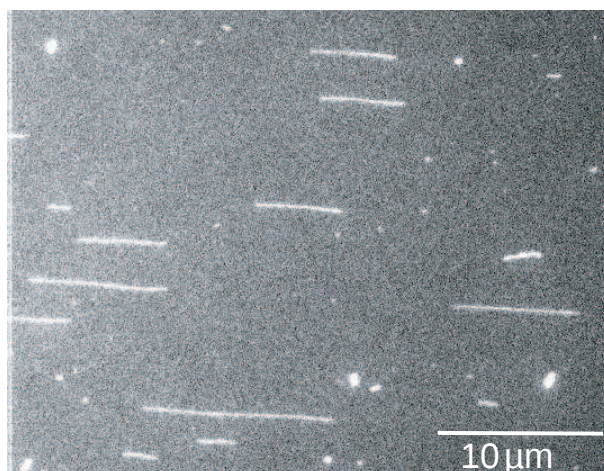


FIG. 2.11 – molécules d'ADN étirées (zone "large").

figure 2.11, il est possible d'obtenir des densités satisfaisantes de molécules étirées. Les deux points d'ancrage des molécules étirées sont fixes au cours du temps, mais leur contour fluctue (figure 2.12).

Les fluctuations longitudinales ne sont pas accessibles expérimentalement, en revanche les fluctuations transverses le sont et ont été analysées et modélisées, comme nous le verrons dans la partie suivante. Même si les meilleurs résultats ont été obtenus sur des surfaces de polystyrène, il est aussi possible d'étirer les molécules d'ADN sur d'autres surfaces hydrophobes telles que le PMMA ou le PDMS (matériau par ailleurs utilisé dans la conception de cavités à écoulement).

2.1. ETIREMENT DES MOLÉCULES D'ADN

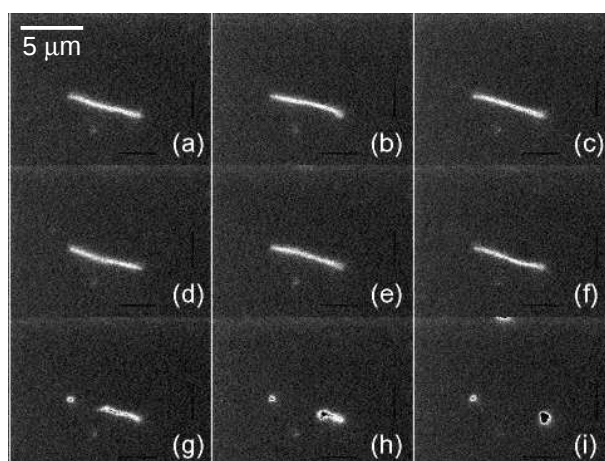


FIG. 2.12 – molécule d'ADN étirée : extraits d'un film expérimental (images toutes les 5 s) : la molécule d'ADN bouge sous l'effet des fluctuations thermiques puis casse sous l'effet du photoblanchiment. Après la cassure, les deux fragments se rétractent vers les extrémités de la molécule, ce qui démontre qu'elle n'était ancrée à la surface que par les extrémités.

2.1.3.3 Matériel et méthodes pour l'étirement

Le marquage de l'ADN et la fabrication de lames sont effectués en suivant les protocoles décrits dans la section "Peignage".

a) Fabrication des cavités à écoulement

Les cavités à écoulement utilisées sont construites par la superposition d'une lame porte-objet percée de deux trous de diamètre 0.8 mm prolongés par un joint en PDMS, servant d'entrée/sortie pour les liquides, d'un morceau de parafilm (d'épaisseur 137 μm) dans lequel est dessiné un canal rectangulaire d'environ 20 mm $\times$ 4 mm, et d'une lame rectangulaire (24 mm $\times$ 36 mm) recouverte de polystyrène (figure 2.13). Quelques secondes de chauffage à 70 °C permettent de souder définitivement ces morceaux.

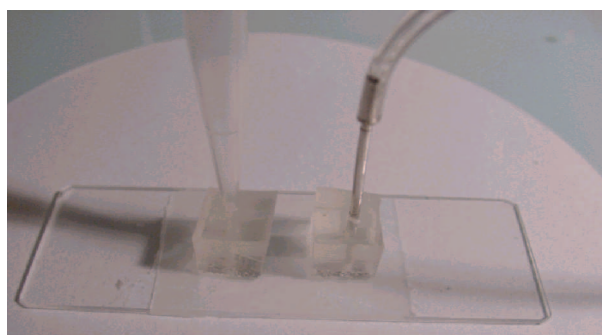


FIG. 2.13 – Cavités à écoulement.

CHAPITRE 2. ETIREMENT DE L'ADN ET DÉTECTION PAR DES NCS

Ce système permet à la fois de changer le tampon dans lequel baignent les molécules d'ADN à l'intérieur de la cavité, et de les étirer par l'application d'un flux hydrodynamique dont l'intensité peut être contrôlée par un dispositif tire-seringue placé en sortie.

Après utilisation la partie parafilm+lamelle polystyrène est jetée, mais la partie lame porte-objet+joints PDMS peut être réutilisée après nettoyage au nettoyeur à plasma, les constituants organiques restants étant alors éliminés.

b) Protocole d'étirement

10 à 100 ng de molécules d'ADN λ marquées au YOYO-1 sont introduites à l'intérieur de la cavité, dans une solution de MES 50 mM pH 5.5 EDTA 1 mM. Le flux hydrodynamique est coupé pendant quelques minutes pour permettre l'accrochage sur la surface d'un grand nombre de molécules d'ADN, puis il est relancé pour étirer les molécules. la force du flux utilisé est choisie en fonction du taux d'étirement désiré.

c) Protocole contre le photoblanchiment

Pour préparer 100 μ l de solution anti-photoblanchiment, on dilue dans une solution de PIPES 50 mM pH 6.8, DTT 10 mM, EDTA 1mM : 1 μ l de catalase C-100 (Sigma) 5 μ l de glucose oxydase G-2133 (Sigma) (alicots à 10 mg/ml dans le tampon PIPES 50 mM pH 6.8 EDTA 1 mM) 1 μ l d'une solution de glucose (à 50% dans de l'eau). Après quelques minutes, cette solution est introduite dans la cavité à écoulement contenant de l'ADN étiré.

L'action de la glucose oxydase a été testée sur de la résazurine (dont la couleur change si elle est ou non en présence d'oxygène). Dans nos conditions (glucose oxydase G-2133 diluée 20 fois utilisée à pH 6.8 agissant sur du glucose à 0.5 %), une solution contenant de la résazurine change de couleur instantanément, indiquant une élimination rapide de l'oxygène initialement présent dans la solution. Le pH utilisé (6.8) est important : la glucose oxydase y est très efficace, alors que cette efficacité chute rapidement au-delà de 7.0. L'action de la catalase a été vérifiée en en trempant un petit morceau de papier filtre, trempé dans une solution de catalase, dans une solution diluée d'eau oxygénée. La présence de bulles traduit alors une action efficace de la catalase. Ce test nous a conduits à utiliser la catalase C-100, la plus efficace des catalases testées de cette manière, qui reste qualitative mais est simple et rapide.

d) Observation des molécules d'ADN

Les molécules sont observées à travers un objectif à immersion à huile de grande efficacité de collection ($\times 60$, ouverture numérique 1.45), et imagées sur une caméra CCD intensifiée Pentamax (Roper Scientific). Une image est réalisée toutes les 20 ms.

e) Analyse des films expérimentaux

L'utilisateur détermine manuellement la position des extrémités de la molécule

2.2. ANALYSE DES FLUCTUATIONS TRANSVERSES

d'ADN à analyser sur la première image du film considéré. Le contour de la molécule est ensuite interpolé automatiquement sur chaque image du film, à l'aide d'un programme généreusement fourni par Vincent Croquette. Nous avons aussi utilisé un programme Matlab, écrit dans l'équipe, qui effectue des interpolations gaussiennes transversalement à la direction de la molécule. Les deux programmes fournissaient des interpolations quasi-identiques mais celui de Vincent Croquette est plus rapide.

2.1.4 Conclusion

La technique d'étirement présentée ci-dessus permet d'étirer en parallèle un grand nombre de molécules d'ADN sur une surface. Les interactions ADN/surface, et donc aussi ultérieurement les interactions protéines/surface, sont largement réduites par rapport au peignage. Le taux d'étirement des molécules est ajustable en fonction des besoins expérimentaux. La simplicité de la méthode et sa reproductibilité en font une alternative très attractive aux techniques utilisant le couplage de billes à l'ADN.

2.2 Analyse des fluctuations transverses d'une molécule d'ADN étirée

Pour le physicien des polymères, l'ADN est un objet d'étude idéal. Du point de vue théorique, c'est un polymère modèle, sa rigidité élevée rendant les interactions dites "de volume exclu" très faibles. Expérimentalement, il possède également des qualités sans équivalent. C'est une macromolécule pouvant atteindre de très grandes tailles dont on peut obtenir des échantillons rigoureusement mono-disperses, contrairement aux polymères synthétiques ; un arsenal très riche de techniques biochimiques permet de le modifier, de le fonctionnaliser, de l'accrocher à des surfaces... En outre, il est possible d'accéder au comportement individuel des polymères d'ADN, ce qui n'a jamais été réalisé avec des polymères synthétiques, en mesurant les forces qui s'exercent sur eux ou en les observant après couplage à des marqueurs fluorescents.

Les propriétés mécaniques de molécules individuelles d'ADN ont été caractérisées avec une grande précision [3, 52, 53]. Leur comportement dans un écoulement a été étudié par fluorescence ; S. Chu a notamment démontré qu'elles pouvaient avoir plusieurs conformations très différentes dans un même écoulement, ce que seule des expériences à l'échelle de la molécule individuelle pouvaient révéler [65, 66]. Plusieurs groupes se sont intéressés à la dynamique (étirement et relaxation) de molécules d'ADN attachées par une extrémité dans un écoulement [2, 56, 67, 68]. En revanche, avant nos expériences, une seule étude [69] avait été consacrée à la dynamique de molécules dont les deux extrémités sont fixes, qui constitue pourtant un problème de physique des polymères intéressant.

Outre son intérêt intrinsèque, la compréhension de la dynamique des molécules d'ADN étirées est indispensable en vue des expériences ultérieures d'interaction

avec les protéines. En effet, le mouvement, expérimentalement accessible, d'enzymes agissant sur des molécules étirées est une combinaison du mouvement des enzymes le long des molécules d'ADN et des fluctuations des molécules d'ADN étirées. La séparation de ces deux contributions ne peut être effectuée que si l'on a préalablement déterminé les caractéristiques des fluctuations des molécules d'ADN étirées.

2.2.1 Elasticité de l'ADN

L'élasticité d'une molécule d'ADN est essentiellement d'origine entropique : le nombre de configurations "en pelote" est très supérieur au nombre de configurations "dépliées". C'est pourquoi, en solution, les molécules sont sous forme de pelotes. L'application d'une force permet de déplier les molécules d'ADN. Grâce à des expériences d'étirement de molécules individuelles d'ADN, l'élasticité de l'ADN a pu être mesurée et décrite [3, 4, 50] avec une excellente précision.

La rigidité de courbure des polymères est décrite par leur longueur de persistance, qui représente la distance caractéristique sur laquelle est conservée leur orientation. Pour l'ADN cette longueur L_p vaut 50 nm environ (soit 150 paires de bases). L'ADN est donc essentiellement rigide sur des distances inférieures à L_p , et essentiellement flexible sur des distances supérieures. Pour décrire l'élasticité de l'ADN, le modèle le plus simple consiste à le décomposer en segments rigides indépendants de longueur de l'ordre de L_p (modèle de la "chaîne librement jointe"). Cependant, une meilleure description est obtenue grâce à un modèle continu : le "modèle du ver". Nous donnons ici les caractéristiques principales de ces deux modèles.

2.2.1.1 Modèle de la chaîne librement jointe

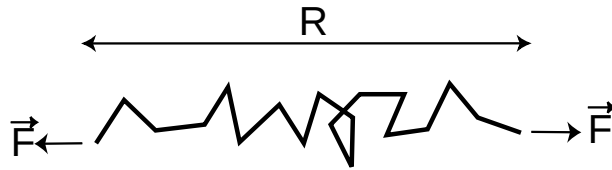


FIG. 2.14 – Modèle de la chaîne librement jointe ; chaque maillon a une longueur $b = 2L_p$ et une orientation indépendante de celle des maillons voisins.

Dans ce modèle, un polymère de longueur L est assimilé à une succession de N segments d'orientation indépendante, de longueur b telle que $L = Nb$ (figure 2.14). La longueur b est directement liée à la longueur de persistance de l'ADN par $b = 2L_p$. Ce modèle est purement entropique : en l'absence de force extérieure, toutes les configurations possèdent la même énergie et sont donc équiprobables. Lorsque la chaîne est placée sous tension, au moyen d'une force F appliquée en chacune de ses extrémités, chaque maillon acquiert une énergie $E_n = Fb \cos \theta_n$ fonction de son

2.2. ANALYSE DES FLUCTUATIONS TRANSVERSES

orientation. Les maillons s'orientent donc de manière privilégiée dans la direction de la force. Ce problème est formellement identique à celui du paramagnétisme de Langevin (alignement de dipôles dans un champ magnétique). La fonction de partition de ce modèle est aisément calculable du fait de l'indépendance des maillons. L'extension moyenne de la chaîne est alors donnée par la fonction de Langevin :

$$\frac{\langle R \rangle}{L} = \coth \left(\frac{Fb}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{Fb}. \quad (2.1)$$

Comme on le voit dans cette formule, le taux d'étirement ne dépend que du rapport des deux énergies en compétition : Fb (énergie due à la force F , qui tend à aligner les maillons dans sa direction) et $k_B T$ (énergie thermique, qui tend à leur faire perdre cette orientation privilégiée).

Malheureusement, le modèle simple de la "chaîne librement jointe" ne suffit pas à rendre compte correctement des courbes d'élasticité expérimentales de l'ADN [52]. L'une de ses faiblesses est notamment de ne pas prendre en compte l'élasticité du polymère sur des longueurs inférieures à b .

2.2.1.2 Modèle du ver

Contrairement au modèle précédent, les molécules d'ADN sont ici représentées par une chaîne continue de longueur donnée. Toutes les configurations sont autorisées, mais chaque configuration est caractérisée par une énergie de courbure :

$$E = k_B T \int_0^L \frac{L_p}{2} \left(\frac{\partial \mathbf{t}}{\partial s} \right)^2 ds, \quad (2.2)$$

où s et $\mathbf{t}$ représentent respectivement l'abscisse curviligne et le vecteur unitaire tangent le long de la chaîne. Contrairement au modèle de la chaîne librement jointe, les configurations où l'ADN est courbé sur de "petites" échelles (inférieures à L_p) sont donc prises en compte dans le calcul, même si elles sont peu probables du fait de leur coût énergétique.

En présence d'une force extérieure, l'énergie d'une configuration donnée devient

$$E = k_B T \int_0^L \left(\frac{L_p}{2} \left(\frac{\partial \mathbf{t}}{\partial s} \right)^2 - F \cos \theta(s) \right) ds, \quad (2.3)$$

L'angle θ représente l'orientation du fragment infinitésimal ds par rapport à la direction de la force F . Une élégante analogie avec le mouvement d'une charge sur une sphère en mécanique quantique permet de calculer numériquement la fonction de partition associée, et d'en déduire une formule d'interpolation, valable pour un fragment d'ADN de longueur $L \gg L_p$ donnant l'extension de la molécule d'ADN en fonction de la force exercée (figure 2.15, avec une précision arbitrairement grande [50, 70]. Bouchiat et al. se sont arrêtés à l'ordre 7, où l'écart entre la formule d'interpolation et la valeur exacte est inférieur à 0.01 % [50] :

$$F = \frac{k_B T}{L_p} \left(\frac{1}{(1 - z/L)^2} - \frac{1}{4} + \frac{z}{L} + \sum_{i=2}^7 a_i \left(\frac{z}{L} \right)^i \right), \quad (2.4)$$

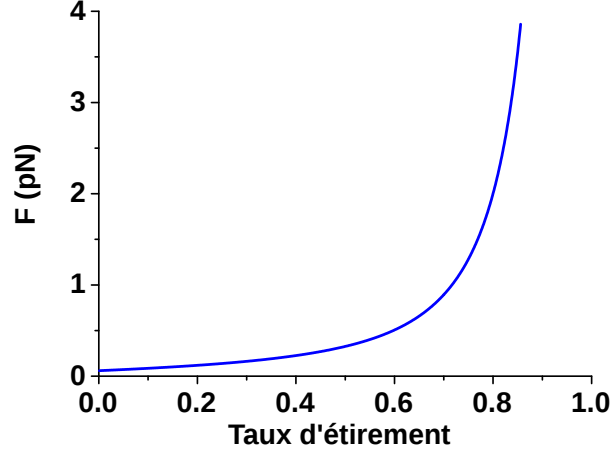


FIG. 2.15 – Courbe force-extension obtenue avec la formule d'interpolation de Bouchiat et al. [50].

avec $a_2=-0.5164228$, $a_3=-2.737418$, $a_4=16.07497$, $a_5=-38.87607$, $a_6=39.49944$, $a_7=-14.17718$.

Cette formule, calculée à partir du "modèle du ver", est cette fois en excellent accord avec les courbes force-extension expérimentales [50]. Dans la suite de ce travail, nous avons donc utilisé la formule 2.4, jusqu'à l'ordre 7, pour décrire l'élasticité de l'ADN.

2.2.2 Modèle utilisé pour l'analyse des fluctuations transverses

Pour analyser nos expériences, nous avons décomposé les molécules d'ADN en un ensemble de billes et de ressorts, une modélisation très classique en physique des polymères [56, 71–73].

2.2.2.1 Description



FIG. 2.16 – Modèle billes-ressorts.

Les molécules d'ADN (de longueur totale L) sont divisées en N sous-molécules de longueur de contour L_0 chacune (appelées "ressorts", en raison de leur élasticité) connectées entre elles par des "billes" mobiles au cours du temps

2.2. ANALYSE DES FLUCTUATIONS TRANSVERSES

(excepté les billes aux deux extrémités qui sont fixes) (figure 2.16). Physiquement, chaque bille est associée à un point donné de la molécule d'ADN.

Dans nos expériences, le mouvement est en fait confiné au demi-espace au-dessus de la surface. Dans un premier temps, nous n'avons pas pris en compte cette contrainte qui empêche le modèle de produire des résultats analytiques. Nous avons ensuite pris en compte l'effet de la surface en effectuant des simulations numériques.

2.2.2.2 Choix du nombre de billes

Le nombre de billes est *a priori* arbitraire, mais doit satisfaire à la double contrainte $L_p \ll L_0 \ll L$. En effet, nous souhaitons pouvoir décrire précisément le contour des molécules d'ADN, ce qui nécessite un nombre de billes $L/L_0 \gg 1$; en revanche, l'élasticité de chaque fragment n'est bien décrite par la formule d'interpolation ci-dessus que si $L_0 \gg L_p$.

Remarque : pour décrire le mouvement d'un point donné de la molécule d'ADN plutôt que l'ensemble de son contour, il suffit en revanche d'un modèle à 3 billes (dont deux fixes aux extrémités). Ce modèle sera décrit dans le chapitre 3.

2.2.2.3 Dynamique

Le mouvement de chaque bille est régi par une équation de Langevin :

$$\zeta \mathbf{v}_n = \mathbf{T}_{n-1 \rightarrow n} + \mathbf{T}_{n+1 \rightarrow n} + \mathbf{L}_n, \quad (2.5)$$

dans laquelle le terme d'inertie $m \mathbf{a}_n$ n'apparaît pas car il est négligeable devant les autres termes. Cette équation prend en compte l'interaction entre billes successives due à l'élasticité de la chaîne d'ADN et l'interaction des billes avec le solvant. Cette interaction est décrite par un mouvement brownien, caractérisé par une composante d'agitation et une composante de dissipation. La force élastique $\mathbf{T}_{n+1 \rightarrow n}$ est exercée par la (n+1)ième bille sur la nème *via* le ressort qui les sépare. Son module est donné par la formule (2.4). Par commodité, nous l'écrivons sous la forme $T_{n+1 \rightarrow n} = k r_n f(r_n/L_0)$, avec $k = 3k_B T / 2L_p L_0$. La fonction f , qui ne dépend que du taux d'étirement des molécules, traduit la non-linéarité de l'élasticité de l'ADN.

Le solvant exerce sur les billes une force de friction $\zeta \mathbf{v}_n$, où ζ est le coefficient de friction caractérisant la sous-molécule, et une force d'agitation $\mathbf{L}_n$ reliée à la précédente par le théorème de fluctuation-dissipation : $\langle \mathbf{L}_{n,i}(t) \mathbf{L}_{n',j}(t') \rangle = 2\zeta k_B T \delta_{ij} \delta_{nn'} \delta(t' - t)$ [72], i et j désignant deux composantes de $\mathbf{L}_n$. Le coefficient ζ , qui caractérise l'interaction polymère-solvant, dépend de manière complexe de la longueur et du taux d'étirement du polymère. Le taux d'étirement des molécules d'ADN étant élevé dans ces expériences, nous avons utilisé la valeur de ζ correspondant à la friction transverse d'un tube de longueur L_0 et de diamètre d , où d est le diamètre de l'ADN, soit environ 2 nm [72] : $\zeta = 4\pi\eta L_0 / \ln(L_0/D)$. Le choix de cette expression est discutée dans le paragraphe suivant. Cette des-

cription de la dynamique du système conduit à un système d'équations couplées, non-linéaires dans le cas général.

2.2.2.4 Discussion : pertinence de la description hydrodynamique

Nous discutons dans ce paragraphe du choix de l'expression du coefficient de friction ζ .

Cette expression correspond au coefficient ζ associé à une molécule étirée à 100%. Cette approximation est justifiée car la valeur de ζ dépend peu de son taux d'étirement, elle est même du même ordre de grandeur pour des molécules d'ADN en pelote ou complètement étirées [72]. En outre, dans nos expériences, le taux d'étirement des molécules d'ADN est élevé et varie peu. Néanmoins, notre description ne prend pas en compte la proximité de la surface, susceptible notamment d'affecter localement la viscosité locale du fluide. Elle ne prend pas non plus en compte le couplage hydrodynamique entre billes. En effet, le solvant exerce des forces de fluctuation-dissipation sur chaque bille, dont le mouvement génère en retour des flux dans le solvant. En toute rigueur, il existe donc un couplage entre toutes les billes par l'intermédiaire du solvant. Ce couplage peut être considéré au prix d'une formulation matricielle plus lourde du problème (modélisation de Zimm [71, 72]), qui n'est pas forcément nécessaire ici. En effet, notre modèle tient compte de ces interactions à l'échelle de L_0 , à travers la valeur de ζ utilisée. Seules les interactions à plus grande distance sont négligées ; cette approximation est justifiée dans la mesure où $L_0 \gg L_p$.

Notre description des interactions hydrodynamiques polymère-solvant est donc simplifiée. Comme nous le verrons plus loin, elle semble néanmoins valide dans la mesure où l'on introduit une "viscosité effective" tenant compte de l'effet de la surface pour les analyses nécessitant une valeur numérique de ζ .

2.2.2.5 Résultats du modèle pour une élasticité linéaire des ressorts

L'équation (2.5) possède des solutions analytiques si les ressorts sont linéaires. En effet, dans ce cas $\mathbf{T}_{n+1 \rightarrow n} = -k(\mathbf{x}_{n+1} - \mathbf{x}_n)$, où x_n est le vecteur position de la nième bille, et si l'on décompose le mouvement transverse en modes de Fourier $NX_p(t) = \sum_{n=1}^N x_n(t) \sin np\pi/N$, chaque mode X_p évolue de manière indépendante, suivant l'équation [72] :

$$\zeta_p \frac{\partial X_p}{\partial t} = -k_p X_p + L_p, \quad (2.6)$$

où ζ_p , k_p et L_p sont reliés à ζ , k et L par : $\zeta_p = 2N\zeta$, $k_p = 2\pi^2 k p^2 / N$ et $\langle f_{p\alpha}(t) f_{p'\beta}(t') \rangle = 2\delta_{pq} \delta_{\alpha\beta} \zeta_p k_B T \delta(t - t')$. Chaque mode est alors caractérisé par une fonction d'autocorrélation exponentielle :

$$\langle X_p(t) X_p(0) \rangle = \langle X_p^2 \rangle \exp(-t/\tau_p) . \quad (2.7)$$

2.2. ANALYSE DES FLUCTUATIONS TRANSVERSES

Les amplitudes quadratiques et les temps de corrélation des fluctuations sont donnés par :

$$\langle X_p^2 \rangle = \frac{LL_p}{2\pi^2 p^2} \quad ; \quad \tau_p = \frac{8\eta L_p L^2}{3\pi \ln(L_0/d) k_B T p^2}. \quad (2.8)$$

Le détail des calculs conduisant à ces résultats est présenté dans l'annexe insérée à la fin de cette partie. On peut remarquer que le nombre de billes utilisées dans le modèle n'a aucune incidence sur les amplitudes. En revanche, les temps de corrélation sont légèrement affectés par le nombre de billes *via* le facteur $\ln(L_0/d)$. Ceci résulte de la prise en compte des interactions hydrodynamiques entre billes sur une distance L_0 qui varie selon le nombre de billes utilisées (cf paragraphe 2.2.2.4). Néanmoins, les temps de corrélation variant comme $\ln(L_0/d)$, l'effet de ce paramètre est peu critique. Notons aussi que les caractéristiques du solvant (viscosité, interactions hydrodynamiques avec les billes) influencent la cinétique du système, mais sont sans effet sur l'amplitude moyenne des fluctuations, qui ne dépend que des propriétés physiques du polymère (longueur de persistance, longueur totale et taux d'étirement).

2.2.2.6 Analyse dans le cas de l'élasticité réelle (non linéaire) de l'ADN

Les résultats précédents ne sont pas directement applicables pour l'ADN, dont l'élasticité, décrite par le "modèle du ver" est non-linéaire. On peut cependant s'y ramener, à condition que le taux d'étirement des molécules d'ADN considérées soit suffisamment élevé. Dans ce cas en effet, le mouvement de chaque bille autour de sa position d'équilibre a lieu sur des distances très petites devant la distance inter-billes (figure 2.17). Par conséquent, le taux d'étirement de chaque segment varie peu au cours du temps, de sorte que $f(r_n/L_0) \simeq f(r/L_0) \simeq f(R/L)$. Alors $T_{n-1 \rightarrow n} \simeq kf(R/L)r_n$. Cette expression de $T_{n-1 \rightarrow n}$ permet d'utiliser les résultats du paragraphe précédent : dans cette approximation la force de rappel est linéaire, avec une raideur $kf(R/L)$ dépendant du taux d'étirement global des molécules. Chaque mode de Fourier a donc une fonction d'autocorrélation exponentielle avec :

$$\langle X_p^2 \rangle = \frac{LL_p}{2\pi^2 p^2 f(R/L)} \quad ; \quad \tau_p = \frac{8\eta L_p L^2}{3\pi \ln(L_0/d) k_B T p^2 f(R/L)}. \quad (2.9)$$

2.2.2.7 Simulations numériques

Des simulations numériques ont été menées afin de tester la validité de l'approximation ci-dessus ainsi que d'éventuels effets liés à la présence d'une surface dans nos expériences. Ces simulations ont été réalisées en C++, utilisant 10 billes dont la dynamique a été étudiée avec un incrément de temps de 0.1 ms.

- Validité de l'approximation effectuée : pour des taux d'étirement ≥ 0.7 (qui est le taux d'étirement expérimental moyen estimé), nous observons un accord très bon (de l'ordre du %) entre les simulations et les résultats analytiques obtenus dans le cadre d'une approximation linéaire. Dans la gamme

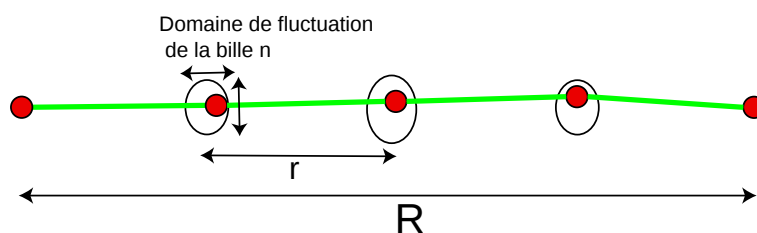


FIG. 2.17 – A fort taux d'étirement, les longueurs sur lesquelles fluctue la position des billes sont petites comparées aux distances inter-billes.

0.5-0.7 apparaissent de légères différences (inférieures à 10 %), dues au fait que les billes ont un mouvement d'amplitude plus grande, qui cesse d'être complètement négligeable devant les distances inter-billes; les simulations induisent donc des corrections vis-à-vis des résultats analytiques obtenus dans cette approximation.

- Effet de la surface : dans ces simulations, le mouvement des billes est limité au demi-espace au-dessus de la surface; suite aux collisions avec la surface les billes rebondissent de manière parfaitement élastique. Les fluctuations transverses obtenues avec cette contrainte ne diffèrent pas (ou trop peu pour que la différence puisse être décelée dans ces simulations) de celles résultant d'un mouvement non contraint des billes dans l'espace complet, résultat qui ne semblait pas intuitif.

2.2.3 Résultats expérimentaux

2.2.3.1 Analyse des films expérimentaux

Les statistiques présentées ici ont été obtenues par l'analyse des fluctuations de 45 molécules étirées. Les films analysés ont une durée typique de quelques dizaines de secondes (avec 50 images par seconde). Pour chacun de ces films, la longueur R séparant les extrémités de la molécule d'ADN a été mesurée sur la première image du film. Sur chaque image, le contour des molécules d'ADN a été interpolé à l'aide du programme fourni par Vincent Croquette. Ce contour a ensuite été décomposé en modes de Fourier.

Les fonctions d'autocorrélation des 3 premiers modes ont été évaluées pour chaque film. Ces fonctions d'autocorrélation ont été interpolées avec des exponentielles, dont on peut déduire amplitudes quadratiques et temps de corrélation (figure 2.18). Comme l'illustre la figure 2.18, cette interpolation est généralement de bonne qualité.

2.2.3.2 Etirement de l'ADN dans le flux hydrodynamique

Le taux d'étirement des molécules d'ADN est lié à la force du flux appliqué pendant le processus d'étirement. La dynamique de polymères placés dans des

2.2. ANALYSE DES FLUCTUATIONS TRANSVERSES

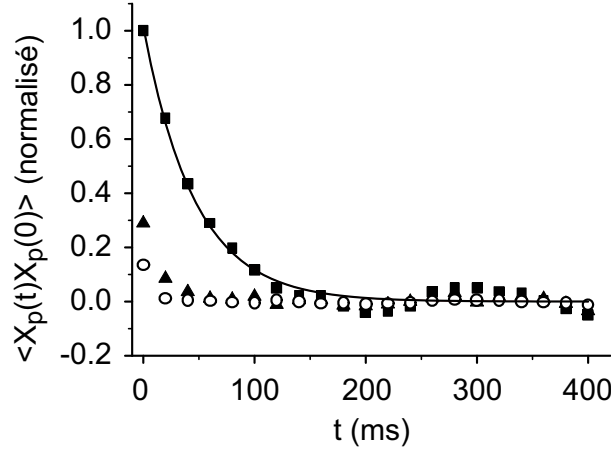


FIG. 2.18 – Fonctions d'autocorrélation obtenues à partir des données expérimentales pour les modes $p=1$ (■), $p=2$ (▲) and $p=3$ (○). Courbe : interpolation exponentielle pour $p=1$.

écoulements a fait l'objet de nombreuses études expérimentales, dans lesquelles des molécules d'ADN sont accrochées par une extrémité à une surface [2, 56] et théoriques [74–76]. Ces études ont notamment montré que le comportement d'un polymère dans un écoulement de cisaillement est déterminé par le nombre de Weissenberg W_i , un paramètre sans dimension qui prend en compte à la fois les caractéristiques du flux, qui tend à étirer le polymère et les propriétés élastiques du polymère utilisé, qui tendent à le ramener vers un état en pelote. Dans nos expériences, ce paramètre peut être estimé entre 20 et 50, le taux d'étirement moyen attendu $\langle R \rangle / L$ étant alors dans la gamme 0.5-0.7 [68]. La distance moyenne séparant les extrémités des molécules étirées est dans nos expériences $\langle R \rangle = 7.7 \pm 2.3 \mu\text{m}$. Si l'on suppose que la longueur des molécules d'ADN est $18 \mu\text{m}$ (longueur d'une molécule entière d'ADN λ marqué avec 1 molécule de YOYO-1 toutes les 10 paires de bases), le taux d'étirement moyen résultant est $\langle R \rangle / L = 0.43 \pm 0.13$. La divergence avec la valeur attendue résulte du fait que les molécules observées ne sont pas toutes entières, comme nous le verrons un peu plus loin.

2.2.3.3 Caractéristiques moyennes des fluctuations

En moyennant sur l'ensemble des films, on obtient les résultats suivants pour l'amplitude et les temps de corrélation des trois premiers modes :

p	1	2	3
$X_p^2 (\times 10^{-2} \mu\text{m}^2)$	1.02 ± 0.46	0.28 ± 0.18	0.11 ± 0.10
τ_p (ms)	101 ± 54	37 ± 20	ND

Notre résolution temporelle de 20 ms ne permet pas d'évaluer τ_3 . Les distributions larges de ces valeurs (figure 2.19) ne peuvent être expliquées par les variations, de

CHAPITRE 2. ETIREMENT DE L'ADN ET DÉTECTION PAR DES NCS

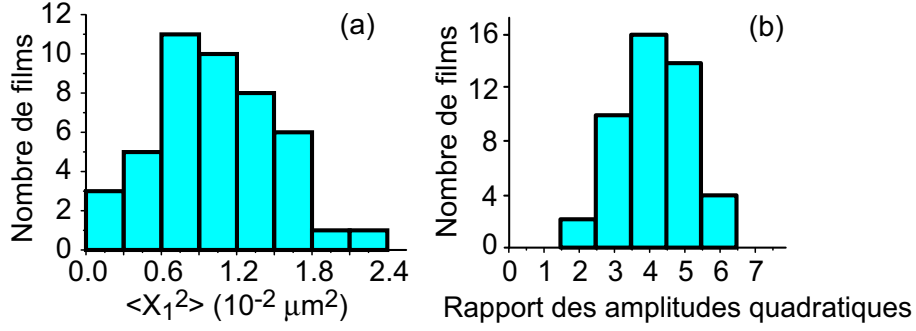


FIG. 2.19 – (a) Distribution des amplitudes quadratiques pour le mode $p=1$ et (b) distribution du rapport des amplitudes quadratiques $\langle X_1^2 \rangle / \langle X_2^2 \rangle$.

l'ordre de 20%, du taux d'étirement des molécules. De plus, ces valeurs moyennes ne sont pas cohérentes avec les formules (2.9) appliquées à des molécules d'ADN entières. En effet, avec $R=7.7 \mu\text{m}$ et $L=18 \mu\text{m}$, $f(R/L) \simeq 1.5$ et le modèle conduit à $\langle X_1^2 \rangle = 2 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2$ et $\tau_1=330 \text{ ms}$, valeurs très supérieures aux valeurs expérimentales moyennes.

En fait, une telle analyse ne prend pas en compte les cassures que peuvent subir les molécules d'ADN pendant le processus d'étirement. Ces cassures réduisent leur longueur et affectent donc les caractéristiques de leurs fluctuations transverses. Expérimentalement, elles peuvent être causées par la photodestruction des fluorophores sur l'ADN, ou par l'étirement d'un échantillon de molécules d'ADN présentant des cassures simple brin (comme c'est probablement le cas pour l'ADN commercial utilisé), donc beaucoup plus fragiles.

Le rapport des amplitudes quadratiques (des temps de corrélation) de deux modes de Fourier différents (qui d'après notre modèle ne dépend ni de la longueur, ni du taux d'étirement des molécules considérées, et doit donc être le même pour chaque molécule) est lui en excellent accord avec le modèle. En effet, une moyenne sur l'ensemble des films expérimentaux conduit à $\langle X_1^2 \rangle / \langle X_2^2 \rangle = 4.2 \pm 1.0$ et $\langle X_1^2 \rangle / \langle X_3^2 \rangle = 10.9 \pm 3.4$, en bon accord avec les prédictions du modèle ($\langle X_1^2 \rangle / \langle X_2^2 \rangle = 4$ et $\langle X_1^2 \rangle / \langle X_3^2 \rangle = 9$). On obtient également $\tau_1/\tau_2 = 2.9 \pm 0.9$; l'écart plus grand par rapport à la valeur théorique de 4 est due à la plus grande imprécision sur la valeur des temps de corrélation τ_p , déterminés à partir des interpolations exponentielles des courbes expérimentales. Ainsi, les valeurs expérimentales ne sont pas *a priori* incompatibles avec le modèle, qui rend très bien compte du rapport des amplitudes des différents modes, mais imposent de prendre en compte la variation possible de la taille des molécules d'ADN d'un film à l'autre. Les paragraphes suivants montrent comment la taille des molécules peut être estimée à partir de l'amplitude des fluctuations, et comment la validité du modèle peut être ensuite vérifiée par l'analyse des temps de corrélation expérimentaux.

2.2. ANALYSE DES FLUCTUATIONS TRANSVERSES

2.2.3.4 Estimation de la longueur des molécules d'ADN à partir de l'amplitude des fluctuations transverses

La longueur réelle des molécules d'ADN peut être estimée à partir de l'amplitude du premier mode de Fourier, via la formule $L/f(R/L) = 3\pi^2 \langle X_1^2 \rangle / L_p$. En effet, le terme de droite, ainsi que R sont des données expérimentales. La fonction $L/f(R/L)$ étant une fonction strictement croissante de L (à R fixé), on peut donc déduire de cette relation une valeur L_e estimée de L . Les valeurs de L_e obtenues sont cohérentes avec celles de fragments de molécules d'ADN λ : elles sont toutes (sauf une légèrement supérieure) inférieures à $18 \mu\text{m}$, la longueur d'une molécule d'ADN λ entière teintée au YOYO-1. Il est alors possible de réestimer le

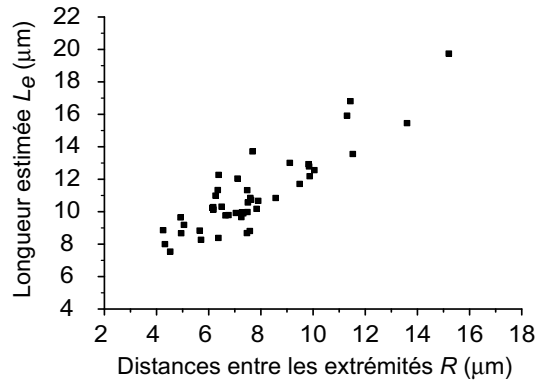


FIG. 2.20 – Estimation des longueurs des molécules d'ADN à partir des mesures expérimentales de R et $\langle X_p^2 \rangle$.

taux d'étirement des molécules d'ADN, en utilisant pour chaque film la longueur L_e plutôt que $L = 18 \mu\text{m}$. Comme le montre la figure 2.20, L_e varie en fonction de R d'une manière approximativement linéaire. Le taux d'étirement moyen est $R/L_e = 0.69 \pm 0.10$. Ce taux d'étirement est à la fois en meilleur accord avec les prédictions résultant de l'estimation du nombre de Weissenberg et de plus faible dispersion que l'estimation précédente $R/L = 0.43 \pm 0.13$.

2.2.3.5 Effet du taux d'étirement sur les temps de corrélation

La mesure expérimentale des amplitudes des fluctuations a été utilisée pour déterminer la longueur réelle des molécules d'ADN. La mesure des temps de corrélation peut à présent permettre de vérifier le bon accord entre modèle et expériences.

Plus précisément, le modèle prédit pour τ_1/L^2 une décroissance en $1/f(R/L)$. Les valeurs expérimentales sont très bien décrites par cette loi, à condition de modifier d'un même facteur 1.6 le coefficient hydrodynamique utilisé dans le modèle et les simulations (figure 2.21). Comme on l'a vu précédemment, ce facteur corrige une modélisation hydrodynamique simplifiée, qui ne prend notamment pas

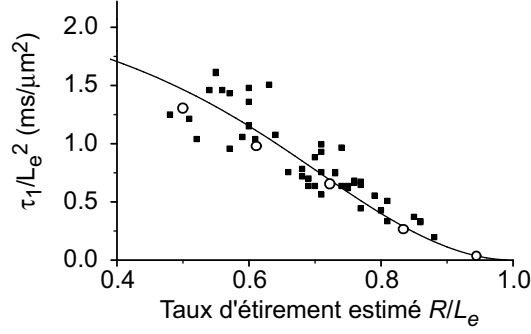


FIG. 2.21 – ■ : τ_1/L_e^2 en fonction de R/L_e . La ligne continue est la dépendance prédite par le modèle billes-ressorts. ○ : simulations numériques. Les résultats du modèle et de la simulation ont été multipliés par un même facteur 1.6.

en compte la modification de la viscosité du solvant au voisinage de la surface de verre.

2.2.4 Conclusion

Les résultats expérimentaux obtenus sont en excellent accord avec le modèle billes-ressorts utilisé. L'étude de l'amplitude des fluctuations transverses permet une mesure indirecte de la taille des molécules d'ADN. L'analyse du temps d'autocorrélation du premier mode met en lumière l'effet des non-linéarités de l'ADN, conformément au modèle bille-ressort utilisé. Nos résultats sont en accord avec ceux du groupe de S. Chu, qui s'était intéressé aux fluctuations transverses de molécules d'ADN λ dont chaque extrémité avait été fixée dans un piège optique, à condition de prendre en compte un facteur d'environ 20 dans les viscosités, les expériences de S. Chu ayant été réalisées dans des solutions très visqueuses contenant 70 % de glycérol [69].

Tous ces résultats seront précieux lors de l'analyse du mouvement d'enzymes sur l'ADN étiré.

2.3 Détection de molécules d'ADN peigné à l'aide de nanocristaux

Le but de ce projet, réalisé en collaboration avec Bénédicte Géron-Landre, Christophe Escudé (MNHN, Paris) et Stéphane Bonneau (CEREMADE, Paris Dauphine) consistait à détecter des molécules d'ADN peignées sans utiliser de fluorophores organiques, en attachant des nanocristaux à leurs extrémités. Ce mode de détection présente de nombreux avantages. D'une part les molécules d'ADN peuvent ainsi être observées quasi indéfiniment, les nanocristaux n'étant pas sujets au photoblanchiment rapide qui affecte les fluorophores organiques.

2.3. DÉTECTION DE MOLÉCULES D'ADN PEIGNÉ À L'AIDE DE NANOCRISTAUX

D'autre part, l'absence de fluorophores organiques le long des molécules d'ADN ne risque pas de gêner l'action ultérieure de protéines.

Le greffage d'oligonucléotides à la surface de nanocristaux est une technique expérimentale désormais standard [77]. En revanche, à notre connaissance, la détection de longues molécules d'ADN (plusieurs kilobases) avec des nanocristaux n'avait jamais été réalisée auparavant. Au cours de ce projet, nous avons développé une méthode expérimentale permettant de détecter les extrémités de molécules d'ADN peignées à l'aide de nanocristaux. Nous avons ensuite mené une analyse statistique détaillée des résultats expérimentaux afin d'évaluer l'efficacité de cette stratégie de détection.

2.3.1 Fluorophores organiques vs nanocristaux

2.3.1.1 Inconvénients des fluorophores organiques

Les molécules d'ADN sont habituellement détectées par le biais de fluorophores organiques : intercalants (YOYO-1) ou molécules s'insérant dans le petit sillon (SYBR Gold). L'insertion de ces fluorophores sur toute la longueur des molécules d'ADN présente plusieurs inconvénients :

- Leur photoblanchiment limite la durée d'observation des molécules d'ADN et peut conduire à leur photodestruction. La durée d'observation des molécules d'ADN peut être largement augmentée en éliminant l'oxygène présent en solution (cf. 2.1.3.1). Néanmoins, la durée maximale d'observation reste limitée à quelques minutes. De plus, ce système ne peut pas agir efficacement dans toutes les conditions expérimentales, son efficacité est notamment très réduite à des $\text{pH} \geq 8$.
- La liaison de ces fluorophores à l'ADN, d'origine électrostatique, est affectée par la composition de la solution dans laquelle ils baignent. Nous avons notamment observé que le YOYO-1 et le SYBR Gold ne teignent plus l'ADN pour des concentrations de Mg^{2+} excédant 5 mM et pour des concentrations supérieures à 200 mM en NaCl. Or Mg^{2+} et NaCl sont indispensables à l'action de très nombreuses enzymes et à leur étude *in vitro*.
- Les molécules d'ADN couplées à des fluorophores subissent des modifications structurales, électrostatiques et mécaniques. L'interaction ADN-protéine dans ces nouvelles conditions peut alors être modifiée, voire empêchée [78, 79].

Dans le chapitre suivant, nous verrons que nous sommes néanmoins parvenus à observer l'interaction d'EcoRV avec un ADN marqué au SYBR Gold. Nous nous sommes placés dans des conditions particulières pour cela. En effet, nous n'avons pas eu besoin d'observer l'ADN de manière prolongée, et nous avons utilisé un fluorophore (le SYBR Gold) qui n'empêche pas l'action d'EcoRV, dans des conditions salines compatibles avec la visualisation de l'ADN. Néanmoins, l'observation des interactions ADN-protéines pourrait devenir très problématique avec d'autres protéines ou avec des solutions utilisées différentes, notamment en présence d'ions Mg^{2+} à des concentrations proches des concentrations cellulaires, de l'ordre de

CHAPITRE 2. ETIREMENT DE L'ADN ET DÉTECTION PAR DES NCS

10 mM. C'est pourquoi nous avons développé une méthode de détection des molécules d'ADN qui permet de s'affranchir des problèmes répertoriés ci-dessus. Pour cela, nous avons synthétisé des molécules d'ADN modifiées chimiquement à leurs extrémités. Après peignage, ces extrémités peuvent être détectées à l'aide de nanocristaux. Les couleurs des nanocristaux utilisés peuvent être différentes, de manière à déterminer l'orientation des molécules.

2.3.1.2 Les nanocristaux : des fluorophores aux propriétés optiques remarquables

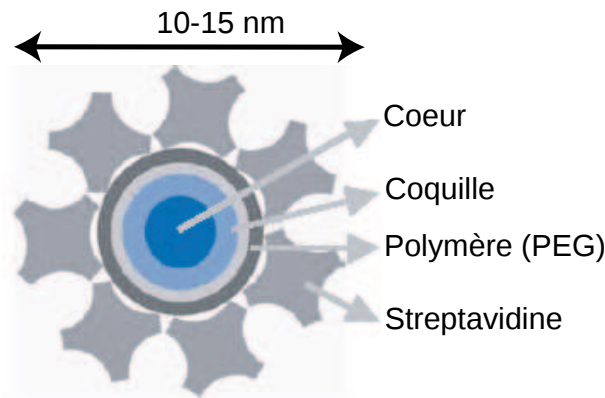


FIG. 2.22 – Structure des nanocristaux commerciaux.

Les nanocristaux semiconducteurs fluorescents (CdS, CdSe...) sont des objets cristallins nanométriques aux propriétés optiques remarquables. En effet, ils sont beaucoup plus lumineux que les fluorophores organiques traditionnels du fait de leur absorbance élevée. Ces fluorophores ont un spectre d'excitation de solide, adsorbant en dessous d'une longueur d'onde et un spectre d'émission étroit (figure 2.23). Ils sont donc adaptés à une imagerie multi-couleurs.

Les nanocristaux sont très peu affectés par le phénomène de photoblanchiment ; leur fluorescence présente en revanche une succession aléatoire d'états allumés et éteints (phénomène de "clignotement") [80–82]. Le suivi des nanocristaux peut donc être mené sur des durées beaucoup plus longues qu'avec les fluorophores organiques, des algorithmes de suivi de nanocristaux individuels permettant de prendre en compte leur "clignotement" [83].

La solubilisation délicate des nanocristaux en solution aqueuse a longtemps limité leur utilisation en biologie. En effet, au cours de leur synthèse, leur cœur est encapsulé dans une coquille hydrophobe (figure 2.22). Les nanocristaux ont donc tendance à s'agréger dans l'eau. Ce problème a été récemment résolu en modifiant chimiquement leur surface, par exemple par le greffage d'une couche de polymères amphiphiles. En outre, des nanocristaux solubles conjugués à des molécules biologiques (streptavidine, biotine, anticorps...) (figure 2.22) sont désormais commerciaux (Quantum Dots Corporation) dans une large gamme de longueurs

2.3. DÉTECTION DE MOLÉCULES D'ADN PEIGNÉ À L'AIDE DE NANOCRISTAUX

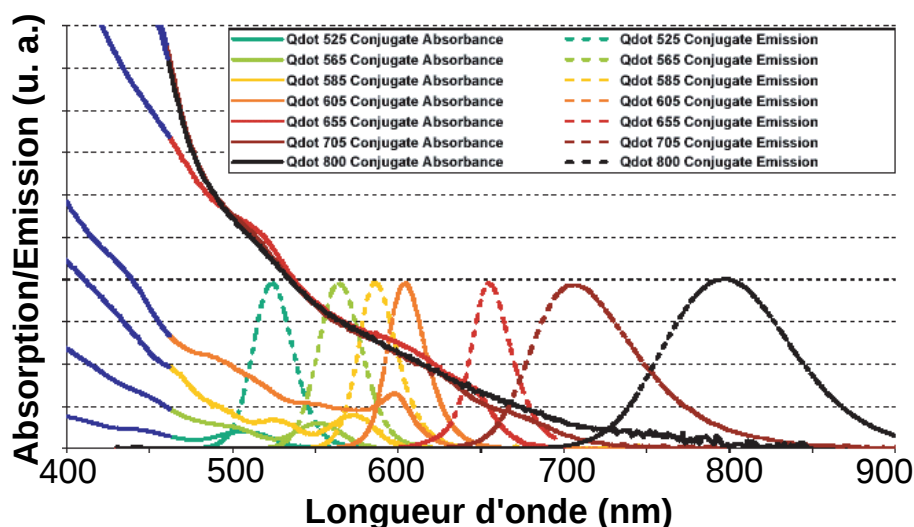


FIG. 2.23 – Spectres d'absorption et d'émission des nanocristaux-streptavidine commerciaux.

d'onde (figure 2.23). De tels nanocristaux peuvent être accrochés à des molécules biologiques, dont on peut alors enregistrer la trajectoire puis étudier la dynamique. La diffusion de récepteurs de la glycine couplés à des nanocristaux dans des neurones vivants a par exemple pu être observée de cette façon [84].

2.3.2 Mise en oeuvre expérimentale

2.3.2.1 Préparation d'ADN avec extrémités biotine et/ou digoxigénine (B. Géron-Landre)

La détection de molécules d'ADN par des nanocristaux nécessite la conception et la fabrication de substrats d'ADN dont les extrémités ont une affinité forte pour les nanocristaux. Nous avons donc ligué des fragments d'ADN (d'environ 500 kilobases) contenant des nucléotides modifiés (avec biotine ou digoxigénine) aux extrémités des molécules d'ADN d'intérêt. Après peignage, ces fragments peuvent ensuite être révélés grâce à des NCs-streptavidine ou des NCs-anticorps (figure 2.24).

Ce protocole permet de contrôler la taille des fragments ligués, et offre également la possibilité d'incorporer un nombre élevé et connu de nucléotides modifiés. Il a donc été préféré à d'autres protocoles plus courts, comme la polymérisation directe, par une polymérase de Klenow, de quelques nucléotides modifiés aux extrémités des molécules d'ADN, qui ne présentaient pas ces avantages.

La digestion du plasmide d'intérêt est réalisée par BsmBI, une enzyme de restriction de type IIS qui coupe l'ADN en dehors de son site de reconnaissance. Le fragment linéaire d'ADN obtenu possède deux extrémités cohésives différentes et non palindromiques, ce qui permet une discrimination des deux extrémités de la molécule, et évite toute religation ultérieure entre molécules

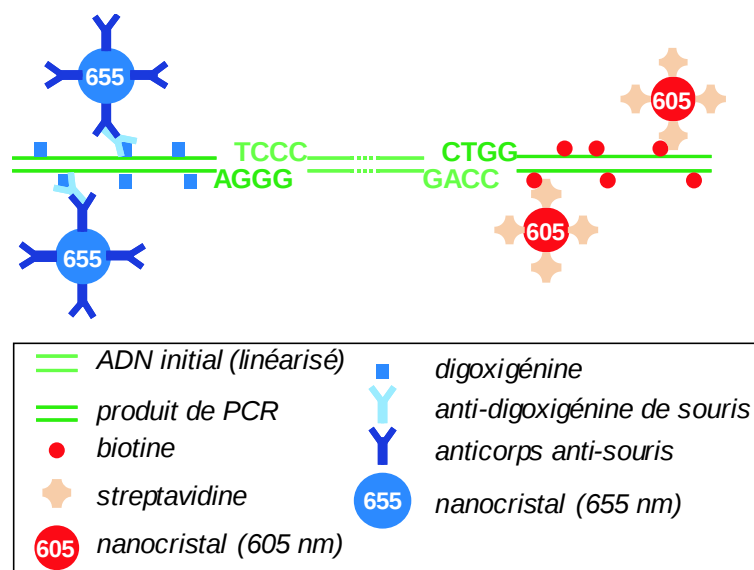


FIG. 2.24 – La molécule d'ADN d'intérêt est liguée à deux courts fragments de PCR modifiés avec des biotines ou des digoxigénines. Les extrémités biotine sont détectées avec des nanocristaux-streptavidine ; les extrémités digoxigénine sont détectées par anti-digoxigénine de souris puis nanocristaux-anticorps anti-souris.

linéarisées. Le protocole utilisé est détaillé dans la partie 2.3.2.3. Les fragments biotine/digoxigénine sont produits par PCR. Un choix judicieux de la séquence des amorces utilisées permet de générer des extrémités complémentaires de l'une ou l'autre des extrémités du plasmide linéarisé après digestion par BsaI (une autre enzyme de classe IIS). Il est alors possible de liguer sélectivement les molécules linéarisées à un ou deux fragments de PCR avec une efficacité très élevée (environ 95 %).

2.3.2.2 Attachement des NCs sur les molécules d'ADN peignées

a) Choix de l'attachement des NCs sur les molécules peignées plutôt qu'en solution

Deux voies s'offraient à nous au début de ce projet : attacher des NCs aux extrémités de l'ADN puis peigner ces molécules (1), ou procéder dans l'ordre inverse et attacher des molécules d'ADN sur des molécules déjà peignées (2). La réalisation de (1) nous a semblé présenter des obstacles beaucoup plus grands (schématisés sur la figure 2.25) que celle de (2). En effet, un nanocristal étant susceptible de se lier avec plusieurs groupements biotine (pouvant appartenir à des extrémités de molécules d'ADN différentes), l'expérience doit être conduite en large excès de NCs pour éviter le cross-linking des molécules d'ADN, expérimentalement désastreux, ce qui pose le difficile problème de leur purification ultérieure. De plus, il est expérimentalement difficile de trouver des conditions dans lesquelles on puisse peigner les molécules d'ADN tout en évitant une interaction forte des

2.3. DÉTECTION DE MOLÉCULES D'ADN PEIGNÉ À L'AIDE DE NANOCRISTAUX

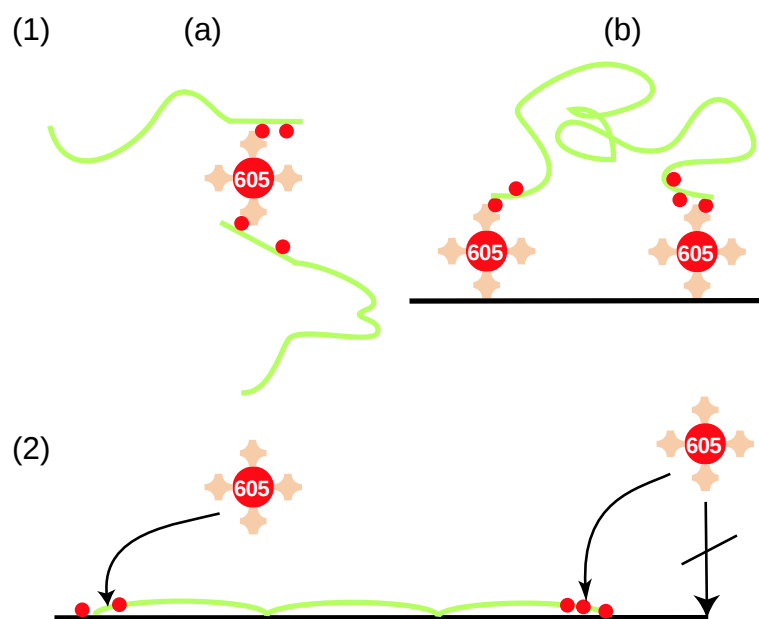


FIG. 2.25 – (1)(a) Attacher en solution les NCs aux molécules d'ADN présente un risque de pontage des molécules d'ADN ; (b) de plus, l'adsorption des NCs à la surface risque de perturber le peignage des molécules d'ADN. (2) L'attachement des NCs à des molécules d'ADN déjà peignées évite ces deux problèmes.

NCs avec la surface.

Nous n'affirmons pas que le protocole (1) n'est pas réalisable, mais il est vraisemblablement plus complexe à mettre en œuvre que (2). En effet, une fois conçu et fabriqué l'ADN décrit précédemment, le protocole (2) ne présente plus qu'une difficulté : déterminer des conditions expérimentales dans lesquelles l'adsorption non-spécifique des NCs est la plus faible possible.

b) Traitement des lames contre l'adsorption non spécifique des nanocristaux

En l'absence d'un traitement approprié, les nanocristaux s'adsorbent massivement sur les surfaces, aussi bien hydrophiles (lame de verre non traitée) qu'hydrophobes (lame de verre recouverte de polystyrène). Une étape de traitement des surfaces préalable à l'introduction des nanocristaux est donc impérativement requise. Les premiers essais utilisant des solutions diluées de BSA ou le "tampon d'incubation" fourni et recommandé par Quantum Dots Corporation ont conduit à des résultats insuffisants. En revanche, comme le démontre la figure 2.26, l'utilisation d'une solution à base de caséine ("Blocking Reagent", Roche) supprime presque entièrement l'adsorption non-spécifique des nanocristaux sur la surface.

c) Résultats : images et films expérimentaux

Des images réalisées à partir de molécules d'ADN présentant une extrémité

CHAPITRE 2. ETIREMENT DE L'ADN ET DÉTECTION PAR DES NCS

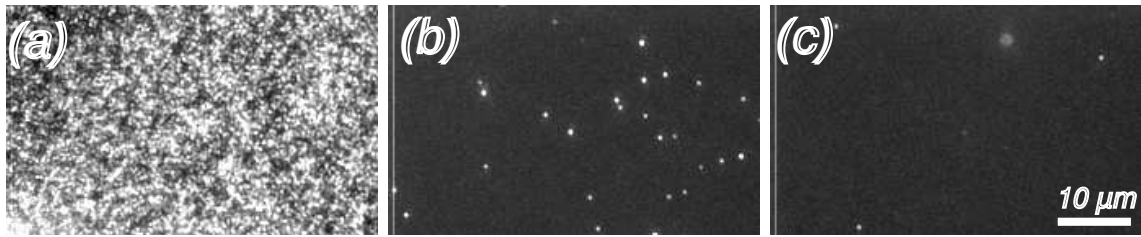


FIG. 2.26 – Adsorption des nanocristaux-streptavidine 605 nm sur des lames sans/avec traitement des lames avec une solution de caséine. Dans les 3 cas les lames sont recouvertes pendant 10 min de 100 μ l d'une solution de nanocristaux (à 2 nM dans le tampon Borate 40 mM pH 8.3, NaCl 100 mM) puis rincées avec le tampon Borate 40 mM pH 8.3. (a) En l'absence de traitement préalable, la lame de verre+polystyrène est recouverte de nanocristaux (b) Après un traitement de la lame avec 1.5 mg/ml de "Blocking Reagent", seuls quelques spots de nanocristaux sont visibles sur la surface (c) Quand le "Blocking Reagent" est en plus ajouté (à 0.3 mg/ml) dans la solution de nanocristaux, l'adsorption non-spécifique des nanocristaux est quasiment supprimée.

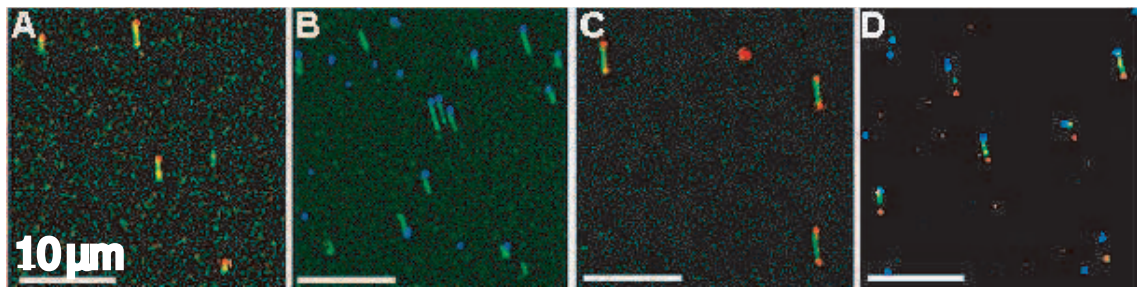


FIG. 2.27 – Détection des molécules d'ADN peignées (images superposées d'ADN et NC). L'ADN est marqué au YOYO-1 (en vert). Les extrémités biotine sont détectées avec des NC-streptavidine 565 (D) ou 605 (A et C) (en rouge). Les extrémités digoxigénine sont détectées avec de l'anti-digoxigénine de souris puis des NC anti-souris 655 (B et D) (en bleu). Quatre types d'ADN ont été utilisés : une extrémité biotine (A), une extrémité digoxigénine (B), deux extrémités biotine (C), une extrémité biotine et une extrémité digoxigénine (D)(barres : 10 μ m).

biotine, une extrémité digoxigénine, deux extrémités biotine ou une extrémité biotine et une extrémité digoxigénine sont représentées sur la figure 2.27. La figure 2.28 illustre la différence de photostabilité d'un fluorophore organique comme le YOYO-1 et des nanocristaux. La fluorescence des molécules d'ADN teintées au YOYO-1 décroît progressivement au cours du temps, alors que ce n'est pas le cas pour les nanocristaux.

2.3. DÉTECTION DE MOLÉCULES D'ADN PEIGNÉ À L'AIDE DE NANOCRISTAUX

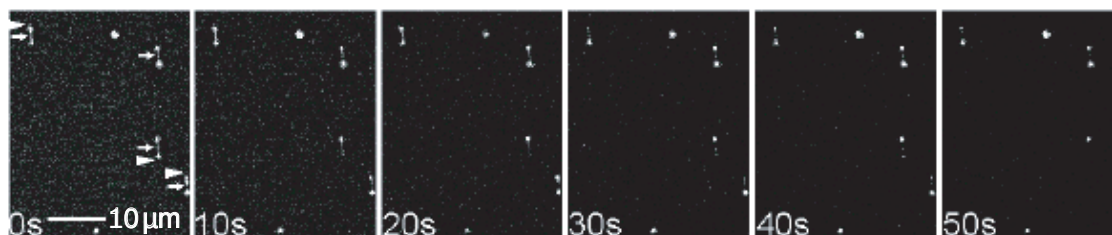


FIG. 2.28 – Observation simultanée de molécules d'ADN et de nanocristaux. Les molécules d'ADN ont été liguées à deux extrémités biotine, marquées au YOYO-1 et peignées. Les extrémités sont détectées avec des nanocristaux streptavidine à 605 nm. Un film de 60 images (temps d'exposition : 1 s) est réalisé au moyen d'un filtre d'émission passe-long. Comme le montrent les images extraites de ce film, la fluorescence des molécules d'ADN marquées au YOYO-1 diminue au cours du temps (flèches) et ne peut plus être observée après quelques dizaines de secondes, alors que les NCs (triangles) ne sont sujets qu'à un clignotement intermittent.

2.3.2.3 Matériels et méthodes

a) Préparation de l'ADN

Nous avons travaillé avec le pET11-parC, un plasmide généreusement fourni par Jean-François Allemand. Ce plasmide contient deux sites pour l'enzyme de restriction BsmBI (New England Biolabs). Sa digestion produit un fragment de 6.3 kb. Les amorces de PCR ont été synthétisées par Eurogentec (Seraing, Belgique) : 5'CGCTTGGTCTCTCTGGGACGGTATCAGCTCACTCAAAG3' (fwB), 5'CGCTTGGTCTCTCTCTGGCGGTATCAGCTCACTCAAAG3' (fwD) et 5'GGC-GATAAGTCGTGTCTTAC3' (rv). Des fragments d'ADN longs d'environ 500 bp, contenant de multiples biotines ou digoxigénine sont produits par PCR en mélangeant l'amorce fwD ou fwB et l'amorce rv (à 1.6 μ M) dans 50 μ l de "Taq buffer" (Promega) avec 2 mM MgCl₂; 50 μ M dATP, dCTP et dGTP, 33 μ M dTTP, 17 μ M biotine-dUTP ou digoxigénine-dUTP (Roche), 10 pg/ μ l d'ADN pBluescript SK+ et 0.1 U/ μ l de polymérase Taq (Promega). A la fin de la PCR les amorces et les nucléotides non incorporés sont éliminés à l'aide d'un kit (Qia-gen). Les produits de PCR sont ensuite digérés pendant une nuit avec 50 unités de BSA I (New England Biolabs), à 50°C. Après purification, le nombre de biotines/digoxigénines incorporées (75) est contrôlé selon un protocole développé par l'équipe de A. Bensimon [85]. Les estimations obtenues dans les différentes expériences (50-100) diffèrent peu de la valeur attendue (75, les nucléotides biotine/digoxigénine s'incorporant avec la même efficacité que les nucléotides non modifiés). Les fragments biotine/digoxigénine sont ligués au plasmide pET11-parC linéarisé en mélangeant 25 ng (7.5 nM) de fragments avec 100 ng de 6.3 plasmide linéarisé (2.5 nM) et 100 unités de ligase de T4 (New England Biolabs) dans 10 μ l du tampon recommandé, à 20 °C pendant une nuit. L'échantillon est alors purifié par précipitation à la spermidine selon le protocole [86]. L'ADN

CHAPITRE 2. ETIREMENT DE L'ADN ET DÉTECTION PAR DES NCS

obtenu est dilué dans 10 μ l de tampon TE et marqué avec 1.5 μ M YOYO-1 (Molecular Probes), soit un ratio de 1 YOYO-1/10 bp.

La qualité de l'ADN produit a été testée par B. Geron-Landre et jugée excellente, ce que nos expériences ultérieures ont confirmé.

b) Solution tampons et nanocristaux utilisés

Trois solutions tampons ont été utilisées dans ces expériences :

- "tampon de blocage" : "Blocking Reagent" (Roche) 1.5 mg/ml, MES 5 mM pH 5.5, EDTA 1 mM (NB : le "Blocking Reagent" se dilue très mal à pH acide, une dilution intermédiaire de ce produit est donc réalisée à pH 7.5)
- "tampon de rinçage" : Borate 40 mM pH 8.3
- "tampon de détection" : "Blocking Reagent" 0.3 mg/ml, Borate 40 mM pH 8.0

Trois types de nanocristaux (tous achetés chez Ozyme, le revendeur de Quantum Dots Corporation en France) ont été utilisés :

- nanocristaux recouverts de streptavidine émettant à 605 nm
- nanocristaux recouverts de streptavidine émettant à 565 nm
- nanocristaux recouverts d'anticorps anti-souris émettant à 655 nm

c) Protocole d'accrochage des NCs aux molécules d'ADN peignées

10 ng d'ADN avec extrémités modifiées sont peignés sur des lames de verre recouvertes de polystyrène selon le protocole "Peignage en cuve" décrit précédemment (cf. 2.1.2.4). Cette technique a été choisie de préférence au peignage par évaporation de microgouttes afin d'assurer le parallélisme des molécules peignées sur l'ensemble de la surface (l'analyse automatisée étant plus complexe à mettre en œuvre dans le cas contraire).

Après peignage, la lamelle est recouverte pendant 10 minutes avec 100 μ l de "tampon de blocage". Cette solution est ensuite doucement réaspirée, et la lamelle est rincée deux fois avec 200 μ l de "tampon de rinçage".

Dans les expériences utilisant des extrémités digoxigénine, la lamelle est recouverte pendant 10 minutes avec 100 μ l d'anti-digoxigénine de souris (Roche) à 200 ng/ml dans le "tampon de révélation" puis rincée deux fois avec 200 μ l de "tampon de rinçage".

La lamelle est ensuite recouverte pendant 10 minutes avec 100 μ l de "tampon de détection" avec 2 nM de nanocristaux-streptavidine 605 nm (détection des extrémités biotine) ou 2 nM de nanocristaux-anti souris 655 nm (détection des extrémités digoxigénine) ou 2 nM de nanocristaux-streptavidine 565 nm + 2 nM de nanocristaux-anti souris 655 nm (révélation des molécules d'ADN doublement marquées). Cette solution est réaspirée doucement, puis 5 rinçages sont effectués avec 200 μ l de "tampon de rinçage", en veillant à ne pas dessécher complètement la lame pendant les rinçages intermédiaires (des rinçages en nombre insuffisant ou trop violents conduisent à une adsorption importante des nanocristaux sur la surface).

2.3. DÉTECTION DE MOLÉCULES D'ADN PEIGNÉ À L'AIDE DE NANOCRISTAUX

d) Images et films

L'ensemble des images et des films est réalisé avec un objectif à immersion à eau (60X, ouverture numérique 1.2) et l'excitation des fluorophores (YOYO-1 et NCs) est effectuée avec une lampe à mercure et un filtre d'excitation 475 AF 40 et un miroir dichroïque 505 DRLP. Par contre le filtre d'émission utilisé diffère pour chaque fluorophore (YOYO-1 : 535AF45, NC 565 : 540AF30, NC 605 : 595AF60, NC 655 : 645AF75). Les molécules d'ADN et les NCs peuvent être imagés simultanément à l'aide d'un filtre passe-long (510 LP). Les images sont réalisées sur une camera CCD refroidie Coolsnap HQ (Roper Scientific). Dans les conditions des expériences, un pixel de la camera correspond à un carré de 215nm X 215nm sur l'échantillon. Les lames sont scannées, et pour chaque zone considérée on prend :

- une image d'ADN (filtre d'excitation 535DF45, temps d'exposition 1 s)
- un film de 60 images (filtre d'émission adapté aux NCs à détecter, temps d'exposition : 1 s) des NCs (deux films sont réalisés successivement dans le cas des ADN marqués avec une extrémité biotine et une extrémité digoxigénine).

En effet, en raison de la fluorescence intermittente des NCs ("clignotement"), une image ne suffit pas à localiser l'ensemble des NCs, une partie pouvant être dans un état non fluorescent durant la seconde d'exposition. La probabilité pour un NC de rester éteint pendant toute la durée du film (60 images) est en revanche très faible, de sorte que la plupart des NCs effectivement présents sur la surface sont détectés en prenant une "image maximum", où chaque pixel se voit attribuer sa valeur maximale sur les 60 images du film.

e) Détection automatique de l'ADN et des NCs (S. Bonneau)

L'analyse des images expérimentales utilise un programme écrit en MATLAB (MathWorks). Les NCs et l'ADN sont prédétectés automatiquement en utilisant une méthode de corrélation croisée, entre l'image expérimentale et un "modèle". Le "modèle" utilisé pour la détection des NCs est une gaussienne 2D isotrope correspondant à l'image attendue d'un objet quasi-ponctuel, c'est-à-dire de taille très petite devant la résolution optique du microscope, qui est d'environ 300 nm, par notre système optique. Expérimentalement, il est possible que nous détections plusieurs NCs aux extrémités des molécules d'ADN. Ces NCs sont répartis sur un fragment de 0.5 kb, et donc sur une distance maximale de 250 nm, qui demeure inférieure à la résolution optique du microscope. La position du centre de chaque spot prédétecté est ensuite évaluée par le programme sur chaque image (sauf celles où l'intensité lumineuse est trop faible à cause du clignotement) au moyen d'une interpolation gaussienne, puis moyennée sur l'ensemble du film. La précision de ce pointé est de l'ordre de 10 nm. Le "modèle" utilisé pour la détection de l'ADN est un "segment" (de section gaussienne) dont la direction et la longueur sont celles attendues pour les molécules d'ADN peigné. L'algorithme de corrélation croisée permet de détecter le centre des molécules d'ADN, et un algorithme supplémentaire permet de déterminer les extrémités de la molécules. Seules

CHAPITRE 2. ETIREMENT DE L'ADN ET DÉTECTION PAR DES NCS

les molécules de longueurs comprises entre 1.5 et 4 μm ont été prises en compte ultérieurement, la longueur attendue pour l'étirement d'un fragment d'ADN de 7.3 kb étant d'environ 3 μm . La détection de l'extrémité des molécules d'ADN a été considérée comme réussie lorsqu'un NC était détecté à moins de 1 μm , les positions du NC et des extrémités des molécules d'ADN étant celles fournies par le programme d'analyse.

2.3.3 Résultats

Une détection efficace des molécules d'ADN exige d'une part que les NCs s'attachent aux extrémités modifiées avec une probabilité élevée, et d'autre part que les molécules d'ADN soient détectables à partir de la seule position des spots de NCs. Ces deux points sont vérifiés par l'analyse des colocalisations ADN/NCs, en comparant les résultats d'un algorithme de détection utilisant seulement les films des NCs à l'image de l'ADN marqué au YOYO-1 sur la même zone.

2.3.3.1 Efficacité de détection des extrémités modifiées

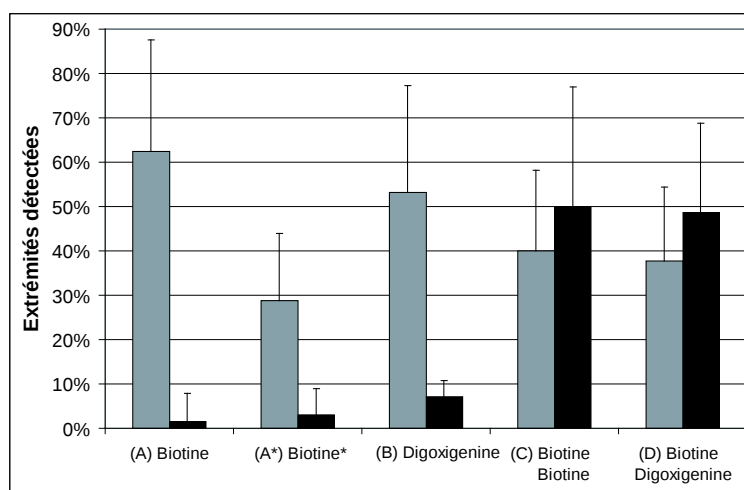


FIG. 2.29 – Efficacité de la détection des molécules d'ADN avec les NCs. L'ADN est modifié comme dans la fig précédente, (A*) est une molécule avec 10 fois moins de biotines que (A). Dans chaque cas est représentée la proportion des molécules d'ADN colocalisées avec un NC à une (gris) ou deux (noir) extrémité(s). Barres d'erreurs : écarts-types sur l'ensemble des images analysées.

Les images d'ADN obtenues montrent la présence de nombreuses molécules peignées avec une longueur apparente d'environ 3 μm , longueur attendue pour le peignage de molécules de 6.8 ou 7.3 kb. Leur densité sur la surface (moyennée sur l'ensemble des expériences) est approximativement 10^3 molécules/ mm^2 . Les films réalisés montrent également la présence sur la surface de spots très lumineux,

2.3. DÉTECTION DE MOLÉCULES D'ADN PEIGNÉ À L'AIDE DE NANOCRISTAUX

correspondant à un ou quelques nanocristaux, dont une partie est colocalisée avec l'extrémité d'une molécule d'ADN.

a) Détection de molécules d'ADN avec une extrémité biotine (A et A*)

La densité des NCs sur la surface est de l'ordre de $3 \cdot 10^3/\text{mm}^2$. Ce nombre inclut à la fois les NCs aux extrémités de molécules d'ADN et ceux qui sont adsorbés sur la surface. Dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées, environ 60 % des molécules d'ADN ont une extrémité colocalisée avec un NC. La colocalisation de NCs avec les deux extrémités (qui ne peut résulter que de la présence fortuite d'un NC au voisinage de l'extrémité non biotinylée) est en revanche rare. La densité des NCs sur la surface, $3 \cdot 10^3/\text{mm}^2$, rend en effet la présence d'un NC à moins de $1 \mu\text{m}$ d'une extrémité très improbable (de l'ordre de 1 %).

Dans 90% des cas, les NCs colocalisés avec l'extrémité d'une molécule d'ADN sont situés à son extrémité supérieure, qui est la première à s'être accrochée à la surface pendant le processus de peignage. Cette observation suggère que les extrémités modifiées s'accrochent de manière privilégiée à la surface. Un tel effet avait déjà été observé dans l'équipe avec des molécules d'ADN liées à des triples-hélices [63].

D'autre part, nous avons vérifié que le nombre élevé de biotines insérés sur les extrémités de l'ADN était nécessaire. Nous avons ligué aux extrémités de l'ADN des fragments de PCR 10 fois moins biotinylés que dans A (expérience A*). L'efficacité de détection de ces extrémités "peu biotinylées" tombe alors à 30 %.

b) Détection de molécules d'ADN avec une extrémité digoxigénine (B)

La même expérience a été réalisée avec des molécules d'ADN ligué à un fragment de PCR contenant de la digoxigénine. La détection de ces molécules exige deux étapes : l'ajout d'anti-digoxigénine de souris puis de NCs anti-souris. La densité moyenne des NCs sur la surface (environ $2 \cdot 10^4/\text{mm}^2$) est alors plus élevée que dans le cas précédent. La raison en est très probablement la présence d'anti-digoxigénines adsorbées non-spécifiquement à la surface, sur lesquelles peuvent se fixer les NCs anti-souris.

Cette expérience conduit néanmoins à une efficacité de détection très proche de celle obtenue avec (A). La plupart des NCs sont détectés sur l'extrémité supérieure des molécules d'ADN, indiquant un accrochage privilégié par l'extrémité digoxigénine. En revanche, davantage de molécules d'ADN (7%) sont détectées avec des NCs à leurs deux extrémités. Cette mesure est en accord avec une estimation utilisant la densité de $2 \cdot 10^4/\text{mm}^2$ de NCs sur la surface, qui conduit à une probabilité d'environ 3/50, soit 6% qu'un NC adsorbé non spécifiquement sur la surface se trouve à moins de $1 \mu\text{m}$ de l'extrémité d'une molécule d'ADN.

c) Détection de molécules d'ADN avec deux extrémités biotine (C), avec une extrémité biotine et une extrémité digoxigénine (D)

Pour les deux types de marquage, la proportion de molécules dont les deux

extrémités sont colocalisées avec des NCs est d'environ 50%. Pour 40% des molécules, une seule extrémité est marquée, les résultats étant à nouveau comparables pour les deux types de marquage. Dans le cas du marquage mixte biotine/digoxigénine, environ la moitié de ces molécules est marquée à son extrémité biotine, l'autre moitié à son extrémité digoxigénine. Ces résultats sont relativement cohérents avec la probabilité de détection de $P=60\%$ d'une seule extrémité modifiée (A et B) mesurée précédemment, qui mènerait à des probabilités respectivement égales à 36 % et 48 % pour la détection de respectivement deux et un NC(s) aux extrémités des molécules d'ADN.

Pour D, nous avons observé que les molécules ADN s'étaient, dans 90 % des cas, accrochées initialement par l'extrémité digoxigénine pendant la phase de peignage. Les extrémités digoxigénine ont donc une affinité plus forte pour la surface que les extrémités biotine.

d) Efficacité réelle de détection

Le fait que l'efficacité de détection mesurée soit de l'ordre de 60 %, bien inférieure à 100 %, ne peut être expliqué par le rendement (supérieur à 95 %) de la ligation des fragments de PCR aux extrémités du plasmide linéarisé. En revanche, aucun indice expérimental ne permet d'établir avec certitude que les molécules d'ADN peignées considérées sont entières, la taille apparente de molécules d'ADN peignées identiques étant soumise à d'importantes fluctuations. Il est donc possible qu'une partie des statistiques ait été effectuée sur des molécules non entières, de sorte que l'efficacité réelle de détection des extrémités modifiées pourrait dépasser les valeurs précédentes.

e) Nombre de NCs attachés aux extrémités modifiées

Le clignotement fréquemment observé pour les spots situés aux extrémités des molécules d'ADN (cf. figure 2.28) indique que ces spots sont généralement composés d'un ou de quelques nanocristaux. De plus, même si le clignotement des

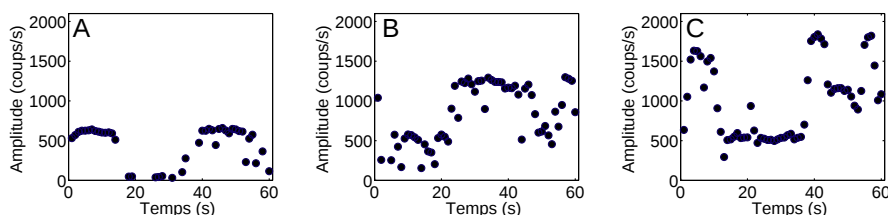


FIG. 2.30 – Amplitudes au cours du temps de trois spots différents colocalisés avec l'extrémité d'une molécule d'ADN (NCs streptavidine 605, ADN avec extrémités biotine). Malgré le clignotement des NCs, on distingue clairement des plateaux à 0, 500 (A,B,C), 1000 (B,C) et 1500 coups/s (C), suggérant la présence d'un (A), deux (B) et trois (C) nanocristaux à ces extrémités.

NCs provoque d'importantes fluctuations de leur amplitude au cours du temps,

2.3. DÉTECTION DE MOLÉCULES D'ADN PEIGNÉ À L'AIDE DE NANOCRISTAUX

des plateaux nets sont observés pour les amplitudes de certains spots, ce qui permet d'estimer le nombre de NCs par spot (1-3, cf figure 2.30). Ce nombre est très inférieur au nombre moyen de biotines/digoxigénines (de l'ordre de 80) présentes sur les extrémités modifiées. Il est possible qu'une fois les molécules d'ADN peignées sur la surface, la proximité de la surface rende une partie importante des groupements biotine/digoxigénine inaccessible aux NCs. De plus, il est probable qu'une partie des groupements biotine/digoxigénine s'accrochent directement à la surface pendant le processus de peignage (le fait que les molécules d'ADN s'accrochent de manière privilégiée par leurs extrémités modifiées supporte cette hypothèse). Le nombre de NCs potentiellement susceptibles de se coupler est alors réduit pour deux raisons : la liaison de streptavidines/anti-digoxigénines avec les biotines/digoxigénines ancrées sur la surface est impossible, et les extrémités accrochées non-spécifiquement par les biotines/digoxigénine sont dans une configuration compacte, non peignée, limitant stériquement le nombre de NCs couplés.

2.3.3.2 Détection de l'ADN par les NCs

Nous avons ensuite examiné dans quelle mesure les molécules d'ADN pouvaient être localisées par l'analyse des films de NCs. Sur la surface, les paires de spots sont de deux types : celles qui marquent une molécule d'ADN à ses deux extrémités, et celles qui correspondent à des spots adsorbés non spécifiquement sur la surface ou marquant deux molécules d'ADN différentes. Les paires correspondant à ces deux types ont des caractéristiques différentes : celles qui marquent effectivement une molécule d'ADN sont orientées dans la direction de peignage, et leur longueur est d'environ $3\text{ }\mu\text{m}$, alors que les autres paires ont une orientation et une longueur aléatoire. Nous avons donc, à partir des résultats du programme d'analyse donnant la position des NCs, répertorié les caractéristiques des paires de NCs, en mesurant la longueur séparant chaque paire de NCs et son orientation par rapport à la direction du peignage (nous nous sommes limités arbitrairement aux paires séparées par moins de $10\text{ }\mu\text{m}$). Nous avons tout d'abord représenté les distributions des longueurs et des orientations des paires de NCs, d'abord de manière indépendante puis corrélée. Dans ce deuxième cas, les paires marquant l'ADN peuvent toujours être mises en évidence. Nous avons ensuite vérifié sur les images d'ADN, marqué au YOYO-1 dans ces expériences, combien des paires dont les caractéristiques étaient proches de celles attendues pour le marquage d'une molécule d'ADN marquaient réellement une telle molécule

a) ADN avec deux extrémités biotine

La distribution des distances présente un pic entre 2.5 et $3.0\text{ }\mu\text{m}$, et la distribution des orientations a également un pic proche de 0° qui est la direction selon laquelle sont peignées les molécules d'ADN. L'histogramme des distances pour les paires d'orientation entre -10° et $+10^\circ$, et l'histogramme des orientations pour les paires séparées par des distances entre 1.5 et $4\text{ }\mu\text{m}$ présentent des pics encore plus nets (figure 2.31). Il existe donc une distance et une orientation privilégiées pour

CHAPITRE 2. ETIREMENT DE L'ADN ET DÉTECTION PAR DES NCS

les paires de NCs, qui correspond au marquage des extrémités d'une même molécule d'ADN. La vérification sur les images d'ADN montre que dans la plupart des cas (43/45), les paires d'orientation entre -10° et $+10^\circ$ et séparées par des distances entre 1.5 et 4 μm entourent une molécule d'ADN marquée au YOYO-1.

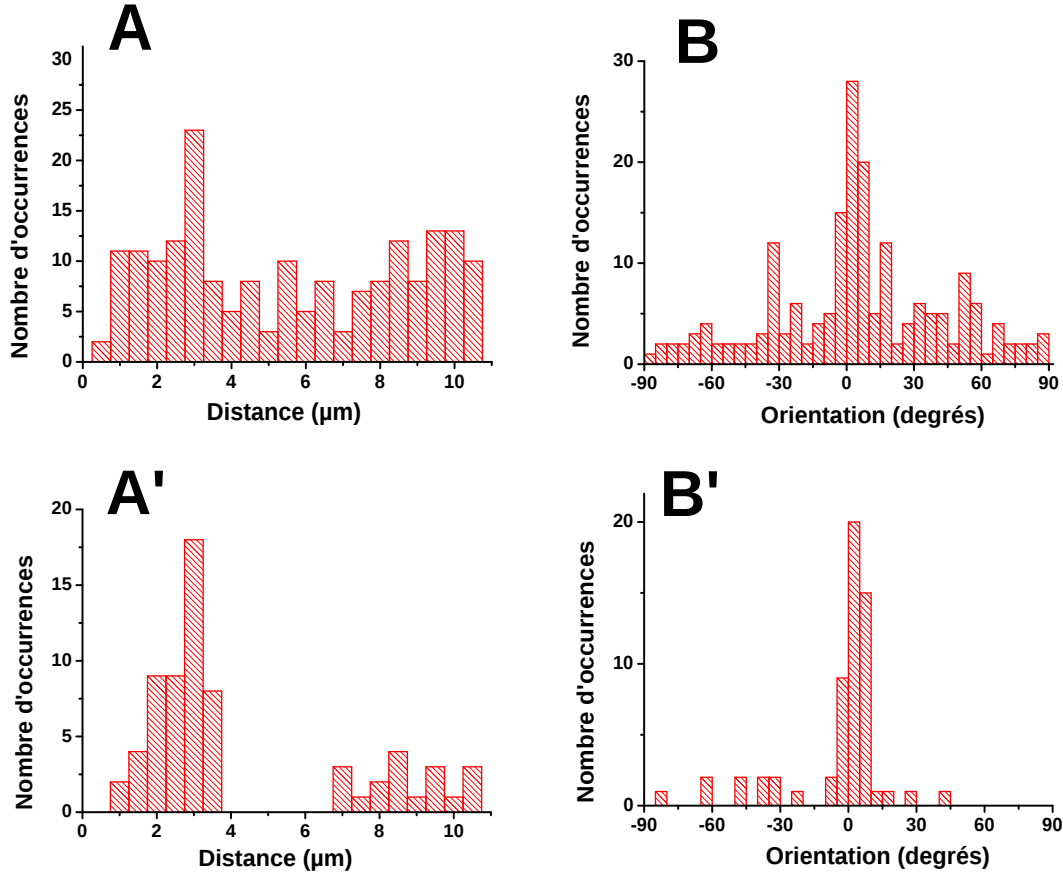


FIG. 2.31 – ADN avec deux extrémités biotine, NCs streptavidine. Statistiques sur les paires de NCs : distance séparant les paires avant (A) et après sélection des molécules dans la direction de peignage (A'), orientation des paires par rapport à la direction de peignage, avant (B) et après sélection des paires séparées par environ 3 μm .

b) ADN avec une extrémité biotine, une extrémité digoxigénine

A cause d'une plus grande adsorption non-spécifique des NCs anti-souris sur la surface, davantage de paires "non spécifiques" (qui ne marquent pas une molécule d'ADN) sont détectées. En l'absence de corrélation, aucun pic net ne peut être distingué sur les histogrammes de distance et d'orientation. Par contre, la distance séparant les paires d'orientation entre -10° et $+10^\circ$, et l'orientation des paires de distances comprises entre 1.5 et 4 μm présentent des pics à des valeurs similaires à celles obtenues avec l'ADN doublement biotinylé (figure 2.32). Dans 120 cas

2.3. DÉTECTION DE MOLÉCULES D'ADN PEIGNÉ À L'AIDE DE NANOCRISTAUX

sur 165, les paires d'orientation entre -10° et $+10^\circ$ et séparées par des distances entre 1.5 et 4 μm sont bien situées aux extrémités d'une molécule d'ADN.

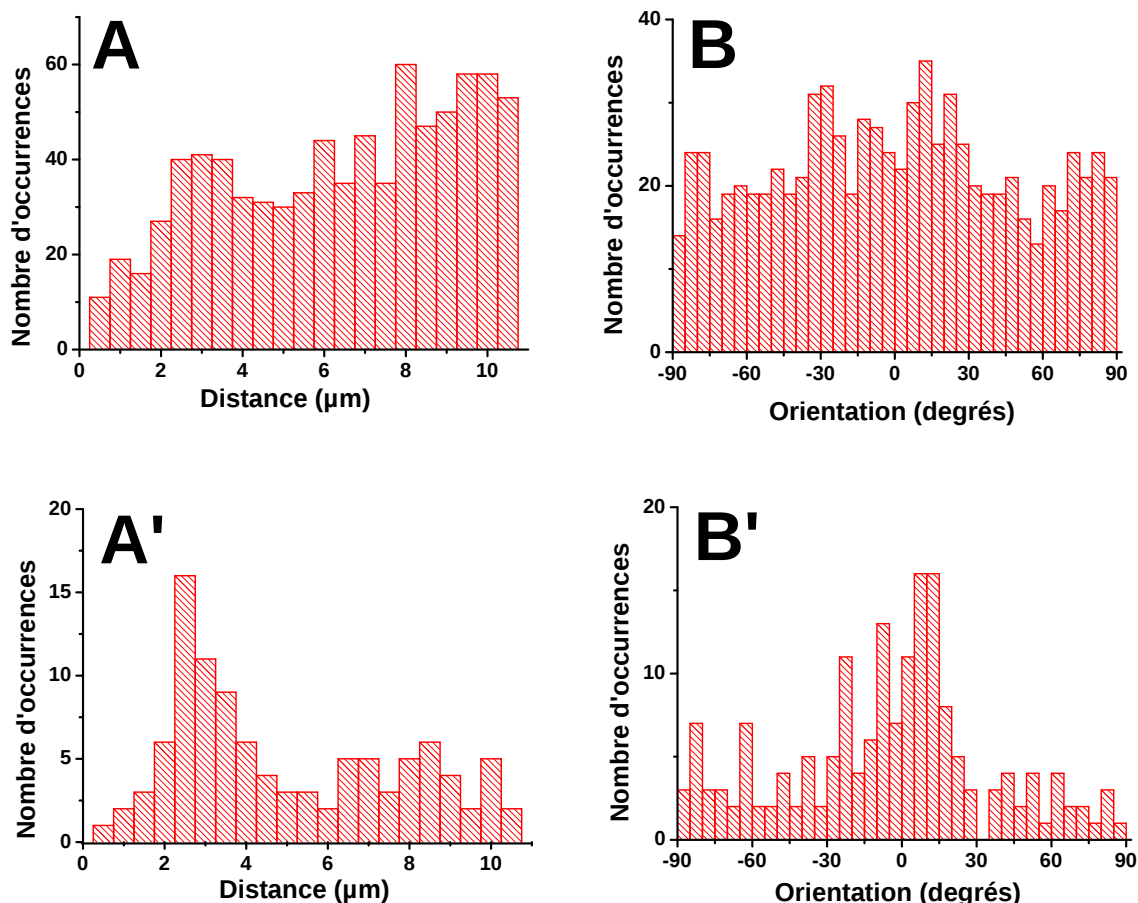


FIG. 2.32 – ADN avec une extrémité biotine et une extrémité digoxigénine, NCs streptavidine et anti-souris. Statistiques sur les paires de NCs : distance séparant les paires avant (A) et après sélection des molécules dans la direction de peignage (A'), orientation des paires par rapport à la direction de peignage, avant (B) et après sélection des paires séparées par environ 3 μm .

2.3.3.3 Estimation de la probabilité de localisation correcte des molécules d'ADN

La probabilité P qu'une paire satisfaisant au critère précédent (distance entre 1.5 et 4 μm , orientation entre -10° et $+10^\circ$) soit réellement associée à une molécule d'ADN dépend du nombre de NCs adsorbés non-spécifiquement à la surface, ainsi que de la longueur des molécules d'ADN à détecter et de leur densité sur la surface.

Le nombre total de paires détectées regroupe les paires associées à une molécule d'ADN, et la fraction de paires "aléatoires" (paires satisfaisant au critère

CHAPITRE 2. ETIREMENT DE L'ADN ET DÉTECTION PAR DES NCS

précédent mais non associées à une molécule d'ADN). P est donc donné par :

$$P = \frac{Y D_{\text{DNA}}}{D_{\text{paires}} + Y D_{\text{DNA}}}, \quad (2.10)$$

où Y désigne la probabilité de marquer les deux extrémités d'une molécule d'ADN, D_{DNA} la densité des molécules d'ADN sur la surface et D_{paires} la densité de paires "aléatoires" de NCS.

a) Cas de l'ADN avec deux extrémités biotine :

on considère ici une distribution aléatoire et homogène des NCS à la surface, caractérisée par la densité moyenne D_b . La densité de paires de distances comprises entre r_1 et r_2 et d'orientation entre θ_1 et θ_2 est donnée par :

$$D_{\text{paires}} = \frac{1}{2} D_b^2 \pi (r_2^2 - r_1^2) \frac{\theta_2 - \theta_1}{180}. \quad (2.11)$$

Cas de l'ADN avec une extrémité biotine et une extrémité digoxigénine :

$$D_{\text{paires}} = D_b D_d \pi (r_2^2 - r_1^2) \frac{\theta_2 - \theta_1}{180}. \quad (2.12)$$

Ici, D_{paires} désigne uniquement les paires constituées de deux NCS différents (dans nos expériences : un NC streptavidine et un NC anti-souris).

En utilisant les densités mesurées expérimentalement et le critère correspondant à la détection de molécules peignées de $3 \mu\text{m}$ ($r_1 = 1.5 \mu\text{m}$, $r_2 = 4.0 \mu\text{m}$, $\theta_1 = -10^\circ$ et $\theta_2 = 10^\circ$), il vient $D_{\text{paires}} = 21/\text{mm}^2$ pour l'ADN avec deux extrémités biotines et $D_{\text{paires}} = 288/\text{mm}^2$ pour l'ADN avec une extrémité biotine et une extrémité digoxigénine. En prenant $D_{\text{DNA}} = 10^3$ et $Y = 50\%$ conformément aux résultats précédents, on obtient pour P une valeur de 96 % pour l'ADN avec deux extrémités biotine et 63 % pour l'ADN biotine-digoxigénine. Ces valeurs sont compatibles avec celles obtenues expérimentalement (96 % et 73 %).

Remarque : la probabilité P est d'autant plus grande qu'on utilise de courtes molécules d'ADN, car pour de longues molécules on est amené à rechercher les paires dans de plus grandes surfaces.

2.3.4 Détection d'ADN étiré

L'ensemble du protocole de marquage a été validé dans le cas de molécules d'ADN peignées. Ces expériences nous ont permis de réaliser des statistiques complètes. Le protocole peut être légèrement modifié de manière à permettre la détection de molécules étirées. Comme le montre la figure 2.3.4, nous sommes parvenus à détecter des molécules étirées. L'efficacité de marquage semble aussi bonne que dans le cas des molécules peignées. Le seul inconvénient par rapport aux expériences sur ADN peigné est la densité plus faible de molécules étirées sur la surface à la fin de l'expérience.

2.4. CONCLUSION GÉNÉRALE DU CHAPITRE

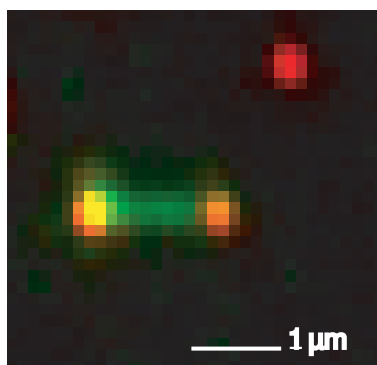


FIG. 2.33 – NCs-streptavidine attachés aux deux extrémités (biotinylées) d’une molécule étirée (pET 11-parC marqué au YOYO-1). La longueur apparente de la molécule $R \simeq 1.5 \mu\text{m}$ est celle attendue pour une molécule entière étirée avec un taux d’étirement d’environ 75%.

2.3.5 Conclusions

La méthode d’attachement de nanocristaux à des extrémités modifiées de l’ADN présentée ici est une alternative prometteuse aux marquages habituels utilisant des fluorophores organiques. En effet, la moitié des molécules d’ADN peuvent être détectées ; un tel taux de détection est satisfaisant pour la plupart des applications utilisant l’ADN peigné. Le risque de détection erronée de molécules d’ADN est faible dans le cas de molécules avec deux extrémités biotine (4 %). Pour les molécules d’ADN avec une extrémité biotine et une extrémité digoxigénine, le taux de détection erronée est supérieur (27%), car l’étape supplémentaire requise pour attacher des NCs-anticorps aux extrémités digoxigénine augmente leur adsorption non-spécifique. L’utilisation de nanocristaux recouverts d’anti-digoxigénine devrait toutefois permettre de détecter ces molécules d’ADN avec la même confiance que pour les molécules avec deux extrémités biotine, tout en permettant l’orientation des molécules d’ADN (les nanocristaux recouverts d’anti-digoxigénine n’étaient pas disponibles au moment où nos expériences ont été réalisées, mais sont désormais commercialisés par Quantum Dots Corporation).

2.4 Conclusion générale du chapitre

La technique d’étirement développée au laboratoire est simple à mettre en œuvre expérimentalement. Les molécules d’ADN étirées sont en moyenne à une distance satisfaisante de la surface, assez loin pour que l’action d’enzymes ne soit pas perturbée. Le mouvement thermique des molécules étirées a été bien caractérisé. La détection des molécules d’ADN peignées avec des nanocristaux a été validée expérimentalement. Dans un proche avenir, toutes les techniques présentées ici seront combinées : des molécules d’ADN avec des extrémités mo-

CHAPITRE 2. ETIREMENT DE L'ADN ET DéTECTION PAR DES NCS

difiées seront étirées sur des surfaces streptavidinées et détectées à l'aide de nanocristaux. Ce projet est présenté à la fin du chapitre 3 de cette thèse.

Annexe : Décomposition du contour d'ADN en modes de Fourier et calcul des fonctions d'auto-corrélation

Considérons l'équation de Langevin scalaire décrivant le mouvement transverse d'un ensemble de billes couplées par des ressorts linéaires.

$$\zeta \frac{dx_n}{dt} = -k(x_{n-1}(t) - x_n(t)) - k(x_{n+1}(t) - x_n(t)) + L_n(t), \quad (2.13)$$

où les forces aléatoires $L_n(t)$ vérifient, d'après le théorème de fluctuation-dissipation, $\langle L_n(t)L_{n'}(t') \rangle = 2\zeta k_B T \delta_{nn'} \delta(t - t')$. En prenant la limite continue de cette équation, celle-ci devient :

$$\zeta \frac{\partial x}{\partial t} = k \frac{\partial^2 x}{\partial n^2} + L_n(t). \quad (2.14)$$

Dynamique dans chaque mode

Le mouvement peut être décomposé en modes de Fourier de la manière suivante :

$X_p = (1/N) \sum_{n=1}^N x_n(t) \sin(np\pi/N)$ pour les entiers $p > 0$, soit dans la limite continue

$X_p = \int_0^N x_n(t) \sin(np\pi/N) dn$. Cette décomposition n'est effectuée que sur des sinus, à cause de la condition de mouvement nul aux extrémités dans nos expériences.

Nous allons à présent établir l'équation régissant la dynamique dans chaque mode, à partir de l'équation de Langevin de départ.

$$\begin{aligned} \zeta dX_p/dt &= (1/N) \int_0^N \zeta (\partial x_n / \partial t) \sin(np\pi/N) dn \\ &= (1/N) \int_0^N k (\partial^2 x / \partial n^2) \sin(np\pi/N) dn \\ &= (1/N) [k \partial x_n / \partial t \sin(np\pi/N)]_0^N \\ &\quad - (1/N) [k x_n (p\pi/N) \cos(np\pi/N)]_0^N \\ &\quad - (1/N) \int_0^N (p\pi/N)^2 k x_n \sin(np\pi/N) dn + \int_0^N L_n \sin(np\pi/N) dn. \end{aligned}$$

Cette expression est obtenue à la suite de deux intégrations par parties. Comme $\sin(0) = \sin(p\pi) = 0$ et $x_0(t) = x_N(t) = 0$, on obtient donc :

$$\zeta dX_p/dt = -k(p\pi/N)^2 X_p + \int_0^N L_n \sin(np\pi/N) dn. \quad (2.15)$$

CHAPITRE 2. ETIREMENT DE L'ADN ET DÉTECTION PAR DES NCS

La force aléatoire $\int_0^N L_n \sin(np\pi/N) \, dn$ vérifie :

$$\begin{aligned}
 & \langle \left(\int_0^N L_n \sin(np\pi/N) \right)^2 \rangle \, dn \\
 &= (1/N^2) \int_0^N \int_0^N \langle f_n(t) f_{n'}(t) \rangle \sin(np\pi/N) \sin(n'p\pi/N) \, dn \, dn' \\
 &= (1/N^2) \int_0^N \int_0^N \langle f_n^2(t) \rangle \sin^2(np\pi/N) \, dn \, dn' \\
 &= (1/N^2) 2\zeta k_B T N^2 / 2 \\
 &= \zeta k_B T
 \end{aligned}$$

car les forces f_n sont de moyenne nulle et indépendantes d'une bille à l'autre. Pour écrire le théorème de fluctuation-dissipation de la même manière que pour l'équation de Langevin initiale, on multiplie tous les termes de l'équation précédente par $2N$. Il vient alors :

$$\zeta_p \frac{\partial X_p}{\partial t} = -k_p X_p + L_p, \quad (2.16)$$

où $\zeta_p = 2N\zeta$, $k_p = 2k\pi^2 p^2/N$ et $\langle L_p(t) L_p(t') \rangle = 2k_B T \zeta_p \delta(t - t')$

Ainsi, la dynamique de chaque mode est régie par des équations de Langevin non couplées.

Calcul des fonctions d'autocorrélation

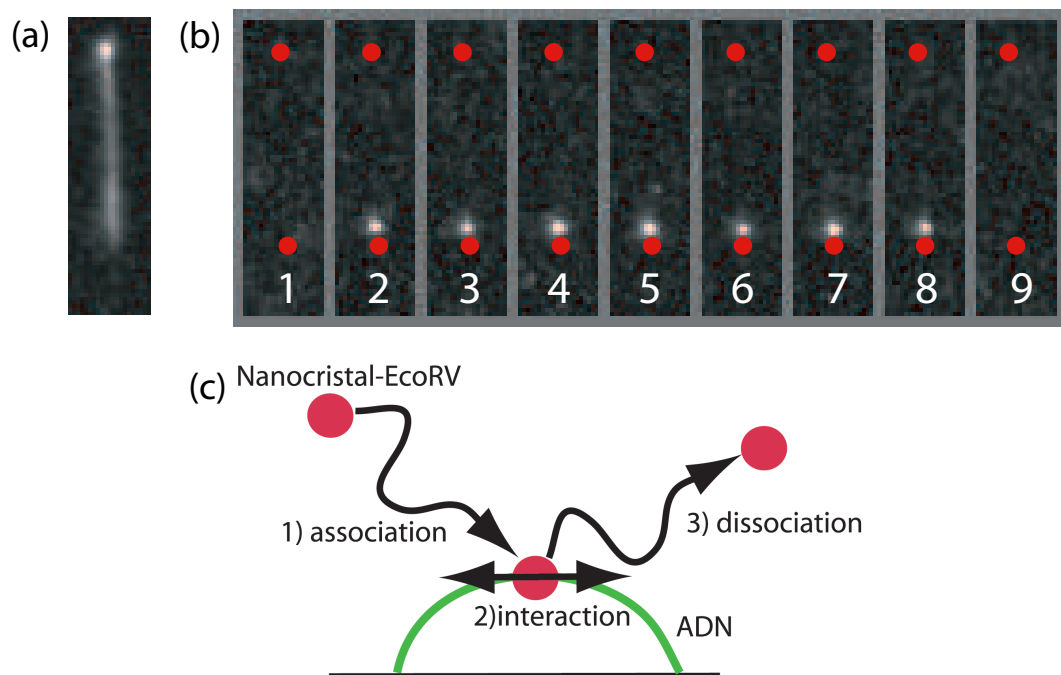
Nous allons à présent calculer la fonction d'autocorrélation temporelle des variables $X_p(t)$. Pour cela, écrivons la solution de l'équation différentielle précédente sous forme intégrale : $X_p(t) = 1/\zeta_p \int_{-\infty}^t \exp(-t'/\tau_p) L_p(t') \, dt'$ avec $\tau_p = \zeta_p/k_p$. La fonction d'autocorrélation de $X_p(t)$ vaut donc :

$$\begin{aligned}
 \langle X_p(t) X_p(0) \rangle &= 1/\zeta_p^2 \int_{-\infty}^t \int_{-\infty}^0 \exp(-(t_1 + t_2)/\tau_p) \langle L_p(t_1) L_p(t_2) \rangle \, dt_1 \, dt_2 \\
 &= 1/\zeta_p^2 \int_{-\infty}^t \int_{-\infty}^0 \exp(-(t_1 + t_2)/\tau_p) 2\zeta_p k_B T \delta(t_2 - t_1) \, dt_1 \, dt_2 \\
 &= 2\zeta_p k_B T \int_{-\infty}^0 \exp(-(t - 2t_2)/\tau_p) \, dt_2 \\
 &= \frac{k_B T}{k_p} \exp(-t/\tau_p).
 \end{aligned}$$

Les fonctions d'autocorrélation des modes de Fourier des fluctuations sont donc des exponentielles d'amplitude $k_B T/k_p$ et de temps caractéristique $\tau_p = \zeta_p/k_p$.

Chapitre 3

Observation de l'interaction de nanocristaux-EcoRV avec des molécules d'ADN étirées



3.1 Couplage d'EcoRV à un fluorophore

3.1.1 L'enzyme de restriction EcoRV

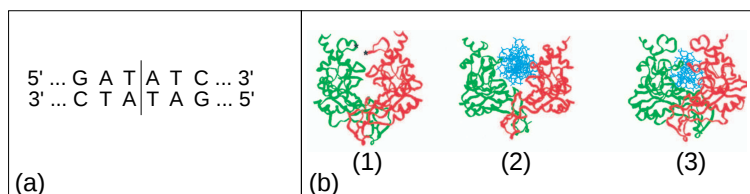


FIG. 3.1 – (a) Séquence-cible d'EcoRV (b) Structure d'EcoRV : (1) enzyme seule, et liée à l'ADN (en bleu) (2) sur une séquence non spécifique et (3) sur sa séquence-cible. Les deux unités constituant le dimère sont représentées en vert et en rouge.

EcoRV est une enzyme de restriction de type II. Elle se présente sous la forme d'un homodimère de masse moléculaire totale 55 kD, chaque sous-unité comportant 244 acides aminés. Cette enzyme reconnaît une séquence de six paires de bases sur l'ADN double-brin, qu'elle coupe en son milieu. Elle a été cristallisée en 1993 par Winkler et al. dans trois configurations différentes : libre, liée non spécifiquement à l'ADN, et fixée sur sa séquence-cible [87] (figure 3.1).

La capacité d'EcoRV à reconnaître spécifiquement et à cliver sa séquence-cible dépend de la présence d'ions divalents. En l'absence de tels ions, EcoRV manifeste peu de spécificité pour sa séquence-cible, qu'elle est incapable de cliver [88]. En présence de ces ions, EcoRV se lie en revanche beaucoup plus fortement à sa séquence-cible qu'aux fragments d'ADN non spécifiques. Cependant, sa capacité à cliver ensuite l'ADN est variable selon les ions utilisés : le clivage est le plus efficace avec des ions Mg^{2+} , alors qu'il n'est pas observé en présence d'ions Ca^{2+} [89, 90].

3.1.2 Couplage des protéines à des fluorophores : impératifs et difficultés

L'observation d'une protéine individuelle par microscopie de fluorescence dans le visible nécessite son couplage à un ou plusieurs fluorophore(s). Un tel couplage doit satisfaire simultanément à deux contraintes :

- Les fluorophores utilisés doivent d'une part permettre la détection de protéines individuelles avec des résolutions spatiale (définie ici comme la précision avec laquelle il est possible de pointer la position d'un fluorophore) et temporelle satisfaisantes ; ainsi, en vue de l'étude de la diffusion linéaire d'EcoRV le long de l'ADN, ces résolutions doivent permettre de caractériser un mouvement qui a lieu sur des longueurs inférieures à $1 \mu m$ et pendant une durée de l'ordre de la seconde. Ceci n'est réalisable qu'à travers l'utilisation de

fluorophores dotés de "bonnes" propriétés optiques (section efficace d'adsorption, rendement quantique et photostabilité élevés) afin de collecter un nombre de photons pendant le temps d'exposition du fluorophore suffisant pour déterminer sa position avec précision.

- D'autre part, la présence de fluorophores ne doit pas affecter l'activité biologique des protéines étudiées.

3.1.2.1 Choix du fluorophore

Nous allons passer en revue les fluorophores utilisés le plus couramment en microscopie de fluorescence, et montrer que les nanocristaux constituent des fluorophores particulièrement intéressants pour l'étude de la dynamique d'une enzyme interagissant avec l'ADN.

a) Green Fluorescent Protein (GFP)

La GFP est une protéine fluorescente produite par la méduse *Aequora Victoria*. L'insertion de son gène dans celui des protéines à étudier permet de fabriquer par clonage un échantillon de protéines fluorescentes toutes identiques, contenant une GFP en un site bien déterminé. Cependant, ce fluorophore peut difficilement être utilisé pour observer des molécules individuelles du fait de ses propriétés optiques médiocres : son intensité lumineuse fluctue au cours du temps, et son photoblanchiment est rapide.

b) Fluorophores organiques traditionnels (exemple : Cy3, Alexa 546)

Les fluorophores Cy3 et Alexa 546 sont des molécules organiques de petite taille. Leur masse moléculaire, de l'ordre de 1 kD, est bien inférieure à celle d'EcoRV. Ces fluorophores sont vendus sous diverses formes fonctionnalisées (groupes N-hydroxysuccinimides [NHS], maléimides, hydrazides...) qui permettent leur couplage aux protéines.

P. Selvin est parvenu en 2003 à étudier la dynamique d'un moteur moléculaire, la Myosine V, en le couplant à une molécule de Cy3 unique. Une résolution spatiale de 1.5 nm a pu être obtenue à l'aide d'un dispositif expérimental baptisé FIONA (Fluorescence Imaging with One-Nanometer Accuracy), qui combine notamment une imagerie en onde évanescence et l'élimination de l'oxygène en solution pour lutter contre le photoblanchiment [91]. Dans ces conditions expérimentales, il est possible de collecter de 1 à 3 million(s) de photons par fluorophore avant son photoblanchiment.

Cependant, la résolution spatiale de 1.5 nm est obtenue dans cette expérience avec un temps d'exposition de 500 ms. Ce temps d'exposition est adapté à l'étude du mouvement d'un moteur moléculaire sur un microtubule : ces moteurs, très processifs, peuvent rester attachés plusieurs minutes sur les microtubules, et leur vitesse peut être ajustée en variant les concentrations d'ATP utilisées. Ainsi, dans les conditions de cette expérience, la myosine V effectuait un pas de 37 nm en quelques secondes. Ce temps d'exposition est en revanche beaucoup trop élevé pour des phénomènes courts, comme l'interaction d'EcoRV avec un

3.1. COUPLAGE D'ECORV À UN FLUOROPHORE

fragment d'ADN non spécifique, d'une durée totale de l'ordre de la seconde et dont l'étude dynamique requiert une résolution temporelle de l'ordre de la dizaine de millisecondes. Des fluorophores comme le Cy3 ou Alexa 546 sont difficiles à détecter avec des temps d'exposition de cet ordre, en particulier au-dessus de surfaces qui génèrent une autofluorescence importante, comme les surfaces de polystyrène que nous avons utilisées pour étirer l'ADN.

Le greffage d'un nombre élevé de fluorophores sur une même protéine ne permet pas nécessairement de résoudre ce problème. En effet, à cause des interactions entre fluorophores ("quenching"), la fluorescence d'une protéine marquée avec plusieurs fluorophores organiques ne varie pas linéairement avec le nombre de fluorophores, et décroît même en général au-delà de quelques fluorophores [92].

c) Nanoparticules fluorescentes

L'équipe de S. Nie a réussi à coupler diverses protéines (BSA, histones, EcoRI) à la surface de billes de latex fluorescentes d'une taille proche de 20 nm. Ces différentes billes ont été incubées avec de l'ADN du phage λ , puis les complexes ADN-billes ainsi formés ont été peignés. Cette expérience a notamment montré que les billes recouvertes d'EcoRI étaient capables de se fixer aux séquences-cibles d'EcoRI sur des molécules de phage λ [93]. Néanmoins, cette étude, reposant sur l'observation de complexes ADN-billes immobiles était purement statique, permettant un temps d'intégration long (non mentionné dans l'article décrivant ces travaux) pour réaliser les images.

Z. Guéroui a également utilisé ces billes au cours de sa thèse, et a estimé la résolution spatiale accessible avec ces fluorophores, dans son dispositif expérimental, à 100 nm, avec un temps d'exposition 100 ms [64]. De telles résolutions spatiale et temporelle, même si elles peuvent sans doute être améliorées, sont insuffisantes pour nos expériences.

d) Nanocristaux

Une description sommaire des nanocristaux a été présentée dans le chapitre précédent. Contrairement aux fluorophores organiques, les nanocristaux ne sont quasiment pas affectés par le phénomène de photoblanchiment et peuvent donc être observés pendant de longues durées. De plus, la section efficace d'absorption des nanocristaux est très supérieure à celle des fluorophores organiques, comme le montre la figure 3.2. Ils sont donc très brillants même lorsqu'ils sont excités par de faibles intensités lumineuses. Ce dernier point est important dans nos expériences : travailler à de faibles intensités lumineuses permet en particulier de minimiser l'autofluorescence des surfaces utilisées pour étirer l'ADN, et d'éviter la photodestruction de l'ADN teinté.

e) Conclusion

Les nanocristaux constituent des fluorophores très attrayants pour marquer EcoRV et observer son interaction avec l'ADN. Cependant, nos expériences auraient peut-être été possibles en utilisant des fluorophores organiques, au prix

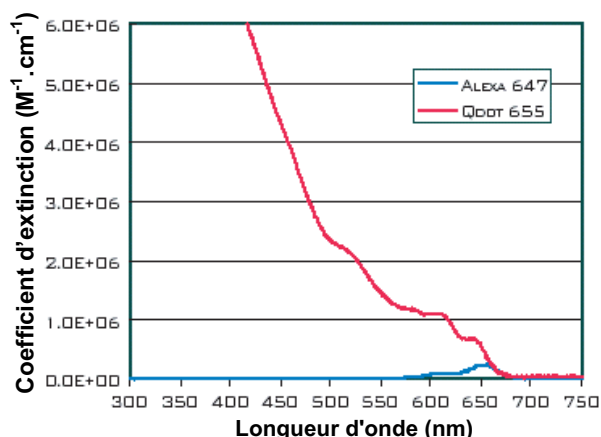


FIG. 3.2 – Comparaison de l'absorbance d'une solution de nanocristaux (émission : 655 nm) et de fluorophores organiques (Alexa 647). Source : Quantum Dots Corporation.

d'une optimisation minutieuse de l'ensemble du dispositif expérimental (choix du fluorophore, optimisation de la puissance d'excitation et des surfaces utilisées, utilisation d'une onde évanescente pour l'excitation et élimination efficace de l'oxygène présent en solution).

3.1.2.2 Intérêt d'un couplage site-spécifique de la protéine

Le couplage de fluorophores aux protéines peut altérer leur activité biologique, notamment pour des raisons stériques et électrostatiques, en particulier si les fluorophores sont insérés à proximité du "site actif" des protéines (pour EcoRV, son site de liaison à l'ADN).

Les méthodes de couplage protéine/fluorophore(s) les plus simples consistent à utiliser des fluorophores fonctionnalisés, en général commerciaux, capables de réagir spécifiquement avec un certain type d'acide aminé. Ainsi, des fluorophores avec une fonction NHS peuvent former une liaison covalente avec les lysines des protéines, alors que les fluorophores (ou les biotines) avec une fonction maléimide se lient aux cystéines. Cependant, cette méthode a deux inconvénients : la plupart des protéines de 10 à 50 kD possèdent plusieurs lysines et/ou cystéines. Les échantillons de protéines couplées obtenues ainsi sont par nature hétérogènes, le nombre et l'emplacement des fluorophores étant variable d'une protéine à l'autre. De plus, si la protéine possède l'acide aminé visé au voisinage de son "site actif", son activité biologique risque d'être largement modifiée.

Une importante différence sépare les nanocristaux commerciaux des fluorophores organiques traditionnels : ils possèdent à leur surface plusieurs molécules à même d'être liées aux protéines. Par exemple, selon Quantum Dots Corporation, les nanocristaux conjugués à la streptavidine contiennent 5 à 10 streptavidines

3.1. COUPLAGE D'ECORV À UN FLUOROPHORE

à leur surface. Pour éviter l'agrégation des nanocristaux *via* les enzymes, il est donc essentiel d'avoir à sa disposition une protéine ne possédant qu'un seul site de liaison aux nanocristaux, loin de son site actif.

Un tel couplage, exposé dans le paragraphe suivant, a pu être réalisé grâce à l'utilisation d'enzymes mutantes biotinylées qui nous ont été fournies par Wolfgang Wende et Alfred Pingoud.

3.1.3 Couplage d'EcoRV biotinylées à des nanocristaux

3.1.3.1 Synthèse d'enzymes EcoRV biotinylées (Wolfgang Wende et Alfred Pingoud, Justus-Liebig Universität Giessen, Allemagne)

Une seule cystéine figure parmi les 244 acides aminés qui composent EcoRV, en 21^{ème} position sur la structure primaire. La structure tridimensionnelle d'EcoRV suggère que cette cystéine, située "à l'intérieur" de l'enzyme, n'est pas accessible.

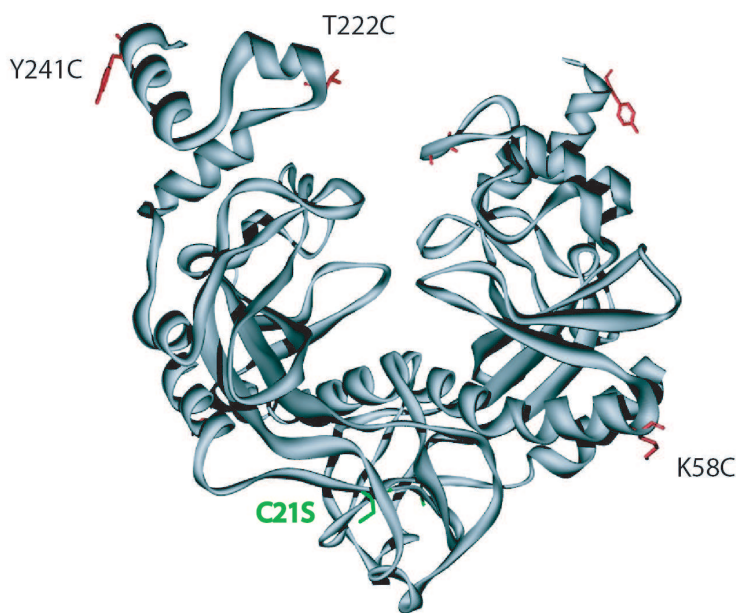


FIG. 3.3 – Enzymes EcoRV mutantes produites par W. Wende (groupe d'A. Pingoud) : deux mutations ont été réalisées : C21S et, selon l'échantillon, K58C, T222C ou Y241C.

Wolfgang Wende a donc synthétisé des enzymes mutantes où l'unique cystéine présente dans la structure de l'enzyme sauvage a été remplacée par une sérine (mutation C21S) et où un acide aminé accessible a été remplacé par une cystéine. Il a fabriqué trois types de mutants différents, correspondant aux mutations K58C, T222C et Y241C (K : lysine, T : thréonine, Y : tyrosine, C : cystéine ; les chiffres correspondent à la position sur la structure primaire de l'acide aminé modifié)

(figure 3.3). Les mutants obtenus possèdent donc tous une unique cystéine, qui est accessible en solution, contrairement à celle que possèdent les enzymes sauvages. Une biotine-maléimide peut ensuite être liée à cette cystéine. D'après les tests réalisés par Wolfgang Wende, l'activité biologique des enzymes mutantes biotinylées est la même que celle des enzymes sauvages. Cela n'est pas surprenant dans la mesure où aucune des mutations réalisées n'affecte un acide aminé impliqué dans la reconnaissance et la coupure de l'ADN ; de plus, la biotine est une molécule très petite, de sorte que sa présence ne constitue pas une gêne stérique à l'action d'EcoRV. Notons enfin qu'EcoRV adoptant une conformation dimérique, chaque dimère contient donc deux biotines susceptibles d'être couplées à des fluorophores.

3.1.3.2 Couplage aux nanocristaux

Le couplage des enzymes aux nanocristaux a été réalisé par l'intermédiaire de liaisons biotine-streptavidine. Ce couplage n'exige pas de conditions particulières, en revanche le choix du tampon de couplage peut se révéler important pour assurer la stabilité à long terme (supérieure à la semaine) des échantillons couplés. Dans la suite de ce travail, ceux-ci seront désignés par la dénomination "NC-EcoRV".

a) Choix du mutant EcoRV

En considérant la structure tridimensionnelle d'EcoRV, on peut craindre que le couplage d'un nanocristal sur les sites C241 ou C222 ne gêne stériquement l'accès de l'ADN à son site de liaison, la taille des nanocristaux utilisés, de diamètre 10 à 15 nm, étant supérieure à celle de l'enzyme, dont le diamètre est approximativement 5 nm. Au contraire, on peut penser que la fixation d'un nanocristal sur le mutant K58C perturbe beaucoup moins la liaison ultérieure de l'enzyme à l'ADN (figure 3.3). C'est pourquoi nous avons utilisé préférentiellement ce mutant au cours des expériences présentées dans ce mémoire.

b) Choix du tampon de couplage

EcoRV et les nanocristaux sont stables dans la gamme de pH 6-9, en revanche leurs stabilités respectives sont affectées par la concentration en NaCl. Un grand nombre de protéines tendent à s'agréger à de faibles concentrations en NaCl (inférieures à 100 mM). Une démonstration expérimentale en est par exemple donnée dans les travaux de L. Jen-Jacobson avec EcoRI [94] puis EcoRV [47]. Par ailleurs, Quantum Dots Corporation recommande de ne pas diluer les nanocristaux dans des solutions contenant plus de 200 mM de NaCl, puisque dans le cas contraire les nanocristaux commenceraient à s'agréger. Afin de tenir compte de ces deux contraintes, nous avons testé deux concentrations en sel : 100 et 200 mM. Selon les nanocristaux (le protocole de synthèse utilisé par le fabricant a légèrement évolué au cours de cette thèse) et le mutant EcoRV utilisés, une agrégation macroscopique des NC-EcoRV a été parfois observée dans 100 mM NaCl. En revanche, à 200 mM NaCl, aucune agrégation macroscopique n'a été

3.1. COUPLAGE D'ECORV À UN FLUOROPHORE

observée, même après une semaine, c'est pourquoi cette salinité a été utilisée pour le stockage des les échantillons couplés.

3.1.3.3 Matériel et méthodes

Le tampon utilisé pour le couplage des nanocristaux et d'EcoRV a la composition suivante : HEPES 50 mM pH 7.5, NaCl 200 mM, DTT 1 mM et EDTA 1 mM.

a) Purification des nanocristaux commerciaux

Les échantillons de nanocristaux commerciaux (Quantum Dots Corporation) contiennent des streptavidines libres [95], indésirables dans nos expériences. Il est donc indispensable d'éliminer ces streptavidines avant de procéder au couplage nanocristaux-enzymes. 2 μ l d'une solution commerciale micromolaire de nanocristaux 605 nm recouverts de streptavidine commerciaux (soit $2 \cdot 10^{-12}$ mol) sont purifiés par trois centrifugations successives (8 minutes, 14000 g chacune) au-dessus d'une membrane Microcon YM 100 (Millipore). Toutes les dilutions sont réalisées dans le tampon de couplage. Les nanocristaux sont récupérés dans un volume d'environ 10 μ l. Des expériences témoins ont permis de montrer que cette procédure élimine la quasi-totalité des streptavidines présentes en solution, tout en permettant la récupération de la quasi-totalité des nanocristaux. La concentration finale des NC-EcoRV est donc de l'ordre de 200 nM.

b) Couplage

Le couplage est réalisé en mélangeant 10^{-12} mol de nanocristaux purifiés et la quantité d'enzymes correspondant au ratio désiré dans un volume total de 20 μ l, complété avec le tampon de couplage. Par exemple, pour obtenir un ratio proche de 15 enzymes par nanocristal, nous avons utilisé 2 μ l du stock d'enzymes biotinylées K58C (7.8 μ M), soit $15.6 \cdot 10^{-12}$ mol. En pratique, nous avons utilisé des ratios EcoRV/nanocristal allant de 2 à 15, et l'effet de ce paramètre sera discuté plus loin. L'échantillon obtenu est stocké à 4 °C. A chaque fois, nous avons attendu quelques heures avant d'utiliser les échantillons couplés. Par ailleurs, nous les avons toujours utilisés dans la semaine suivant le couplage.

c) Vérification de la stabilité des échantillons couplés

Les échantillons couplés sont centrifugés quelques secondes à 3000 g puis illuminés avec une lampe UV. La fluorescence des nanocristaux est concentrée au fond du tube en cas d'agrégation, alors qu'elle est parfaitement homogène pour les échantillons stables. Ce test a montré la stabilité de tous les échantillons couplés en utilisant le protocole ci-dessus.

d) Purification des échantillons couplés

Selon l'utilisation projetée, la présence éventuelle d'enzymes non liées aux nanocristaux à la fin du couplage peut être gênante. Dans ce cas, les enzymes peuvent

être éliminées, en exploitant leur différence de taille avec les nanocristaux, par passage de l'échantillon couplé sur une colonne Superdex (Amersham) à 4 °C. Cette étape de purification a été réalisée pour tester l'activité biologique des enzymes par gel d'électrophorèse. Elle n'a cependant pas été menée pour les expériences d'interaction en molécule unique, car elle conduit à la dilution des NC-EcoRV par un facteur difficile à évaluer précisément, alors que la présence éventuelle d'enzymes libres ne semble pas gênante dans ces expériences.

3.1.3.4 Tests biochimiques de l'activité des NC-EcoRV

Nous avons cherché à vérifier, par des moyens expérimentalement simples, le succès des couplages réalisés. Pour cela, nous avons cumulé différentes approches, présentées dans les paragraphes suivants. Nous avons tout d'abord observé que le couplage des nanocristaux à EcoRV affecte leur migration sur un gel d'agarose (paragraphe a), première partie). Nous avons ensuite vérifié que les échantillons couplés sont capables de couper les molécules d'ADN, à l'instar des enzymes sauvages (paragraphe a), seconde partie). Enfin, nous avons observé que le comportement des nanocristaux couplés en présence de billes recouvertes d'héparine est cohérent avec celui attendu d'un couplage réussi (paragraphe b)).

a) Gels d'électrophorèse

Migration des nanocristaux dans un gel d'agarose : le greffage d'enzymes EcoRV à la surface de nanocristaux change leur taille et leur charge, et doit donc affecter leur vitesse de migration dans un gel d'électrophorèse.

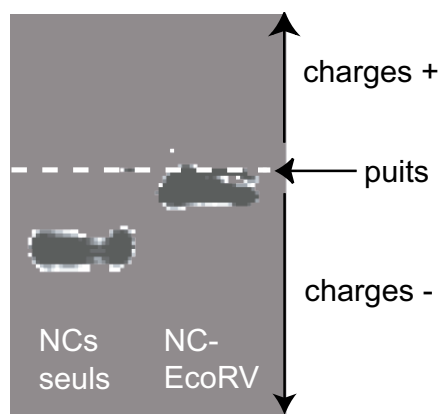


FIG. 3.4 – Migration de nanocristaux-streptavidine avant et après couplage à EcoRV (photo obtenue après 30 minutes de migration dans un gel d'agarose 0.8% à pH 8.1).

Nous avons comparé la migration de nanocristaux conjugués à la streptavidine commerciaux avant et après leur couplage aux enzymes EcoRV biotinylées.

3.1. COUPLAGE D'ECORV À UN FLUOROPHORE

Comme le montre le gel réalisé (figure 3.4), les nanocristaux conjugués à la streptavidine sont chargés négativement. Ceci est logique, la streptavidine, qui a un point isoélectrique de 6.7 environ, conférant aux nanocristaux une charge négative dans le gel (de pH 8.1). Lorsque les nanocristaux sont couplés à EcoRV, leur migration est fortement ralentie. Ceci est cohérent pour des NC-EcoRV : au pH du gel, EcoRV est chargée positivement (sa structure primaire permet d'estimer son point isoélectrique à environ 9), de sorte que les nanocristaux couplés ont une charge moins négative et une taille plus élevée que les nanocristaux commerciaux ; ces deux facteurs doivent donc freiner la migration. L'observation réalisée est donc cohérente avec un couplage NC-EcoRV réussi.

Coupage de l'ADN : comme le montre la figure 3.5, la mise en présence d'ADN λ , qui contient 21 séquences-cibles pour EcoRV, avec les NC-EcoRV conduit au clivage de cet ADN. Ceci prouve donc que les échantillons NC-EcoRV produits ont conservé une activité catalytique. Le clivage est observable même si l'échantillon d'enzymes couplées est purifié avant d'être mis en présence de l'ADN, ce qui exclut la possibilité que le clivage soit le fait d'enzymes non couplées aux nanocristaux. Au cours de ces tests, nous avons également observé que les concentrations en NC-EcoRV nécessaires à une coupure totale de l'ADN étaient supérieures à celles en enzymes libres. Ceci est normal, la diffusion des NC-EcoRV étant ralentie par rapport à celle des enzymes libres.

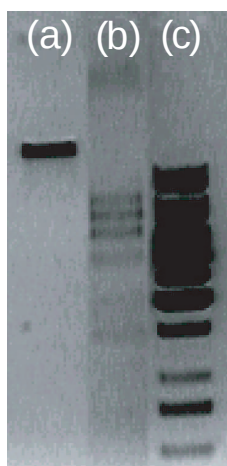


FIG. 3.5 – Vérification de l'activité catalytique des NC-EcoRV sur l'ADN λ . (a) témoin : ADN λ seul (100 ng), (b) ADN λ (100 ng) + $5 \cdot 10^{-13}$ mol de NC-EcoRV (échantillon fabriqué avec un ratio de 8 EcoRV/NC), (c) marqueur de taille (Fermentas). Gel d'agarose 0.8 % réalisé après une digestion d'1 h à 37°C dans le tampon recommandé par New England Biolabs.

b) Fixation sur billes recouvertes d'héparine

L'héparine est un polymère chargé dont la structure ressemble à celle de l'ADN. Les protéines capables de se lier à l'ADN peuvent également se fixer à l'héparine ; cette fixation est durable à basse salinité. Pour cette raison, l'héparine est très utilisée pour la purification de protéines capables de se lier à l'ADN. L'expérience montre que les nanocristaux des échantillons couplés se lient à l'héparine, alors que ce n'est pas le cas pour les nanocristaux qui n'ont pas été mis en présence d'enzymes biotinylées (figure 3.6). Ce résultat fournit un nouvel indice du fait que les NC-EcoRV ont conservé leur activité biologique.

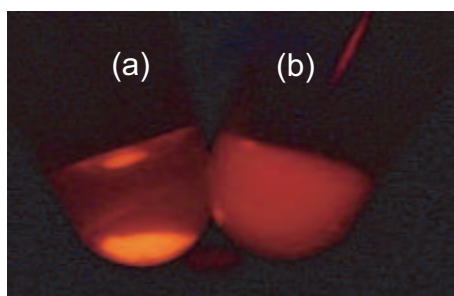


FIG. 3.6 – Interaction des nanocristaux avec des billes recouvertes d'héparine : (a) les NC-EcoRV s'accrochent aux billes, (b) les nanocristaux seuls restent en solution.

3.2 Observation expérimentale de l'interaction de NC-EcoRV avec des molécules d'ADN de T7 étirées

3.2.1 Choix de l'ADN utilisé et de son mode de détection

3.2.1.1 Choix de l'ADN du bactériophage T7

Notre expérience ayant pour objectif d'observer les interactions non spécifiques entre EcoRV et l'ADN, nous avons décidé d'utiliser un ADN dénué de cibles pour cette enzyme. L'ADN λ utilisé pour développer la technique d'étirement a donc été exclu, car il possède 21 séquences-cibles pour EcoRV. D'autre part, nous souhaitons utiliser un ADN suffisamment long (quelques dizaines de kb) pour assurer une fréquence d'association EcoRV-ADN élevée. Après analyse des longueurs et des séquences des ADN commercialement disponibles, seul l'ADN du bactériophage T7 a satisfait simultanément aux deux contraintes ci-dessus : cet ADN a une taille de 39 937 pb, sans aucune séquence-cible pour EcoRV.

3.2. INTERACTION DES NC-ECORV AVEC L'ADN DE T7

3.2.1.2 Détection de l'ADN par le SYBR Gold

Meng et al. ont montré en 1996 que la présence d'intercalants le long des molécules d'ADN affecte l'activité des enzymes de restriction, alors que le marquage de l'ADN avec des fluorophores qui se lient au petit sillon de l'ADN est sans effet sur l'activité de la plupart des enzymes de restriction testées [78]. Pour cette raison, nous avons choisi pour détecter l'ADN le SYBR Gold (Molecular Probes), un fluorophore qui s'insère dans le petit sillon des molécules d'ADN [96]. Tout comme le YOYO-1, ce fluorophore est beaucoup plus fluorescent lorsqu'il est lié à l'ADN qu'en solution ; il présente également l'inconvénient d'entraîner des coupures de l'ADN suite à son photoblanchiment.

Le protocole de couplage de nanocristaux aux extrémités des molécules d'ADN constituerait une excellente méthode de détection. L'utilisation de cette technique nécessite cependant quelques modifications par rapport au protocole décrit précédemment, et notamment son adaptation aux molécules étirées plutôt que peignées. Ces améliorations, en cours de réalisation au laboratoire, sont exposées dans la partie 3.4 de ce chapitre.

3.2.2 Choix des conditions d'interaction

Le principe de notre expérience consiste à introduire des NC-EcoRV dans une cavité à écoulement où des molécules d'ADN de T7 ont été préalablement étirées. Les conditions de cette expérience ont dû être optimisées afin d'éviter toutes les interactions indésirables : entre les nanocristaux et la surface, entre l'ADN et la surface, et entre les nanocristaux et l'ADN.

3.2.2.1 Traitement des surfaces

Au cours du chapitre précédent, nous avons montré comment un traitement des surfaces reposant sur l'adsorption de caséine permettait de réduire fortement l'adsorption des nanocristaux streptavidine. Expérimentalement, nous avons observé que ce traitement est également efficace pour éviter l'adsorption des NC-EcoRV.

3.2.2.2 pH d'interaction

La charge des nanocristaux utilisés est essentiellement due aux streptavidines présentes à leur surface, dont le point isoélectrique est situé entre 6.5 et 7.0. Travailler à ce pH permet donc de minimiser leur charge. En travaillant à un pH éloigné de ce point isoélectrique, la charge des nanocristaux peut perturber l'interaction des NC-EcoRV avec l'ADN. Nous avons par exemple observé à pH 5.5 une interaction attractive importante des nanocristaux avec l'ADN, en l'absence d'EcoRV à la surface des nanocristaux ; ce comportement est très vraisemblablement dû à une interaction électrostatique entre la streptavidine des nanocristaux (chargée positivement à ce pH) et l'ADN (chargé négativement). Il faut noter que le pH n'est pas un paramètre critique pour l'interaction d'EcoRV avec l'ADN

		6.5	7	pH
		→		
charge de la streptavidine	+	quasi-neutre	-	
comportement de l'ADN étiré	adsorption non spécifique	configuration en "arche"	décrochage	

FIG. 3.7 – Critères conduisant au choix d'un pH d'interaction de 6.8.

non spécifique : Engler et al. ont montré que la constante d'association d'enzymes EcoRV sauvages à des oligonucléotides ne contenant pas sa séquence-cible était indépendante du pH, du moins dans la gamme 6.0-7.0 [47].

La gamme de pH 6.5-7.0 est également optimale pour la stabilité des molécules d'ADN étirées au-dessus de surfaces recouvertes de caséine, dont le point isoélectrique est proche de 4.7 : nous avons observé qu'aux pH inférieurs à 6.5 les molécules étirées tendent à s'adsorber non spécifiquement sur ces surfaces, et qu'aux pH supérieurs à 7.0 elles se décrochent des surfaces. Ce comportement résulte très probablement des interactions électrostatiques répulsives entre l'ADN et la caséine, dont la force augmente avec le pH puisque les charges négatives de l'ADN et de la caséine s'accroissent. Le fait que la transition n'ait pas lieu au point isoélectrique de la caséine provient sans doute du fait que l'interaction n'est pas uniquement électrostatique.

Ces deux critères, résumés sur la figure 3.7, nous ont conduit à travailler à un pH égal à 6.8.

3.2.2.3 Concentration des NC-EcoRV

La fréquence des événements d'association de NC-EcoRV à une molécule d'ADN étirée est d'autant plus grande que leur concentration est élevée. Cependant, pour une détection en épifluorescence, les concentrations élevées de nanocristaux créent un fond lumineux qui diminue la qualité de détection d'un NC-EcoRV en interaction avec l'ADN ; ce problème peut être résolu par l'utilisation d'une onde évanescente pour l'excitation des nanocristaux. Cependant, l'utilisation de NC-EcoRV à des concentrations supérieures à 1 nM a une seconde conséquence plus gênante : des spots très lumineux sont alors observés sur les molécules étirées. Ces spots ne se dissocient en général pas des molécules d'ADN. Il pourrait s'agir d'agrégats de NC-EcoRV qui interagissent avec l'ADN par plusieurs enzymes. Après quelques essais, nous avons conclu que la concentration optimale en NC-EcoRV était de l'ordre de 0.25 à 0.5 nM. En effet, la fréquence des événements d'association est satisfaisante dans ce cas (typiquement un événement par minute et par molécule étirée) alors que la présence d'agrégats "permanents" sur l'ADN est rare. Dans cette gamme de concentrations, l'utilisation d'une onde

3.2. INTERACTION DES NC-ECORV AVEC L'ADN DE T7

évanescence n'est plus une nécessité absolue.

3.2.3 Films expérimentaux

Le principe de nos expériences consiste à étirer des molécules d'ADN de T7, puis à les mettre en présence de NC-EcoRV dans une solution de composition contrôlée. Une fois ceci réalisé, la lame est explorée pour trouver une molécule d'ADN étirée. Une image de l'ADN est enregistrée, puis nous changeons le jeu de filtres utilisé, de manière à détecter cette fois les NC-EcoRV ; un film est alors réalisé. Lorsque la molécule d'ADN casse, la lame est explorée à nouveau, dans le but de trouver une autre molécule et de recommencer la même procédure.

Sur les films réalisés, on observe fréquemment des événements d'association de NC-EcoRV à l'ADN ; les nanocristaux restent sur l'ADN pendant une durée de l'ordre de la seconde puis s'en dissocient (figure 3.8). Afin de vérifier que ces

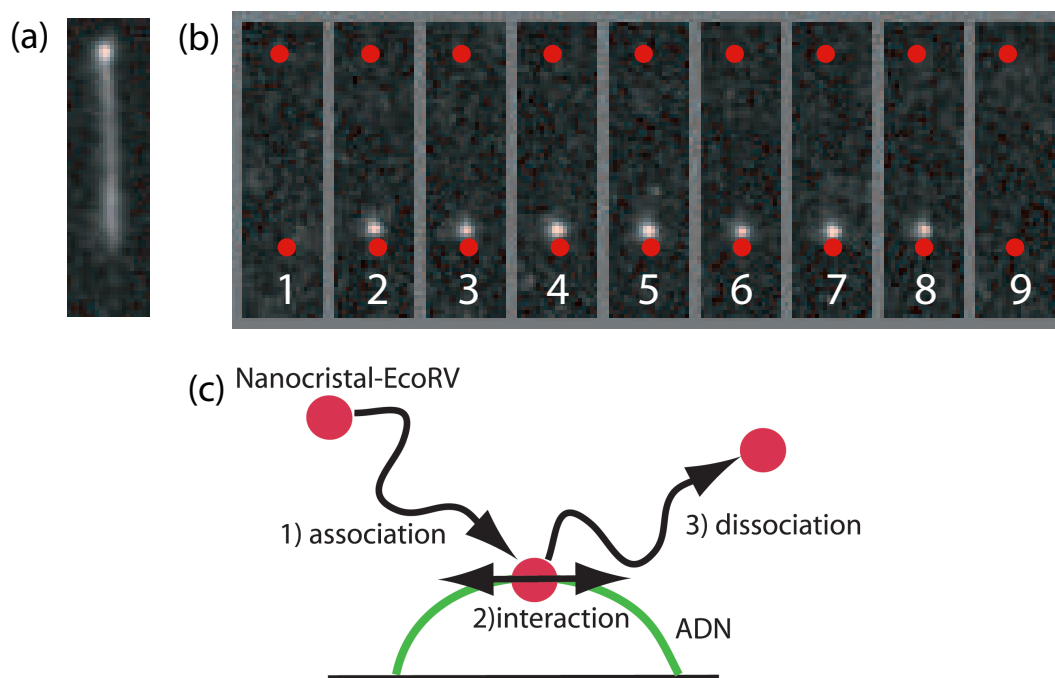


FIG. 3.8 – Association d'un NC-EcoRV à l'ADN : (a) image d'une molécule d'ADN étirée marquée au SYBR Gold (longueur apparente : environ $10\ \mu\text{m}$), (b) extraits d'un film réalisé sur la même zone, qui montre l'association entre les images 1 et 2 d'un NC-EcoRV à la molécule d'ADN, puis sa dissociation entre les images 8 et 9, après environ 2 s. Les points rouges indiquent la position des extrémités de la molécule d'ADN. La durée entre chaque image est 200 ms. (c) Représentation schématique de l'événement observé.

événements sont bien dus à la présence d'EcoRV à la surface des nanocristaux, une expérience témoin a été réalisée avec des nanocristaux seuls, dans les mêmes

conditions expérimentales. Aucune interaction des nanocristaux avec l'ADN n'a pu être observée, même à en augmentant à 1 nM la concentration en nanocristaux.

Nous avons exploré trois conditions de salinités différentes, afin de tester l'influence de ce paramètre sur l'interactions des NC-EcoRV avec l'ADN.

- 66 événements du type de celui présenté sur la figure 3.8 ont été observés sur l'ensemble des expériences réalisées à 25 mM NaCl.
- 83 événements ont été observés à 50 mM NaCl.
- 117 événements ont été observés à 75 mM NaCl.

3.2.4 Matériel et méthodes

3.2.4.1 Interaction des NC-EcoRV avec l'ADN

Le tampon d'interaction auquel nous ferons référence par la suite est constitué de : PIPES 50 mM pH 6.8, EDTA 1 mM et NaCl (0 à 100 mM selon l'expérience). 1 μ g d'ADN de T7 (Biocentric) est couplé à 10^{-4} μ l de solution commerciale de SYBR Gold (Molecular Probes) dans 10 μ l de MES 50 mM pH 5.5 EDTA 1 mM pendant au moins 10 minutes. Dans chaque expérience, 2 μ l de cette solution sont utilisés ; l'étirement de l'ADN dans une cavité à écoulement a lieu suivant le protocole décrit dans le chapitre précédent. La cavité est ensuite rincée avec 1 ml de tampon d'interaction, de manière à remonter le pH à 6.8. 200 μ l d'une solution 0.15 % de Blocking Reagent (Roche) diluée dans le tampon d'interaction sont ensuite faits circuler dans la cavité. 100 μ l de NC-EcoRV sont dilués à la concentration désirée dans du tampon d'interaction complété avec 0.03 % de Blocking Reagent et 10^{-5} μ l de SYBR Gold (en général l'ADN est difficile à distinguer à ce niveau de l'expérience, car le SYBR Gold tend à s'en détacher au cours des étapes précédentes).

3.2.4.2 Réalisation des films expérimentaux

Les filtres (Omegafilters) utilisés pour la détection du SYBR Gold sont : excitation : 475AF40, dichroïque : 505DRLP et émission : 535AF45, et pour les nanocristaux : excitation : 525AF45, dichroïque : 560DRLP et émission : 595AF60 ; pour les filtres d'excitation/d'émission, le premier chiffre désigne la longueur d'onde (en nm) et le second la largeur du filtre (aussi en nm). Nous aurions pu conserver le filtre d'excitation utilisé pour l'excitation du SYBR Gold (475AF40) afin d'exciter les nanocristaux, mais cela aurait conduit à une photodestruction plus rapide des molécules d'ADN. La fluorescence du SYBR Gold et des nanocristaux est collectée à l'aide d'un objectif à immersion à huile (ouverture numérique 1.4, X100) ; les images sont formées sur une camera intensifiée Pentamax (Roper).

Chaque fois qu'une molécule d'ADN étirée est repérée, une image en est prise (temps d'exposition 200 ms). Puis, après changement du jeu de filtres, un film de quelques minutes est réalisé sur la même zone pour observer le mouvement des nanocristaux au voisinage de cette molécule d'ADN (temps d'exposition : 10 à 50

3.2. INTERACTION DES NC-ECORV AVEC L'ADN DE T7

ms selon les expériences).

3.2.4.3 Programme d'analyse

Nous avons utilisé un programme Matlab écrit par Maxime Dahan. L'utilisateur pointe le spot qui l'intéresse sur l'image du film correspondant à la première image de la trajectoire à analyser. Sur chaque image de celle-ci, le programme réalise une interpolation gaussienne à deux dimensions de la position du spot. Les critères de recherche (distance maximale entre positions successives, amplitude minimale du spot acceptées...) sont définis par l'utilisateur. A l'issue de l'analyse par le programme Matlab, on dispose de la trajectoire des spots pendant leur interaction avec l'ADN.

3.2.4.4 Estimation de la résolution spatiale

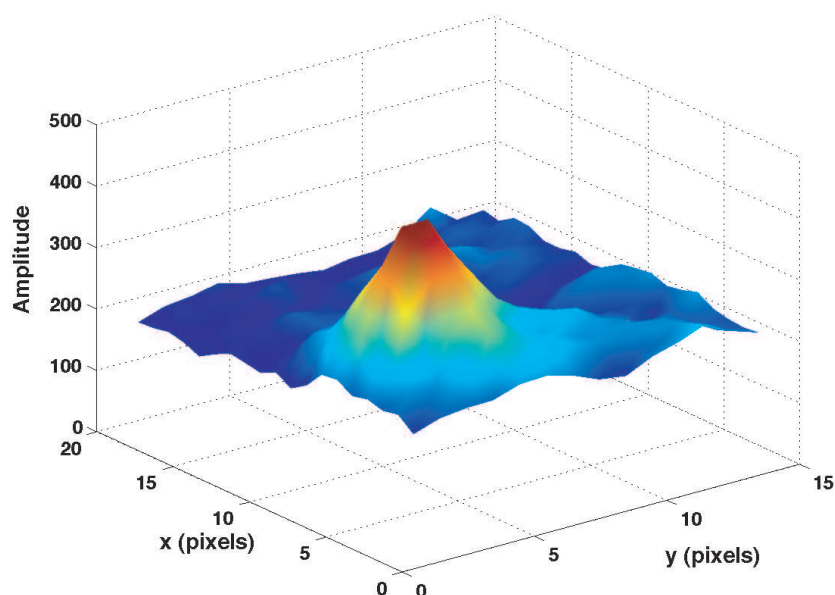


FIG. 3.9 – Détection d'un nanocristal adsorbé sur la surface (1 pixel=72 nm), avec un temps d'exposition de 20 ms.

Sur les films expérimentaux réalisés, quelques spots sont parfois adsorbés de manière permanente sur la surface; ces spots clignotent, ce qui indique qu'ils correspondent généralement à des nanocristaux individuels. Comme le montre la figure 3.9, la présence de ces spots peut être détectée sans ambiguïté. Nous avons utilisé ces spots immobiles pour estimer la résolution spatiale avec laquelle sont détectés les nanocristaux dans nos conditions expérimentales (temps d'exposition de 20 ms, caméra intensifiée Pentamax, surfaces de polystyrène). Comme

nous allons l'illustrer dans les deux paragraphes suivants, la résolution spatiale a d'abord été estimée directement à partir de la position de ces spots fixes, donnée par le programme. La valeur obtenue a ensuite été comparée au résultat d'un calcul prenant en compte les différentes sources d'incertitude sur la localisation des spots.

a) Mesure directe de la résolution spatiale

Une trajectoire typique calculée par le programme à partir d'un spot adsorbé sur la surface est représentée sur la figure 3.10. Sur cette trajectoire, comme pour la plupart des spots fixes analysés, l'écart-type sur la position mesurée est de l'ordre de 10 à 15 nm sur chaque axe. Il s'agit d'une résolution moyenne : la précision dépend de l'intensité émise par le nanocristal sur chaque image, qui est variable à cause du clignotement des nanocristaux. Lorsque le nanocristal est partiellement "éteint" au cours de la durée d'exposition, il est détecté avec une précision moins bonne que lorsqu'il reste dans un état "allumé" pendant toute cette durée. Si on limite l'analyse à des fragments de films où l'amplitude des spots calculée par le programme d'analyse est la plus élevée, on obtient cette fois une résolution spatiale de 8 nm environ.

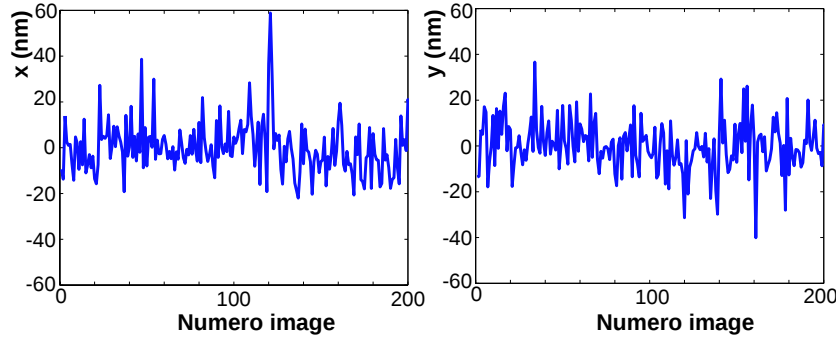


FIG. 3.10 – Positions (abscisse et ordonnées normalisées) successives d'un NC-EcoRV adsorbé à la surface, calculées par le programme d'analyse (film de 200 images réalisées avec un temps d'exposition de 20 ms). L'intensité du spot varie d'une image à l'autre à cause du clignotement du spot, mais est toujours suffisante pour que le programme parvienne à déterminer la position du spot sur l'ensemble des 200 images.

b) Estimation de la résolution spatiale utilisant un modèle optique

Thompson et al. ont calculé l'écart-type σ sur la position d'un fluorophore immobile mesurée par un système optique de caractéristiques données [97] :

$$\sigma = \sqrt{\left(\frac{s^2}{N} + \frac{a^2/12}{N} + \frac{8\pi s^4 b^2}{a^2 N^2} \right)}, \quad (3.1)$$

3.2. INTERACTION DES NC-ECORV AVEC L'ADN DE T7

où N est le nombre de photons collectés en provenance du fluorophore considéré, ou plus généralement l'amplitude du signal correspondant à un fluorophore, s caractérise l'écart-type de la réponse impulsionnelle du système optique (c'est-à-dire l'image par le système optique d'un objet ponctuel), a est la taille correspondant à un pixel sur la caméra, et b représente l'écart-type du fond lumineux. Ce résultat montre que l'incertitude sur la position d'un spot a trois origines :

- le bruit de photons et la résolution optique du microscope (premier terme)
- la taille finie des pixels utilisés pour la détection (second terme)
- le bruit de fond, lié à l'auto fluorescence des surfaces observées et au bruit associé à la caméra utilisée.

En utilisant une image sur laquelle l'amplitude des spots est maximale, comme la figure 3.9, on peut estimer $N \simeq 2000$ et $b \simeq 20$. Ces valeurs ne représentent pas directement un nombre de photons, car nous utilisons une caméra intensifiée. Par ailleurs, dans nos conditions optiques on a $s \simeq 1.22\lambda/6NA \simeq 90$ nm (s représente l'écart-type des distributions gaussiennes par lesquelles la position des spots est interpolée, que la formule précédente relie au rayon d'Airy) pour un nanocrystal 605 [83] et $a=72$ nm pour les films utilisés dans cette analyse. On obtient les valeurs suivantes :

- L'incertitude liée au bruit de photons est d'environ 2 nm. Ce résultat est valable pour une source poissonnienne de photons, ce qui n'est pas a priori le cas pour les nanocristaux. Néanmoins, en l'absence de statistique simple, et puisque le bruit de photons n'est pas l'incertitude dominante, nous nous contentons de cette estimation, sans doute basse.
- L'incertitude liée à la taille finie des pixels est d'environ 0.5 nm.
- L'incertitude liée au bruit de fond est d'environ 7 nm.

L'incertitude totale est donc de l'ordre de 8 nm. Cette estimation est cohérente avec le résultat de nos mesures présenté ci-dessus.

En conclusion, l'incertitude sur la position des nanocristaux est essentiellement due au bruit de fond dans nos expériences. La résolution spatiale obtenue est en définitive de l'ordre de la dizaine de nanomètres pour un temps d'exposition de 20 ms.

c) Nanocristaux en mouvement

Diffusion en solution : les nanocristaux diffusent en solution avec un coefficient de diffusion $D = k_B T / 3\pi\eta d$. La viscosité de l'eau est $\eta = 10^{-3}$ Pa.s et le diamètre des nanocristaux est environ $d \simeq 25$ nm, il en résulte donc un coefficient de diffusion $D \simeq 30 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Ceci signifie que pendant un temps d'exposition $t_{\text{exp}}=20$ ms, les nanocristaux qui diffusent en solution explorent une zone de rayon $\sqrt{\langle x^2 \rangle} = \sqrt{2Dt_{\text{exp}}} \simeq 1 \mu\text{m}$. Cette valeur est supérieure au rayon de l'image d'un nanocrystal immobile, donnée par le rayon d'Airy $0.61\lambda/NA \simeq 260$ nm. La taille des spots de nanocristaux est donc nettement élargie s'ils diffusent. Les photons émis sont alors répartis sur un nombre de pixels environ dix fois plus grand, rendant la détection des nanocristaux plus difficile. Néanmoins de

tels spots sont parfois observables lorsqu'ils diffusent au voisinage de la surface.

NC-EcoRV sur l'ADN Lorsqu'un NC-EcoRV est lié à l'ADN, il bouge beaucoup moins vite que par diffusion tridimensionnelle. Comme nous le verrons, les coefficients de diffusion associés au sliding sont de 3 à 4 ordres de grandeurs inférieurs au coefficient en solution, et les fluctuations transverses d'une molécule de T7 étirée à 75% ont une amplitude de quelques dizaines de nanomètres et un temps de corrélation de l'ordre du temps d'exposition.

Le déplacement d'un NC-EcoRV lié à l'ADN pendant $t_{\text{exp}}=20$ ms est donc de l'ordre de la dizaine de nanomètres. Ce déplacement élargit donc légèrement le spot associé sur chaque image. La résolution spatiale associée à la détection de ces spots n'est pas sensiblement dégradée par rapport à celle mesurée dans le cas des spots fixes (10 nm environ).

3.3 Résultats

Les films réalisés contiennent plusieurs informations sur l'interaction des NC-EcoRV avec l'ADN.

- Une première information simple à extraire est la distribution des temps d'interaction des NC-EcoRV avec l'ADN. Nous discuterons l'ordre de grandeur de ces temps d'interaction, ainsi que leur variation en fonction des conditions salines et leur implication biologique.
- Nous montrerons également qu'une étude statistique portant sur le "déplacement quadratique moyen" des NC-EcoRV permet de mettre en évidence leur mouvement par rapport à l'ADN. Le coefficient de diffusion associé aux phases de sliding sera estimé.
- Ces études permettent de mesurer la longueur moyenne explorée par un NC-EcoRV pendant un événement d'association avec l'ADN. Nous présenterons une modélisation qui permet de prédire la valeur de ce paramètre pour une enzyme non couplée.

3.3.1 Durées d'interaction des NC-EcoRV avec l'ADN

3.3.1.1 Méthode d'analyse

Le temps d'interaction d'un NC-EcoRV avec l'ADN est mesuré entre la première apparition du spot sur l'ADN et la dernière image du film où on aperçoit ce spot sur l'ADN, même si entre ces deux limites le spot "clignote". Dans cette analyse, nous n'avons considéré que les temps d'interaction compris entre 50 ms et 10 s. En effet, certains spots demeurent sur l'ADN plusieurs minutes, voire indéfiniment. Ces spots sont probablement des NC-EcoRV ou des agrégats de NC-EcoRV qui interagissent avec l'ADN *via* plusieurs enzymes. C'est pourquoi l'analyse a été réduite aux spots interagissant moins de 10 s avec l'ADN. Par ailleurs, afin de ne pas considérer les spots "survolant" seulement les molécules d'ADN lors de la

3.3. RÉSULTATS

diffusion en solution, seuls les spots colocalisés plus de 50 ms avec les molécules d'ADN ont été pris en compte.

3.3.1.2 Résultats

Les distributions obtenues dans chacune des trois conditions salines testées sont représentées sur la figure 3.11, sur laquelle figurent également les cumulatives associées. Ces cumulatives donnent, pour une durée donnée, le nombre d'événements de durées inférieures, et évitent ainsi le regroupement de valeurs (binning) inhérent à la construction d'histogrammes.

- A 50 mM NaCl, la distribution des temps d'interaction est très bien interpolée par une distribution exponentielle avec un temps $\tau=0.7$ s (83 événements analysés).

- A 75 mM NaCl, la distribution obtenue est très bien interpolée par une distribution exponentielle à condition de ne pas considérer les points correspondant à des temps d'interaction supérieurs à 2 s (voir la figure 3.11); on obtient alors un temps $\tau=0.4$ s (117 événements analysés). En effet, dans cette condition de salinité, la condition énoncée ci-dessus (ne considérer que les temps d'interaction inférieurs à 10 s) n'est sans doute pas suffisante pour éliminer les spots ne correspondant pas à l'interaction d'un NC-EcoRV unique *via* une seule enzyme.

- A 25 mM NaCl (66 événements analysés), l'interpolation de la distribution obtenue avec une distribution exponentielle donne un temps $\tau=2.1$ s mais est moins satisfaisante. Nous pensons que la principale raison à cette divergence est qu'aux faibles salinités EcoRV a davantage tendance à s'agréger, de sorte qu'une partie importante des NC-EcoRV observés au cours de cette expérience ne correspondent sans doute pas à un NC-EcoRV individuel.

Remarque : les temps d'interaction mesurés sont légèrement affectés par le clignotement des nanocristaux et le hopping des NC-EcoRV. En effet, le clignotement des nanocristaux conduit à une sous-estimation du temps d'interaction pour les spots qui s'associent ou se dissocient de l'ADN dans un état noir. Par ailleurs, comme nous allons le voir, une partie des NC-EcoRV analysés se réassocient à l'ADN après leur dissociation. L'amplitude de tels sauts est parfois trop faible pour permettre leur détection. Ceci conduit donc à considérer parfois comme un unique événement d'interaction une succession de plusieurs événements d'association/dissociation. Cela conduit à une surestimation des temps d'interaction mesurés sur de telles trajectoires.

3.3.1.3 Discussion

a) Distribution et ordre de grandeur des temps d'interaction

La modélisation la plus simple pour rendre compte de la cinétique d'association/dissociation d'EcoRV à un fragment d'ADN non spécifique est un modèle à deux états :



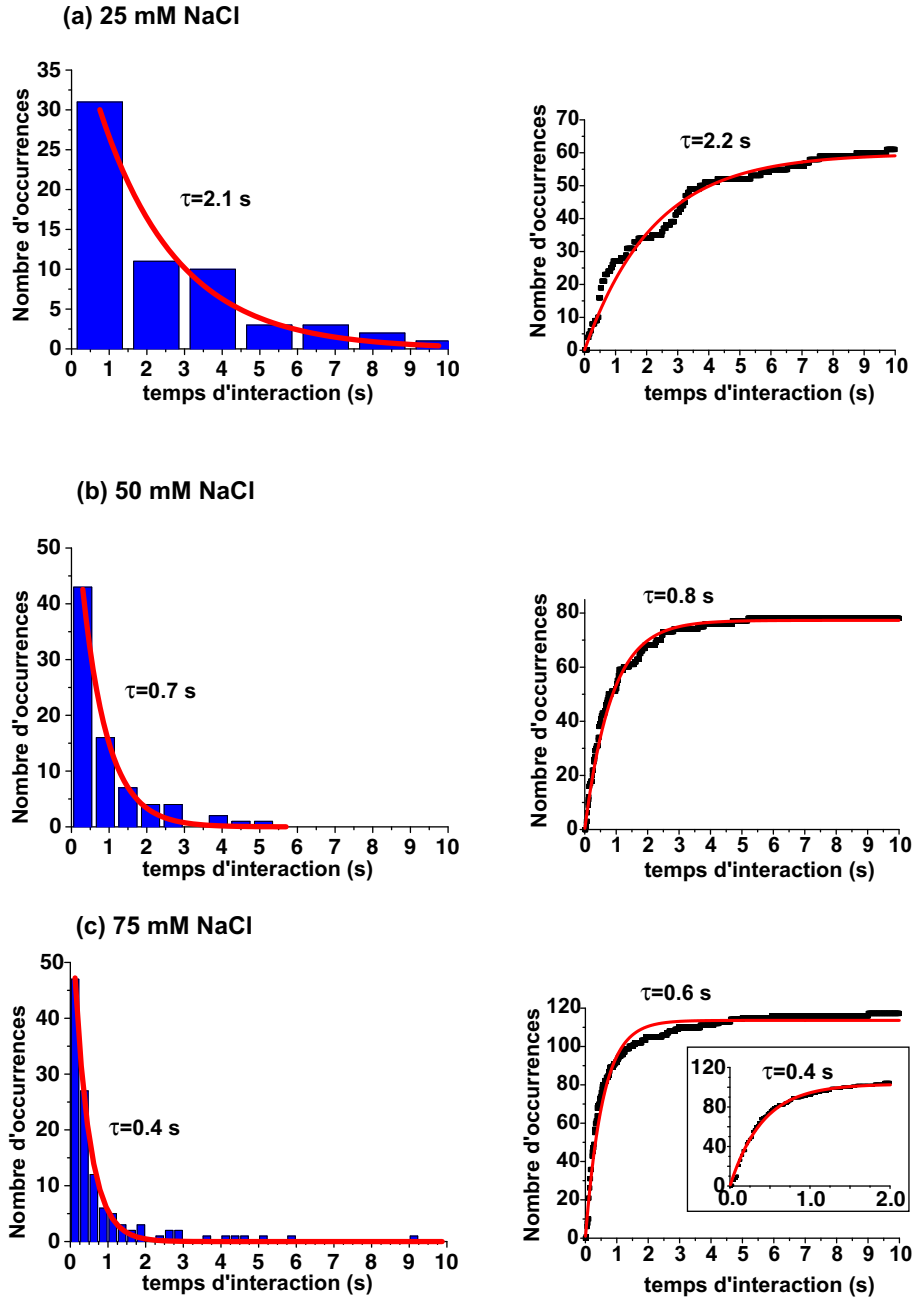


FIG. 3.11 – Histogrammes et cumulatives des temps d'interaction NC-EcoRV/ADN à (a) 25 mM NaCl, (b) 50 mM NaCl et (c) 75 mM NaCl. Dans chaque cas, une interpolation correspondant à une distribution exponentielle des temps d'interaction est présentée, ainsi que le temps résultant. La courbe encadrée pour la distribution cumulative à 75 mM correspond à une analyse limitée arbitrairement aux événements d'interaction dont la durée est inférieure à 2 s.

L'association est caractérisée par une constante k_a (en $M^{-1}.s^{-1}$) telle que $d[E - ADN]/dt = k_a[E][ADN]$, et la dissociation est caractérisée par la constante k_d

3.3. RÉSULTATS

telle que $d[E - ADN]/dt = -k_d[E - ADN]$ Ce modèle prévoit donc une distribution exponentielle des temps d'interaction avec l'ADN non spécifique, avec un temps caractéristique de $1/k_d$. Les distributions expérimentales, bien interpolées par des exponentielles, sont donc en accord avec ce modèle.

En raison de leur difficulté, peu d'études biochimiques ont été consacrées à la dissociation d'enzymes de restriction de fragments d'ADN non spécifique. Certains groupes sont cependant parvenus à estimer, de manière peu précise, la valeur de k_d dans différentes conditions.

- Erskine et al. ont étudié la cinétique de dissociation d'EcoRV à l'aide d'une méthode de blocage rapide par flux ("Quench-Flow") [98]. Ils ont obtenu la valeur $k_d=1.2 \text{ s}^{-1}$ pour la dissociation d'EcoRV d'un plasmide de 3658 pb auquel elle était liée non spécifiquement, en présence de 100 mM NaCl et 10 mM Mg^{2+} .
- En utilisant une méthode voisine baptisée "stopped-flow fluorescence", Alves et al. ont mesuré une borne supérieure $k_d=14 \text{ s}^{-1}$ pour la dissociation d'EcoRI d'un oligonucléotide non spécifique de 13 pb, en présence de 50 mM NaCl et 10 mM Mg^{2+} [99].

Ces études fournissent une idée de l'ordre de grandeur attendu pour les temps de d'interaction EcoRV-ADN. Cependant, les conditions de ces expériences diffèrent de nos propres expériences, effectuées avec des enzymes EcoRV couplées à des nanocristaux, en l'absence de Mg^{2+} et à des concentrations de 25 à 75 mM de NaCl. De plus, la dissociation d'une molécule étirée est vraisemblablement plus rapide que celle estimée pour un plasmide en solution, car le temps mesuré dans ce dernier cas mesure la dissociation du domaine d'ADN et peut cumuler plusieurs événements d'association/dissociation, et d'autre part les enzymes n'interagissent pas de manière identique avec des oligonucléotides ou avec des ADN plasmidiques (contrairement aux oligonucléotides, les plasmides sont entourés par une atmosphère de contre-ions ; le lecteur désireux de précisions supplémentaires pourra se reporter à la référence [98]).

b) Effet de NaCl

Nos résultats expérimentaux (figure 3.12) montrent que la durée de l'interaction des NC-EcoRV avec l'ADN diminue lorsque la concentration en NaCl augmente. Ce résultat était attendu : la présence de sel réduit la portée des interactions électrostatiques entre EcoRV et l'ADN et diminue donc leur affinité.

c) Implication biologique

Nos expériences ont montré qu'un NC-EcoRV restait lié à l'ADN pendant environ 1 s avant de s'en dissocier. En supposant que l'ordre de grandeur de la durée d'interaction d'une enzyme EcoRV non couplée avec l'ADN est du même ordre de grandeur, et que pendant cette durée l'enzyme ne diffuse pas le long de l'ADN, le temps moyen mis par une enzyme pour localiser sa séquence-cible sur un ADN de plusieurs milliers de bases serait donc de l'ordre de l'heure, en supposant que l'enzyme se réassocie rapidement à l'ADN après chaque dissociation. Cette durée

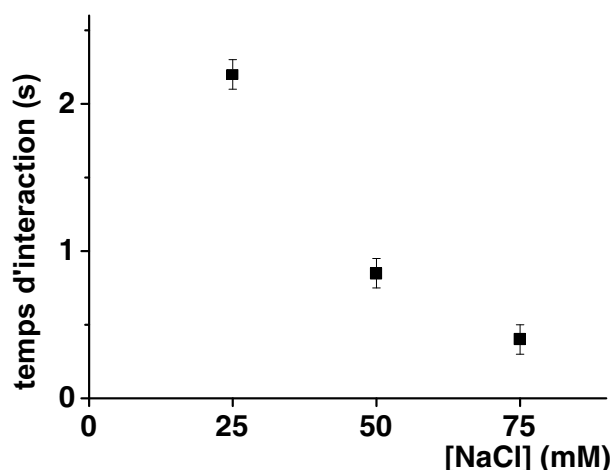


FIG. 3.12 – Temps moyens d’interaction mesurés dans les 3 conditions testées (25, 50 et 75 mM NaCl).

est très supérieure à celle que l’on obtiendrait par une diffusion 3D pure, sans interaction avec l’ADN non spécifique. Elle est de plus incompatible avec la constante d’association d’EcoRV à sa séquence-cible sur un plasmide d’environ 4 kb, $k_a \simeq 10^8 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$, mesurée par Erskine et al. à partir d’études cinétiques [98].

En effet, comme $d[E - ADN]/dt = k_a[E][ADN]$, cette valeur implique qu’en présence de 10 nM de cibles, le temps nécessaire à une enzyme pour localiser sa séquence-cible est de l’ordre de 1 s. Les longues durées d’interaction NC-EcoRV/ADN mesurées constituent donc un premier indice, suggérant l’existence d’un mouvement d’EcoRV sur l’ADN pendant la durée de l’interaction, de manière à explorer plus d’une paire de bases. La partie suivante de ce chapitre montre comment l’analyse des trajectoires des NC-EcoRV au cours de leur interaction avec les molécules d’ADN permet de prouver directement l’existence d’un mouvement des NC-EcoRV le long de l’ADN.

3.3.2 Mise en évidence du mouvement des NC-EcoRV le long de l’ADN

L’analyse des films expérimentaux doit tenir compte des deux origines distinctes du mouvement des NC-EcoRV le long de l’ADN : un mouvement fluctuant résultant de celui des molécules étirées, et un mouvement de diffusion le long de l’ADN. Dans cette partie, nous allons tout d’abord caractériser le mouvement fluctuant puis montrer comment le calcul du déplacement quadratique moyen permet de séparer ces deux contributions.

3.3. RÉSULTATS

3.3.2.1 Modélisation du mouvement thermique d'un point d'une molécule d'ADN étirée

Au cours du chapitre précédent, nous avons décrit un modèle billes-ressorts permettant de décrire le mouvement thermique du contour des molécules d'ADN, la grandeur qui était mesurable expérimentalement. Ce modèle peut être simplifié si l'on veut décrire non plus le contour des molécules d'ADN, mais seulement le mouvement d'un point de cette molécule. Le mouvement peut alors être décrit grâce à un modèle comportant trois billes, dont deux fixes aux extrémités de l'ADN.

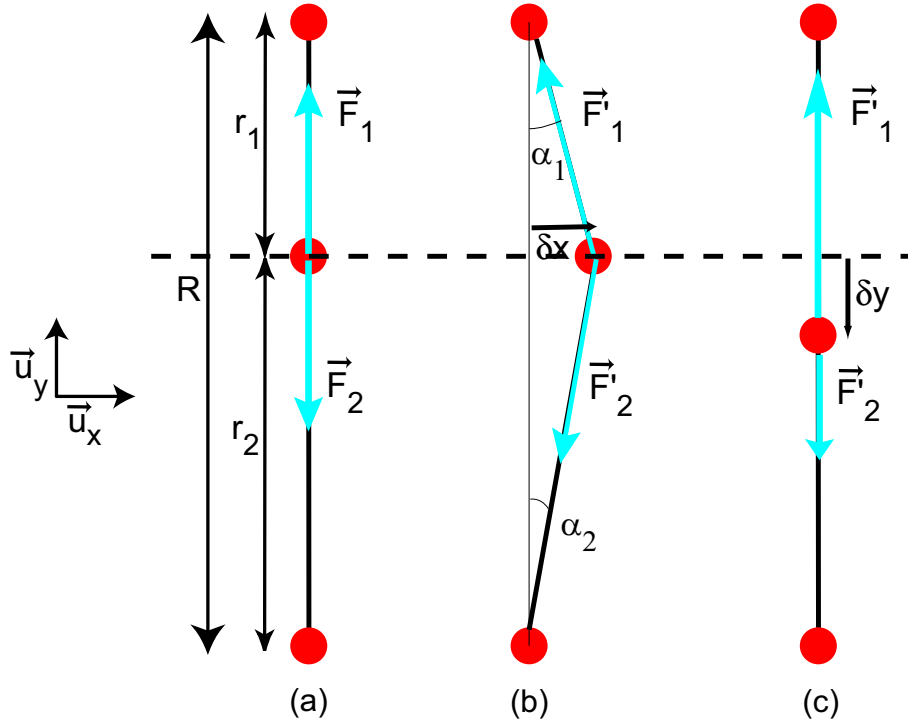


FIG. 3.13 – Bille sur une molécule d'ADN étirée : (a) équilibre, (b) mouvement transverse et (c) mouvement longitudinal.

a) Raideurs transverse et longitudinale

Considérons une molécule d'ADN étirée dont la longueur de contour est L , et dont la distance séparant les extrémités est R . Un point donné de cette molécule est repéré par une bille située à une distance r_1 de la première extrémité et r_2 de la seconde (figure 3.13). On note l_1 et l_2 les longueurs de contour associées aux longueurs apparentes r_1 et r_2 ($l_1 + l_2 = L$). A l'équilibre, $r_1/l_1 = r_2/l_2 = R/L$, $F_1 = F_2 = F(R/L)$ et $\mathbf{F}_1 + \mathbf{F}_2 = \mathbf{0}$. Calculons les forces de rappel associées à de petits déplacements suivant les directions longitudinale et transverse.

Force de rappel transverse : un déplacement δx selon $\mathbf{u}_x$ génère une force $\mathbf{F}_\perp$ donnée par :

$$\mathbf{F}_\perp = \mathbf{F}'_1 + \mathbf{F}'_2 = -(F'_1 \sin \alpha_1 + F'_2 \sin \alpha_2) \mathbf{u}_x + (F'_1 \cos \alpha_1 - F'_2 \cos \alpha_2) \mathbf{u}_y. \quad (3.3)$$

Un développement limité à l'ordre le plus bas en δx donne

$$\mathbf{F}_\perp = -\frac{F(R/L)}{R/L} \left(\frac{1}{l_1} + \frac{1}{l_2} \right) \delta x \mathbf{u}_x, \quad (3.4)$$

qui est de la forme de la forme $-k_\perp \delta x \mathbf{u}_x$. Le mouvement transverse est donc caractérisé par une raideur

$$k_\perp = \frac{F(R/L)}{R/L} \left(\frac{1}{l_1} + \frac{1}{l_2} \right), \quad (3.5)$$

qui dépend de la position du point considéré sur la molécule considérée et du taux d'étirement global de celle-ci.

Force de rappel longitudinale : un déplacement δy selon $\mathbf{u}_y$ génère une force $\mathbf{F}_\parallel$ donnée par :

$$\mathbf{F}_\parallel = \left(\frac{1}{l_1} + \frac{1}{l_2} \right) dF(R/L)/d(R/L) \delta y \mathbf{u}_y. \quad (3.6)$$

Le mouvement longitudinal est donc caractérisé par la raideur

$$k_\parallel = \frac{dF(R/L)}{d(R/L)} (1/l_1 + 1/l_2). \quad (3.7)$$

Comme dans le chapitre précédent, en raison des approximations linéaires effectuées, les résultats obtenus sont d'autant plus proches de la réalité que le taux d'étirement est élevé. La force totale qui s'exerce sur la bille s'écrit finalement :

$$\mathbf{F} = k_\perp \delta x \mathbf{u}_x + k_\parallel \delta y \mathbf{u}_y. \quad (3.8)$$

b) Mouvement au cours du temps

Le mouvement de la bille considérée est décrit par l'équation de Langevin :

$$\zeta \mathbf{v} = \mathbf{F} + \mathbf{L}, \quad (3.9)$$

où ζ est le coefficient de friction de la bille, $\mathbf{v}$ la vitesse de la bille, $\mathbf{F}$ la force de rappel élastique ci-dessus et $\mathbf{L}$ la force d'agitation de Langevin. Dans le cas où $\mathbf{F}$ est associée à une élasticité linéaire sur chaque axe, la projection de cette équation sur les directions transverse et longitudinale amène deux équations indépendantes : $\zeta_x dx/dt = k_\perp x + L_x$, $\zeta_y dy/dt = k_\parallel y + L_y$, où x et y sont les coordonnées transverse et longitudinale de la bille, mesurées par rapport à sa position d'équilibre. Les distributions des variables x et y sont alors gaussiennes :

3.3. RÉSULTATS

$$P(x) = A_x e^{-\frac{k_{\perp} x^2}{2k_B T}}, \quad P(y) = B_y e^{-\frac{k_{//} y^2}{2k_B T}}, \quad (3.10)$$

où A_x et A_y sont des constantes de normalisation. De plus, comme on l'a vu dans le chapitre précédent, les équations du mouvement conduisent à des fonctions d'autocorrélation :

$$\langle x(t + \tau)x(t) \rangle = \frac{k_B T}{k_{\perp}} e^{-\tau/\tau_{\perp}}, \quad \langle y(t + \tau)y(t) \rangle = \frac{k_B T}{k_{//}} e^{-\tau/\tau_{//}}, \quad (3.11)$$

avec $\tau_{\perp} = \zeta_{\perp}/k_{\perp}$ et $\tau_{//} = \zeta_{//}/k_{//}$. L'utilisation de la force $F(R/L)$ donnée par le modèle du ver permet d'obtenir les valeurs numériques de $k_{\perp}$ (proportionnelle à $F(R/L)/(R/L)$) et $k_{//}$ (proportionnelle à $dF(R/L)/d(R/L)$) en fonction du taux d'étirement des molécules d'ADN. Du point de vue hydrodynamique, on adopte la même approche que dans le chapitre précédent : on prend pour les molécules d'ADN le coefficient de friction correspondant à une molécule étirée à 100 %. Le calcul de Doi et Edwards montre que les coefficients de friction transverse et longitudinal diffèrent alors d'un facteur 2 : $\zeta_{\perp} = 4\pi\eta L_0/\ln(L_0/D)$ et $\zeta = \zeta_{\perp}/2$ [72].

Aux faibles taux d'étirement les amplitudes des mouvements transverse et longitudinal sont similaires, en revanche, comme le montre la figure 3.14, le mouvement est principalement transverse pour les molécules fortement étirées. Dans tous les cas, ces deux mouvements sont indépendants.

L'amplitude maximale du mouvement longitudinal, au milieu d'une molécule d'ADN T7 entière, est $\sqrt{\langle y^2 \rangle} \simeq 100$ nm (respectivement 50 nm) pour un taux d'étirement de 0.7 (respectivement 0.8). Ces longueurs correspondent environ à 400 (respectivement 200) pb d'ADN étiré. Le temps de corrélation du mouvement longitudinal est de 20 ms (respectivement 5 ms) pour un taux d'étirement de 0.7 (respectivement 0.8). Il s'agit d'un ordre de grandeur, car la présence de la surface peut modifier légèrement ces temps, comme on l'a vu dans le chapitre précédent.

3.3.2.2 Une grandeur appropriée pour l'analyse : le déplacement quadratique moyen

Le mouvement de diffusion des NC-EcoRV le long de l'ADN n'a pas nécessairement une amplitude plus grande que celle du mouvement dû au mouvement thermique des molécules d'ADN. Il peut donc paraître à première vue difficile de distinguer ces deux processus. Cependant, les fluctuations thermiques de l'ADN sont caractérisées par un temps de corrélation transverse/longitudinal, de l'ordre de 10-100 ms, petit devant la durée totale des films expérimentaux, alors que les mouvements diffusifs n'ont pas de temps d'évolution caractéristique. Comme nous allons le voir, cette différence peut être exploitée pour séparer les deux mouvements, en calculant et en analysant la dépendance temporelle du déplacement quadratique moyen.

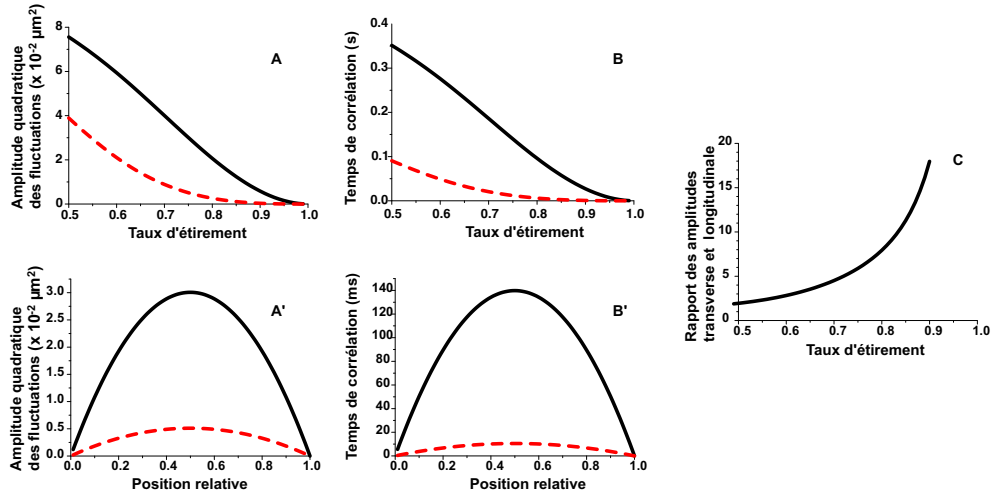


FIG. 3.14 – Amplitude quadratique (A et A') et temps de corrélation (B et B') des mouvements transverse (ligne pleine) et longitudinal (pointillés) en fonction du taux d'étirement et de la position relative sur l'ADN. En A et B, les amplitudes et les temps de corrélation sont évaluées au milieu d'une molécule de T7. En A' et B', ils sont évaluées pour une molécule de T7 étirée à 75%. Le graphe C représente la rapport des amplitudes quadratiques transverse et longitudinale en fonction du taux d'étirement.

Le déplacement quadratique moyen d'une grandeur $x(t)$ est défini par :

$$g(\tau) = \langle (x(t + \tau) - x(t))^2 \rangle, \quad (3.12)$$

où $\langle \rangle$ désigne la moyenne temporelle. Soustraire à x sa valeur moyenne ne change pas la valeur de g . On supposera donc dans la suite que $\langle x \rangle = 0$. Dans un premier temps, nous allons évaluer g pour les trois types de mouvements qui se présentent dans nos expériences : un spot immobile sur une surface, un spot fixe sur une molécule étirée et un mouvement de diffusion.

a) Calcul du déplacement quadratique moyen dans le cas d'un spot immobile

En supposant que $x(t)$ et $x(t + \tau)$ sont des variables aléatoires indépendantes de variance σ^2 due au processus de mesure de leur position, il vient :

$$g(\tau) = 2\sigma^2, \quad (3.13)$$

pour $\tau \neq 0$ car $\langle x(t) \rangle = \langle x(t + \tau) \rangle = \langle x^2 \rangle = 0$ et $\langle x(t)x(t + \tau) \rangle = 0$. Pour des spots détectés avec une précision de 10 nm, on attend donc que $g(\tau)$ soit constante au cours du temps et de l'ordre de $2 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2$.

Expérimentalement, ces prédictions peuvent être directement vérifiées sur les spots fixes adsorbés sur la surface : le déplacement quadratique moyen est approximativement constant au cours du temps, et sa valeur moyenne est dans l'intervalle prévu (figure 3.15).

3.3. RÉSULTATS

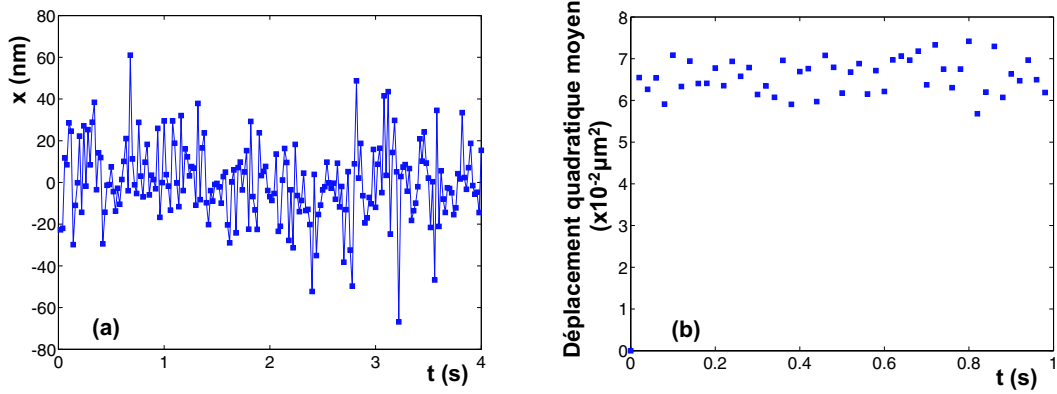


FIG. 3.15 – (a) Position suivant l’axe x et (b) déplacement quadratique moyen d’un spot fixe ; le film analysé contient 200 images.

b) Calcul du déplacement quadratique moyen dans le cas d’un spot fixe sur une molécule d’ADN étirée

Dans ce cas, le mouvement transverse (longitudinal) d’un point d’une molécule d’ADN a une fonction d’autocorrélation de la forme $\langle x(t)x(t+\tau) \rangle = X^2 e^{-\tau/\tau_x}$ ($\langle y(t)y(t+\tau) \rangle = Y^2 e^{-\tau/\tau_y}$), où X^2 (Y^2) désigne l’amplitude quadratique moyenne des fluctuations transverses (longitudinales) et τ_x (τ_y) leur temps de corrélation. Il vient alors :

$$g_x(\tau) = 2X^2(1 - e^{-\tau/\tau_x}), \quad g_y(\tau) = 2Y^2(1 - e^{-\tau/\tau_y}). \quad (3.14)$$

Le mouvement longitudinal d’un point d’une molécule étirée à 70 % a une amplitude Y approximativement égale à $10^{-2} \mu\text{m}^2$. Il en résulte une valeur aux temps longs d’environ $2 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2$ pour g . Dans nos expériences, la valeur du temps de corrélation des fluctuations τ_y est proche de celle du temps d’exposition utilisé (10 à 50 ms selon les expériences). Il est donc difficile de mettre en évidence la phase de croissance de g vers sa valeur limite.

c) Calcul du déplacement quadratique moyen dans le cas d’un mouvement diffusif pur

En utilisant la définition même du coefficient de diffusion D , on obtient dans le cas d’un mouvement de diffusion unidimensionnelle :

$$g(\tau) = 2D\tau. \quad (3.15)$$

d) Combinaison de mouvements indépendants

Supposons que la position y puisse s’écrire comme la somme de deux variables indépendantes : $y = y_1 + y_2$. Alors $g(\tau) = \langle (y(t+\tau) - y(t))^2 \rangle = \langle (y_1(t+\tau) - y_1(t))^2 \rangle + \langle (y_2(t+\tau) - y_2(t))^2 \rangle = g_1(\tau) + g_2(\tau)$; en effet les termes croisés en $\langle y_1 y_2 \rangle$ sont nuls car y_1 et y_2 sont deux variables indépendantes et de moyenne nulle.

Dans nos expériences, les fluctuations longitudinales et la diffusion le long des molécules d'ADN ne sont en toute rigueur pas indépendantes : la diffusion change la position des enzymes sur les molécules étirées et affecte donc l'amplitude et le temps caractéristique de leur mouvement de fluctuations longitudinales. Cependant, cet effet peut être négligé car la distance sur laquelle les enzymes diffusent au cours d'un événement d'interaction avec l'ADN est petite comparée à la longueur totale des molécules d'ADN étirées. Le déplacement quadratique moyen pour un mouvement combinant fluctuations et diffusion est donc de la forme :

$$g(\tau) = \sigma^2 + 2D\tau. \quad (3.16)$$

3.3.2.3 Résultats

a) Sélection des films considérés

Les erreurs statistiques sur le calcul du déplacement quadratique moyen, dont l'estimation est proposée dans l'annexe 3.4.2.1, sont d'autant plus importantes que les fragments de films utilisés pour le calcul sont courts. Nous avons donc restreint l'analyse aux fragments de plus de 30 images. D'autre part, il est très important que la trajectoire des spots considérés ne comporte pas de "discontinuité". En effet, de telles "discontinuités", qui résultent soit de sauts réels des NC-EcoRV, soit d'un changement du spot suivi par le programme, causent une variation du déplacement quadratique moyen qui s'ajoute à celle résultant de la diffusion unidimensionnelle.

Pour illustrer cette assertion, évaluons le déplacement quadratique moyen $g(n) = \langle (x(k+n) - x(k))^2 \rangle$ pour une trajectoire de N images telle que $x = x_1$ pendant la première moitié du film et $x = x_2 \neq x_1$ pendant la seconde moitié. Un calcul très simple conduit à : $g(0) = 0$ et $g(n) = (x_2 - x_1)^2 n/(N - n)$ pour $n < N/2$. $g(n)$ varie donc de manière quasi-linéaire dans le domaine $n \ll N$, comme dans le cas d'un mouvement diffusif.

Nous avons donc soigneusement considéré chaque trajectoire expérimentale avant de calculer le déplacement quadratique associé. Lorsqu'une trajectoire nous a semblé présenter un tel saut, nous avons analysé séparément les fragments de trajectoire avant et après le saut. De plus, nous n'avons travaillé que sur des morceaux de films exempts de clignotement. En effet, il n'est pas possible de déterminer avec certitude si les variations de position avant et après les phases de clignotement sont liées au sliding ou à un saut.

En conclusion, l'analyse des films expérimentaux a été menée sur des fragments de films dont la longueur est supérieure à 30 images, exempts de clignotement et sur lesquels la trajectoire des spots considérés ne présentait pas de discontinuité apparente. Une trajectoire typique est donnée sur la figure 3.16 (obtenue par l'analyse de 180 images consécutives d'un film expérimental réalisé avec un temps d'exposition de 47 ms, à 25 mM NaCl).

3.3. RÉSULTATS

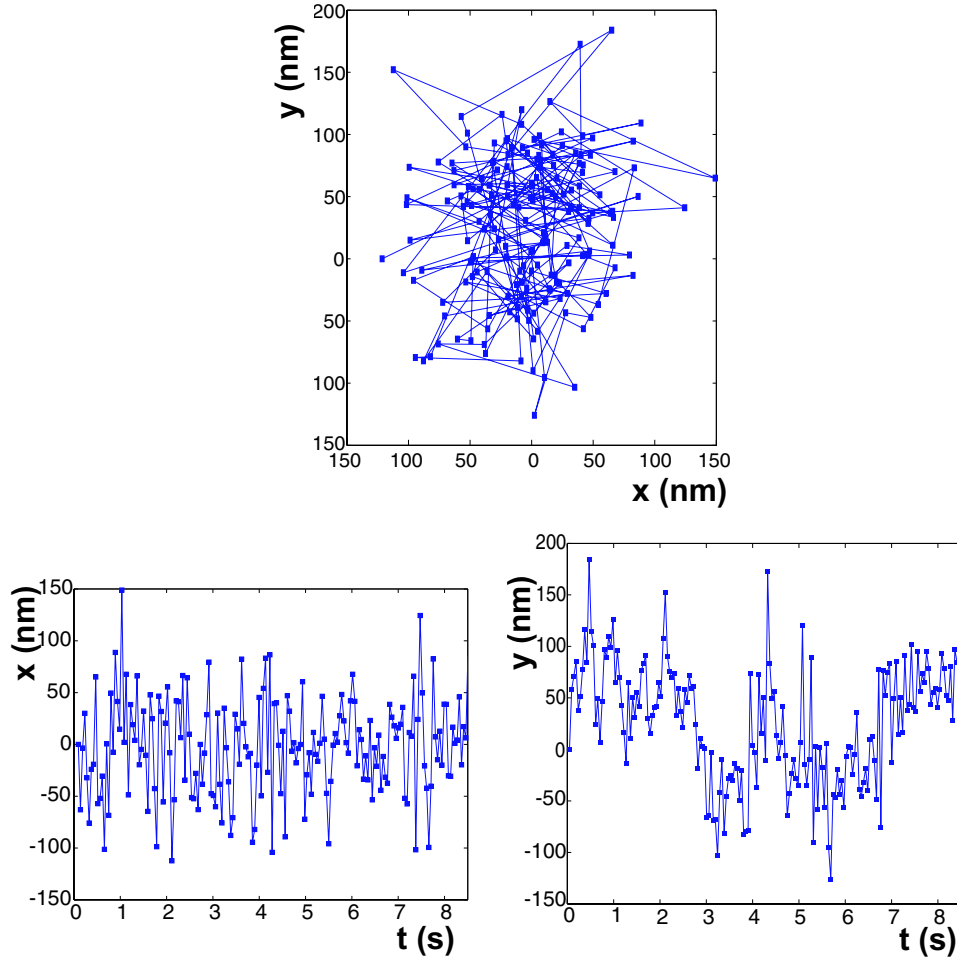


FIG. 3.16 – Position d'un spot pendant sa phase d'interaction avec l'ADN (l'ADN étiré est orienté selon la direction y).

b) Distribution de la coordonnée transverse

Un premier test de l'adéquation des résultats expérimentaux avec les prédictions de notre modèle consiste à analyser la distribution de la coordonnée transverse sur l'ensemble du film analysé. Le mouvement transverse n'est dû qu'aux fluctuations thermiques de l'ADN ; le modèle décrit plus haut prédit une distribution gaussienne pour x . Expérimentalement, c'est bien le cas, comme le montre la figure 3.17. Il est difficile de comparer systématiquement la largeur de la gaussienne obtenue au modèle, car on ne connaît pas avec certitude la taille des molécules étirées.

c) Déplacement quadratique moyen selon les directions transverse et longitudinale

Les déplacements quadratiques moyens selon les directions transverse et longitudinale, obtenus à partir de la trajectoire expérimentale ci-dessus, et leurs

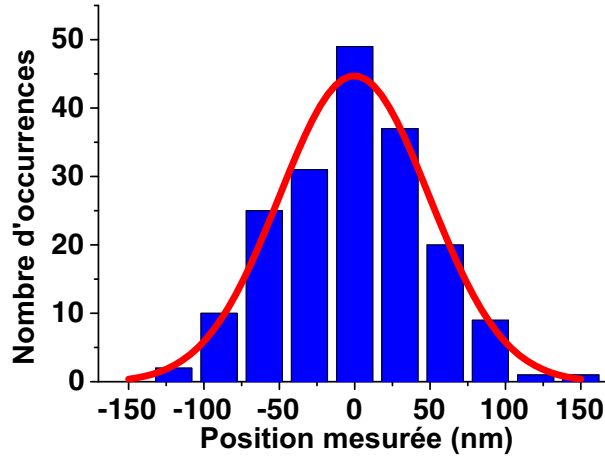


FIG. 3.17 – Distribution de la coordonnée transverse (normalisée) sur l'ensemble du film et interpolation par une distribution gaussienne (trait plein).

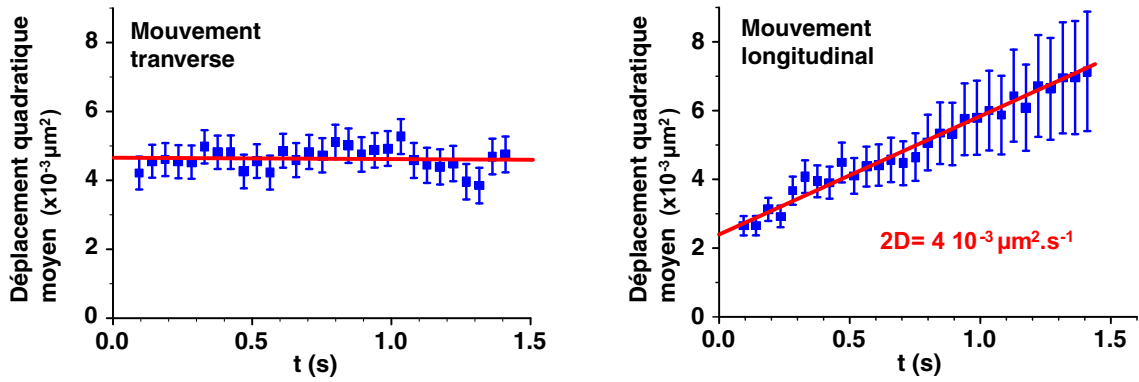


FIG. 3.18 – Déplacement quadratique moyen dans les directions transverse et longitudinale (30 premiers points).

interpolations linéaires sont représentés sur la figure 3.18.

Comparaison de la limite quand $\tau \rightarrow 0$ de $g(\tau)$ dans les directions transverse et longitudinale : sur cet exemple, comme pour la totalité des films réalisés, la limite de $g(\tau)$ quand $\tau \rightarrow 0$ est plus grande dans la direction transverse que dans la direction longitudinale, conformément aux prédictions du modèle (figure 3.14 C). Dans le cas de fluctuations d'amplitudes comparables à la précision de pointé des spots (dont la contribution à g est de l'ordre de $10^{-3} \mu\text{m}^2$), les valeurs transverse et longitudinale sont proches. C'est le cas par exemple sur la courbe présentée 3.18. En revanche, dans le cas de fluctuations d'amplitudes très supérieures à la précision de pointé des spots (nous avons arbitrairement sélectionné les films tels que $\lim_{\tau \rightarrow 0}(g) > 2 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2$ pour la direction transverse), le rapport des valeurs transverse et longitudinale vaut 6.1 ± 1.7 (8 films pris en

3.3. RÉSULTATS

compte). Ce rapport qui, rappelons-le, ne dépend que du taux d'étirement des molécules, correspond à un taux d'étirement de 75% (figure 3.14) en accord avec le taux estimé à partir de nos conditions expérimentales. Une nouvelle fois, les grandeurs expérimentales concernant les fluctuations thermiques de l'ADN sont donc en très bon accord avec le modèle développé.

Allure des courbes expérimentales : dans l'exemple présenté comme pour la plupart des films analysés, le déplacement quadratique moyen suivant la direction transverse est constant, alors que le déplacement quadratique moyen suivant la direction transverse croît linéairement en fonction du temps sur l'intervalle considéré, conformément à ce que l'on attend pour un mouvement de diffusion 1D le long de la molécule d'ADN. Il est alors possible d'extraire un coefficient de diffusion D à partir de cette courbe, le coefficient directeur du déplacement quadratique moyen étant égal à $2D$.

d) Coefficients de diffusion et longueurs explorées

A partir des films satisfaisant aux critères énumérés ci-dessus, nous avons calculé la dépendance temporelle du déplacement quadratique moyen. Pour le mouvement longitudinal, ce déplacement est bien ajusté par une droite dans la plupart des cas, comme sur la figure 3.18. Néanmoins, la qualité de l'ajustement et donc la précision avec laquelle est estimé D varient d'un film à l'autre. En effet, les erreurs statistiques sur le calcul du déplacement quadratique dépendent du nombre d'images analysées ainsi que de l'amplitude des fluctuations de l'ADN, paramètres qui peuvent varier d'une molécule à l'autre, comme cela est montré dans l'annexe insérée à la fin de ce chapitre.

Nous n'avons pas observé de différence significative dans la distribution des coefficients de diffusion obtenus à 25, 50 et 75 mM NaCl. Ceci n'est pas surprenant puisque les coefficients de diffusion sont probablement régis essentiellement par des paramètres hydrodynamiques [21]. La distribution globale obtenue en regroupant ces trois conditions (portant sur 34 fragments de trajectoire) est représentée sur la figure 3.19.

Cette distribution possède un pic marqué au voisinage de $10^{-3} \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, soit $(130 \text{ pb})^2.\text{s}^{-1}$ en supposant que toutes les molécules considérées étaient étirées à 75%.

La combinaison de cette valeur du coefficient D et de celles obtenues précédemment pour les temps d'interaction moyens t_{moy} permet d'estimer la distance moyenne L_{moy} explorée pendant un événement d'interaction avec l'ADN, *via* la relation $L_{\text{moy}}^2 = 2Dt_{\text{moy}}$.

- A 25 mM NaCl $t_{\text{moy}} \simeq 2.1 \text{ s}$ donc $L_{\text{moy}} \simeq \mathbf{260 \text{ pb}}$.
- A 50 mM NaCl $t_{\text{moy}} \simeq 0.7 \text{ s}$ donc $L_{\text{moy}} \simeq \mathbf{150 \text{ pb}}$.
- A 75 mM NaCl $t_{\text{moy}} \simeq 0.4 \text{ s}$ donc $L_{\text{moy}} \simeq \mathbf{120 \text{ pb}}$.

e) Sauts

Sur quelques films expérimentaux, nous avons observé un brusque "saut" des

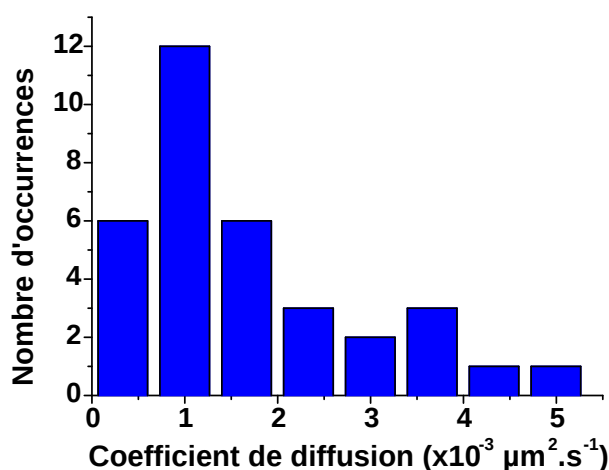


FIG. 3.19 – Distribution des coefficients de diffusion mesurés (toutes conditions salines confondues).

NC-EcoRV au cours de leur interaction avec l'ADN, détectable à la fois sur les films expérimentaux et sur les trajectoires calculées par le programme Matlab (figure 3.20). L'amplitude d'un tel mouvement est beaucoup trop importante pour être due au mouvement thermique de l'ADN ou à la diffusion de l'enzyme. Au vu des films expérimentaux, il est très peu probable que ce mouvement soit causé par le "croisement" de deux NC-EcoRV ; sur certains films, la diffusion du NC-EcoRV en solution pendant la phase de saut peut même être observée. La figure

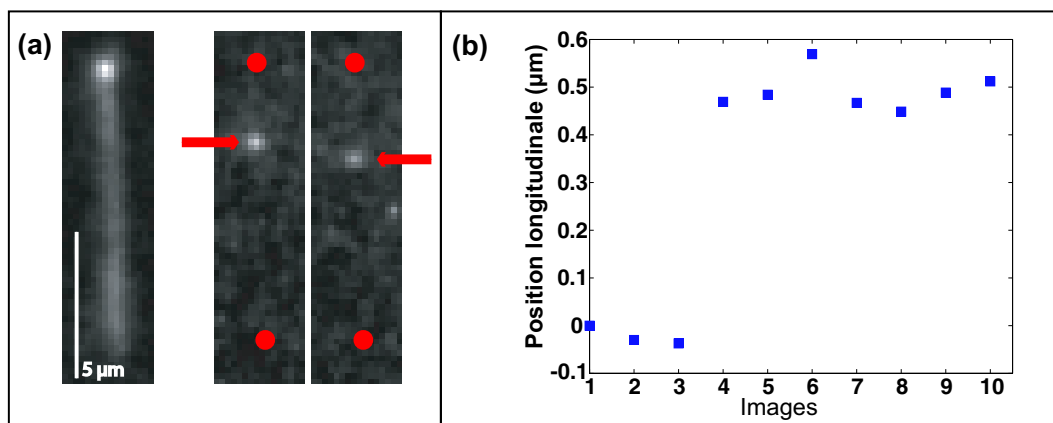


FIG. 3.20 – (a) Deux images consécutives d'un film illustrant le saut d'un NC-EcoRV (à gauche : image de la molécule d'ADN observée). (b) Position longitudinale du spot au voisinage du saut, calculée par le programme d'analyse ; les troisième et quatrième images sont celles montrées dans (a). Film réalisé à 25 mM NaCl, durée séparant deux images consécutives : 47 ms.

3.21 présente la distribution de la distance séparant les sites connectés par un saut

3.3. RÉSULTATS

de plus de 500 nm. Malgré le nombre restreint de sauts observés, la distribution obtenue en réunissant l'ensemble des sauts observés dans les différentes expériences est assez bien interpolée avec une loi de probabilité en $1/r$. Comme on l'a vu dans le premier chapitre de cette thèse, la probabilité d'atteindre une cible éloignée d'une distance r par diffusion tridimensionnelle pure est proportionnelle à $1/r$. La variation des conditions expérimentales utilisées influe potentiellement sur la fréquence des sauts, mais pas sur cette loi de probabilité en $1/r$, ce qui justifie le fait d'avoir regroupé sur un même histogramme les sauts observés dans des conditions salines différentes. Nous avons borné notre analyse aux sauts de plus de 500 nm, car il est difficile de détecter avec certitude les sauts d'amplitude plus faible. Il est toutefois possible d'estimer le nombre de tels sauts à partir de la loi de probabilité en $1/r$ ci-dessus. En effet, en écrivant $\int_{500 \text{ nm}}^{10 \text{ } \mu\text{m}} (A/r) dr = 18$ ($10 \text{ } \mu\text{m}$ représente la taille d'une molécule de T7 étirée), il vient $A \simeq 7$, de sorte que le nombre total de sauts d'amplitude supérieure à 1 nm est $\int_{1 \text{ nm}}^{10 \text{ } \mu\text{m}} (A/r) dr = 7 \ln(10^4) \simeq 60$.

Les sauts constituent un processus moins probable sur une molécule d'ADN étirée que sur une molécule en pelote, qui constitue une conformation d'ADN nettement plus dense. Le fait que malgré tout nous puissions occasionnellement observer de tels sauts dans nos expériences suggère que ce phénomène est très fréquent sur des molécules d'ADN en pelote, qui est la configuration habituelle des molécules d'ADN en solution.

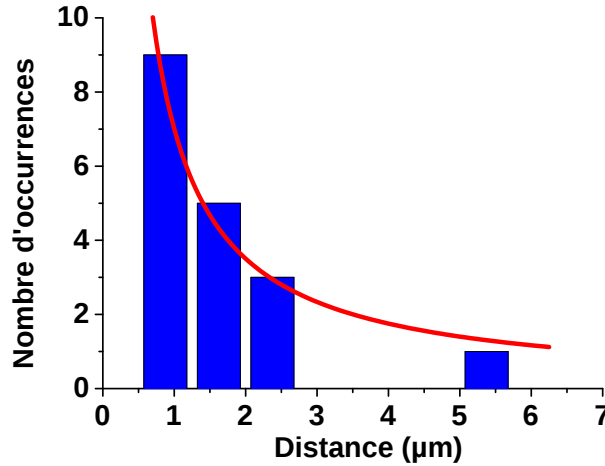


FIG. 3.21 – Distribution des distances séparant les sites avant et après les sauts ; trait plein : interpolation avec une loi de probabilité en $1/r$ (18 sauts de plus de 500 nm observés sur l'ensemble des expériences réalisées).

3.3.3 Discussion

3.3.3.1 Effet du couplage à un nanocristal sur les caractéristiques de la diffusion d'EcoRV

Au terme de ces expériences, il convient de se demander dans quelle mesure les résultats décrivant l'action des NC-EcoRV sur l'ADN sont valables pour des enzymes non couplées. Le couplage d'EcoRV à un nanocristal a potentiellement un certain nombre d'effets, que nous allons passer en revue.

a) Effets stériques et électrostatiques

Afin de limiter la gêne stérique liée à l'utilisation de nanocristaux (de taille supérieure à celle d'EcoRV), nous avons utilisé le mutant K58C. Celui-ci permet de former un complexe NC-EcoRV dont le ou les site(s) de liaison avec l'ADN sont situés à la périphérie du complexe et sont donc bien accessibles à l'ADN.

Pour limiter les effets électrostatiques, susceptibles de perturber l'interaction entre l'ADN et les enzymes, nous avons cherché à nous placer dans des conditions minimisant la charge électrique des nanocristaux. Pour cela, nous avons travaillé à un pH de 6.8 très proche du point isoélectrique de la streptavidine. A ce pH, il est probable que les nanocristaux conjugués à la streptavidine soient peu chargés. Nous avons en particulier vérifié que dans ces conditions, les nanocristaux interagissent peu avec les espèces chargées comme l'ADN ou les protéines utilisées pour la passivation des surfaces. En revanche, des interactions indésirables ont été observées à des pH différents.

b) Effet du ratio EcoRV/nanocristaux

La présence de plusieurs enzymes à la surface des nanocristaux, le ratio maximal d'EcoRV par nanocristal utilisé étant de 15, nous a permis de visualiser des événements d'association de NC-EcoRV sur l'ADN avec une fréquence satisfaisante, de l'ordre d'un événement par minute, ainsi que d'observer des processus de saut. Cependant, il n'était pas *a priori* exclu dans nos expériences qu'un NC-EcoRV individuel ait la possibilité d'interagir simultanément avec l'ADN par l'intermédiaire de plusieurs enzymes. Afin de vérifier l'implication éventuelle d'un tel processus, nous avons mené une expérience de contrôle avec un ratio EcoRV/nanocristal de 2 environ, à 50 mM NaCl. A ce ratio, il est très improbable qu'un NC-EcoRV puisse interagir avec l'ADN par deux enzymes simultanément. Nous avons observé dans ces conditions une fréquence plus faible pour les événements d'interaction que dans l'expérience effectuée à un ratio de 15 enzymes/nanocristal dans le mélange initial. En revanche, l'analyse quantitative des caractéristiques des événements d'interaction n'a pas révélé de variation significative des durées d'interaction et des coefficients de diffusion. Nous avons mesuré, à 50 mM NaCl, un temps d'interaction moyen d'environ 1 s (41 événements analysés) et un coefficient de diffusion de l'ordre de $10^{-3} \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ (5 événements analysés), résultats voisins de ceux obtenus avec un ratio de 15 enzymes/nanocristal (durée moyenne d'interaction de 0.7 s et coefficient de

3.3. RÉSULTATS

diffusion de l'ordre de $10^{-3} \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$).

c) Effet de la présence d'un nanocrystal sur la diffusion d'EcoRV

La présence d'un nanocrystal lié à EcoRV affecte sans doute la diffusion de cette enzyme le long des molécules d'ADN. Dans ce paragraphe, nous examinons les effets liés à la taille des NC-EcoRV, qui est sensiblement supérieure à celle des enzymes non couplées. Afin d'évaluer l'effet de ce paramètre sur les caractéristiques de la diffusion d'EcoRV, nous avons tout d'abord utilisé un modèle très simple pour décrire la liaison ADN-enzyme et prévoir l'effet de la taille de l'enzyme sur sa durée d'association à l'ADN. Nous avons ensuite utilisé le modèle développé par Schurr [21], qui relie le coefficient de diffusion d'une protéine sur l'ADN à sa taille. Ce n'est sans doute pas la seule approche possible pour interpréter nos résultats. Nous discuterons en particulier la validité des hypothèses de cette étude à la fin de ce paragraphe.

Rayons hydrodynamiques d'EcoRV et des NC-EcoRV : pour évaluer le rayon hydrodynamique d'EcoRV, nous nous appuyons sur une étude de Arrio-Dupont et al., qui ont mesuré le rayon hydrodynamique de protéines globulaires de masses moléculaires variables [28]. Selon cette étude, une protéine de masse moléculaire 60 kD comme EcoRV a un rayon hydrodynamique de 6 à 7 nm. Par ailleurs, le rayon hydrodynamique de nanocristaux bioconjugués a été mesuré par diffusion de lumière [100, 101]. Pour des nanocristaux-streptavidine, il est de l'ordre de 15 nm. Le rayon hydrodynamique des nanocristaux-EcoRV a sans doute une valeur légèrement supérieure, qui dépend du nombre d'enzymes par nanocrystal. Nous allons supposer que sa valeur est comprise entre 15 et 20 nm. Le rapport des rayons hydrodynamiques d'un NC-EcoRV et d'une enzyme a donc une valeur comprise entre 2 et 3.

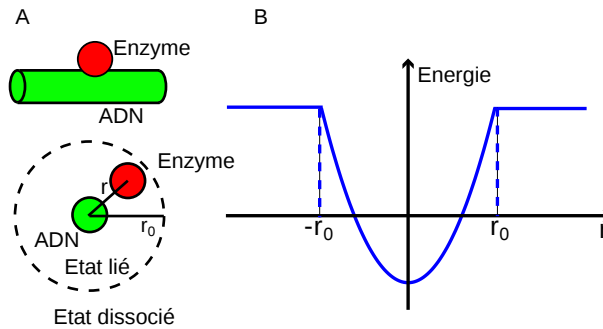


FIG. 3.22 – Modèle utilisé pour déterminer la durée d'interaction d'une enzyme avec l'ADN en fonction de sa taille. (A) Une enzyme liée à une molécule d'ADN peut se déplacer dans une petite zone autour des molécules d'ADN. (B) L'enzyme voit un potentiel harmonique et se dissocie de l'ADN lorsque la distance enzyme/ADN atteint r_0 .

Effet sur les temps d'interaction : pour estimer cet effet, il convient de modéliser la liaison ADN-enzyme. Par commodité, cette liaison est assimilée à un potentiel harmonique de raideur k autour de la molécule d'ADN, dont l'enzyme se dissocie lorsqu'elle atteint une distance r_0 (de l'ordre du nanomètre) du centre du potentiel. Comme le montre le calcul effectué dans l'annexe insérée à la fin de ce chapitre, l'augmentation de la taille de la particule diffusant dans le potentiel conduit à un ralentissement de sa dynamique et donc à un allongement de sa durée de résidence dans le potentiel. Plus précisément, ce calcul indique que le temps nécessaire à la dissociation d'une enzyme piégée dans un potentiel harmonique est proportionnel à son rayon hydrodynamique R_h . Dans ce modèle, EcoRV interagirait donc avec l'ADN pendant une durée moyenne 2 à 3 fois inférieure à celle mesurée pour les NC-EcoRV. Nous sommes conscients que ce modèle décrit la réalité de manière très simplifiée ; il aide néanmoins à comprendre l'effet d'une variation de taille sur la durée d'interaction des protéines avec l'ADN.

Effet sur le coefficient de diffusion : pour rendre compte de l'effet de la taille des protéines sur leur coefficient de diffusion, nous utilisons le modèle développé par Schurr [21]. Ce modèle suppose que le sliding des protéines a lieu selon le grand sillon de l'ADN, leur trajectoire étant donc hélicoïdale. Il suppose également que les protéines conservent la même orientation par rapport à la double-hélice d'ADN tout au long du mouvement. Enfin, il prend en compte la friction hydrodynamique qui s'exerce sur les protéines, mais néglige les éventuels frottements entre les protéines et l'ADN. En utilisant ce modèle, Schurr a obtenu pour le coefficient de diffusion d'une protéine le long de l'ADN la valeur $D = k_B T / f_{\text{eff}}$, où f_{eff} désigne le coefficient de friction d'une protéine de rayon hydrodynamique R_h au cours d'un mouvement hélicoïdal autour de l'ADN. Il est donné par :

$$f_{\text{eff}} = 6\pi\eta R_h [1 + 4/3(2\pi)^2 (R_h/3.4 \text{ nm})^2], \quad (3.17)$$

où η est la viscosité de l'eau ($10^{-3} \text{ Pa.s}^{-1}$) et où 3.4 nm est la longueur correspondant à un tour sur la double-hélice d'ADN. Le premier terme représente la friction associée à la composante translationnelle du mouvement, et le second traduit la friction causée par sa composante rotationnelle. Pour des objets de rayon hydrodynamique supérieur au nanomètre, le terme de translation est négligeable devant le terme rotationnel :

$$f_{\text{eff}} \simeq 32\pi^3 \eta R_h^3 / (3.4 \text{ nm})^2. \quad (3.18)$$

Dans le modèle de Schurr, le coefficient de diffusion varie donc comme R_h^{-3} . On attend donc pour une enzyme libre un coefficient de diffusion de 8 à 27 fois supérieur à celui d'un NC-EcoRV. A partir du coefficient de diffusion mesuré pour les nanocristaux-EcoRV, proche de $10^{-3} \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, on attend donc un coefficient de diffusion D compris entre $8 \cdot 10^{-3}$ et $27 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$.

Effet sur les longueurs d'ADN explorées : la longueur explorée en une durée t au cours d'un processus de diffusion caractérisé par un coefficient D

3.3. RÉSULTATS

est de l'ordre de $\sqrt{2Dt}$. Selon les modélisations précédentes, cette longueur est donc proportionnelle à R_h . Or, selon nos résultats expérimentaux, les NC-EcoRV explorent en moyenne 260 paires de bases au cours de leur mouvement sur l'ADN (à 25 mM NaCl), ce qui permet de prédire pour les enzymes non couplées une exploration moyenne entre 500 et 1000 pb par événement d'interaction, à 25 mM NaCl. Ces valeurs sont en bon accord avec celles estimées à l'aide d'expériences de biochimie, qui prédisent un sliding sur une longueur maximale d'environ 1 kb, dans des conditions proches des nôtres [39].

Rappelons néanmoins que nos résultats ont été obtenus à partir des valeurs mesurées pour les NC-EcoRV en utilisant un certain nombre d'hypothèses. Le sliding des protéines selon le grand sillon de l'ADN est une hypothèse souvent utilisée, mais qui a été récemment contestée [35]. La rotation des protéines autour de l'ADN est également une hypothèse fondamentale du modèle de Schurr. Enfin, les modèles présentés ici négligent tout mouvement relatif entre les nanocristaux et les enzymes dans les NC-EcoRV. Si l'une de ces hypothèses est fausse, la prédiction des caractéristiques de la diffusion des enzymes libres à partir de celle des NC-EcoRV est inexacte. C'est pourquoi il faudrait sans doute réfléchir à d'autres modèles, afin de comparer leurs prédictions à celles du modèle de Schurr. On peut enfin noter que l'utilisation prévue d'enzymes couplées à des fluorophores de petite taille évitera cette difficulté d'interprétation.

3.3.3.2 Discussion de la distribution large des coefficients de diffusion

Nos expériences ont permis d'observer directement la diffusion unidimensionnelle de NC-EcoRV le long de l'ADN. A partir de cette observation, nous avons mesuré un coefficient de diffusion le long de l'ADN. Ces mesures présentent une dispersion importante. Celle-ci est due en partie à notre procédure d'analyse, mais elle peut également avoir d'autres origines, et notamment la présence de sauts sur les trajectoires expérimentales.

En effet, tout comme le sliding, les sauts conduisent à une variation quasi linéaire du déplacement quadratique. Le coefficient de diffusion estimé à partir de la pente de ce déplacement quadratique moyen peut donc être significativement surestimé pour les trajectoires comportant un ou quelques saut(s). Une partie de ces sauts sont clairement discernés sur les trajectoires expérimentales, comme sur la figure 3.20. L'analyse est alors limitée aux fragments de trajectoire compris entre les sauts, de sorte que ces sauts ne sont pas pris en compte dans l'évaluation des coefficients de diffusion. En revanche, il est beaucoup plus difficile de détecter les sauts dont l'amplitude est inférieure ou égale à celle des fluctuations longitudinales de l'ADN. Ainsi, il n'est pas aisé de déterminer si des sauts sont présents sur des trajectoires comme celle présentée au début de cette partie (figure 3.16). Il est donc probable qu'une partie des trajectoires qui ont servi à l'estimation de D comprennent de tels sauts. Ce point explique vraisemblablement la queue large de la distribution des coefficients de diffusion mesurés. Par ailleurs, le coefficient de diffusion le plus fréquent, $10^{-3} \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ constitue pour cette même raison une borne supérieure. Il serait intéressant d'utiliser des taux

d'étirement plus élevés lors des prochaines expériences menées dans l'équipe. En effet, en réduisant l'amplitude des fluctuations de l'ADN, il deviendra plus facile de détecter les sauts de faible amplitude.

Les expériences ont de plus été analysées en supposant une diffusion homogène des enzymes sur l'ensemble des molécules d'ADN. Cette hypothèse néglige tout effet lié à la séquence de l'ADN, qui pourrait moduler le paysage énergétique le long de l'ADN et donc provoquer des variations locales du coefficient de diffusion des enzymes. Une modélisation théorique de ces effets a été récemment proposée par Barbi et al. [102], et une observation expérimentale en a été réalisée par Yanagida [11]. De tels effets sont difficiles à prendre en compte dans nos expériences : une partie des molécules n'étant sans doute pas entières, il n'est pas possible de corréler la position des NC-EcoRV à la séquence d'ADN qui les entoure. La partie 3.4 de ce chapitre décrit un protocole permettant cette corrélation.

3.3.3.3 Implications biologiques de nos expériences

a) Effets du sel sur les caractéristiques de la diffusion d'EcoRV

Nos expériences ont mis en évidence la dépendance des durées d'interaction des NC-EcoRV avec les conditions salines. En revanche, les coefficients de diffusion moyens que nous avons estimés sont peu affectés par les variations de salinité. Ceci n'est pas choquant : la cinétique de dissociation des enzymes liées à l'ADN est régie par la force de leur interaction avec l'ADN non spécifique, qui a une forte composante électrostatique affectée par les concentrations salines. En revanche, leur coefficient de diffusion est déterminé essentiellement par des paramètres hydrodynamiques, du moins selon le modèle de Schurr [21].

b) Concentration en sel optimale pour la localisation et le clivage des séquences-cibles par EcoRV

Jeltsch et Pingoud ont analysé l'effet de la concentration en sel et en magnésium sur l'efficacité relative de clivage par EcoRV de cibles insérées sur des molécules d'ADN de longueurs différentes [39]. A partir de ces expériences, ils ont prévu une longueur explorée par événement de sliding maximale à 50 mM NaCl, de l'ordre de 1 à 2 kb. A première vue, cet optimum à 50 mM NaCl est incompatible avec nos résultats. Nous avons en effet observé que la longueur explorée était maximale pour la plus faible des concentrations en sel testées (25 mM). Cependant, une différence importante sépare ces deux expériences. En effet, dans l'expérience de Jeltsch et Pingoud, les concentrations en sel et en magnésium influent non seulement sur la diffusion d'EcoRV, mais aussi sur le processus de clivage de l'ADN (l'efficacité de ce processus décroît à faibles salinités). Leur expérience n'isole donc pas complètement l'effet de ces ions sur la diffusion des enzymes.

c) Comparaison des coefficients de diffusions obtenus avec celui mesuré pour l'ARN polymérase

Antérieurement à nos expériences, seule une étude, menée dans le groupe de Yanagida et brièvement présentée dans le premier chapitre de ce mémoire, avait

3.4. AMÉLIORATIONS EXPÉRIMENTALES (EN COURS)

déjà permis l'observation directe de la diffusion d'une enzyme le long de l'ADN [11]. Cette étude conclut à un coefficient de diffusion de l'ordre de $(700 \text{ pb})^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour l'ARN polymérase de *E. coli*. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle que nous avons proposée pour les enzymes libres à partir du modèle de Schurr (de l'ordre de $(500 \text{ pb})^2 \cdot \text{s}^{-1}$), et excède sensiblement celle que nous avons mesurée pour les NC-EcoRV ($(130 \text{ pb})^2 \cdot \text{s}^{-1}$). L'ARN polymérase de *E. coli* ayant une masse moléculaire totale de 380 kD intermédiaire entre celle d'EcoRV (60 kD) et celle d'un nanocristal, on aurait plutôt attendu que son coefficient de diffusion le long de l'ADN soit compris entre celui d'EcoRV et celui d'un NC-EcoRV. En effet, comme nous l'avons vu, le coefficient de sliding des enzymes dépend essentiellement de leur taille, du moins dans le modèle de Schurr. Ceci vient peut-être du fait que la médiocre résolution spatiale des expériences de T. Yanagida (environ 200 nm) ne lui a pas du tout permis de distinguer le sliding des sauts de faible amplitude, ce qui a pu conduire à une surestimation importante du coefficient de diffusion annoncé dans cette étude.

3.4 Améliorations expérimentales (en cours)

Le mode d'étirement de l'ADN décrit dans le deuxième chapitre permet de placer les molécules d'ADN dans une configuration où elles peuvent interagir avec les protéines. Néanmoins, plusieurs améliorations de ce protocole sont possibles, incluant l'accrochage des molécules par un lien plus fort entre leurs extrémités et la surface, et l'étirement sélectif des molécules entières. Nous allons montrer dans cette partie comment ces améliorations ont été obtenues en étirant des molécules d'ADN biotinylées sur une surface recouverte de streptavidine. Nous indiquerons ensuite comment nous comptons utiliser cette technique pour l'étude des interactions ADN-EcoRV.

3.4.1 Etirement d'ADN biotinylé sur des surfaces streptavidinées

Le principe de cette expérience consiste à accrocher des molécules d'ADN, dont les extrémités ont été biotinylées, sur des surfaces recouvertes de streptavidine. La liaison biotine-streptavidine, même si elle n'est pas covalente, est extrêmement forte (sa constante d'association est de 10^{15} M^{-1}) et assure donc un accrochage stable de l'ADN à la surface.

3.4.1.1 Conception de surfaces streptavidinées

La streptavidine peut être déposée sur les surfaces en la laissant s'y adsorber non spécifiquement. Toutefois, un tel traitement conduit à une densité souvent faible et en tous cas peu reproductible de streptavidine sur la surface. De plus, il n'interdit pas l'adsorption non spécifique de l'ADN et surtout, ultérieurement,

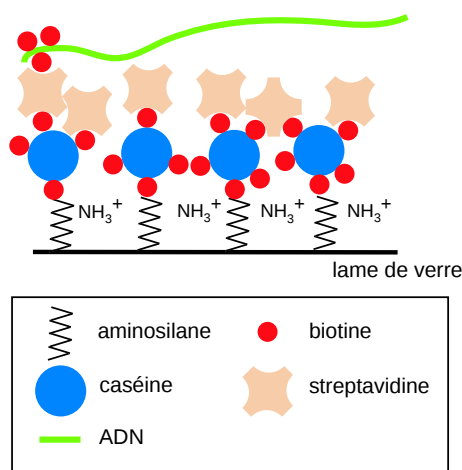


FIG. 3.23 – Etirement d'ADN biotinylé. Les surfaces utilisés sont composées d'une couche d'aminosilanes, une couche de caséine biotinylée et une couche de streptavidine, qui assure l'accrochage des molécules d'ADN biotinylées.

des protéines. Pour cette raison, des molécules biotinylées comme le PEG (polyéthylèneglycol), la BSA (albumine de sérum de boeuf) ou la caséine sont en général adsorbées sur la surface préalablement au dépôt de streptavidine. Afin d'augmenter la densité de ces protéines sur la surface par rapport à ces protocoles traditionnels, nous les avons déposées sur une lame de verre recouverte au préalable d'aminosilanes (APTES) fortement chargée positivement. Cette technique permet de couvrir la surface avec une densité élevée de caséine biotinylée, dont le point isoélectrique est 4.7, et qui est donc chargée négativement dans nos expériences (figure 3.23).

3.4.1.2 Résultats expérimentaux

Les expériences que nous avons menées avec ce protocole montrent qu'il est efficace pour étirer l'ADN. Conformément aux prédictions de notre modèle décrivant les fluctuations de l'ADN étiré, les fluctuations transverses des molécules d'ADN utilisées (entre 5 et 10 kilobases), étirées à 75% environ, peuvent difficilement être distinguées sur les films réalisés. En effet, leur amplitude est inférieure à 100 nm et leur temps de corrélation, inférieur à 10 ms, est plus court que le temps d'exposition utilisé. Cependant, la photodestruction des molécules étirées marquées au SYBR Gold conduit comme précédemment à la rétraction des deux fragments aux extrémités de la molécule, attestant d'un accrochage spécifique des extrémités. Grâce à la grande stabilité du lien biotine-streptavidine, aucun décrochage des molécules étirées n'est observé après augmentation du pH, ajout de sel ou de caséine. De plus, nous avons constaté que la distribution des longueurs des molécules étirées est nettement moins large que sur les surfaces de polystyrène. Nous développons actuellement un ensemble de protocoles qui devraient permettre l'utilisation de cette technique en vue de l'étude de l'interaction

3.4. AMÉLIORATIONS EXPÉRIMENTALES (EN COURS)

ADN-protéines.

3.4.2 Application aux expériences d'interaction ADN/ protéines

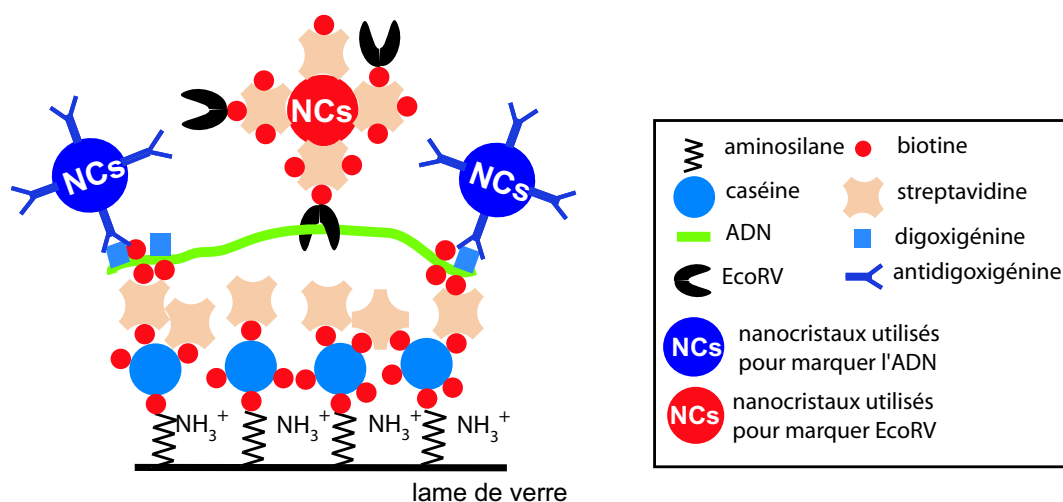


FIG. 3.24 – Schéma du protocole qui sera utilisé pour les prochaines expériences (pour plus de clarté les échelles de longueur n'ont pas été respectées).

Le protocole actuellement en cours de développement dans l'équipe est représenté schématiquement sur la figure 3.24. Ce protocole utilise deux types de nanocristaux, le premier pour marquer les molécules d'ADN et le second pour le couplage à EcoRV. Nous utilisons une liaison biotine-streptavidine à la fois pour accrocher les molécules d'ADN à la surface et pour le couplage EcoRV-nanocristaux. Il est donc nécessaire de saturer en biotines les NC-EcoRV de manière à éviter leur interaction avec la surface. Pour cela, les nanocristaux sont recouverts de biocitine (Sigma) après leur couplage à EcoRV, la biocitine étant une molécule de biotine rendue soluble par amidation avec une lysine. Nous comptons liguer aux extrémités des molécules d'ADN des fragments mixtes biotine+digoxigénine. Cette technique devrait permettre à la fois d'attacher les molécules d'ADN à la surface et de les détecter à l'aide de nanocristaux antidigoxigénine. Au moment de l'écriture de ce mémoire, l'étirement de molécules biotinylées fonctionne de manière reproductible, et des résultats préliminaires ont été obtenus sur l'interaction de ces molécules avec des NC-EcoRV. Il nous reste à optimiser et à caractériser le protocole de détection de l'ADN étiré par des nanocristaux. Ce protocole présente un grand nombre d'avantages :

- Les nanocristaux et certaines protéines interagissent peu avec les surfaces recouvertes de caséine, alors qu'ils s'adsorbent massivement sur la plupart des autres surfaces. Contrairement aux surfaces de polystyrène, les surfaces décrites ici peuvent donc permettre l'étirement de complexes ADN/protéines

couplées préformés en solution. Cette possibilité peut trouver de nombreuses applications pour des études "statiques".

- L'utilisation de nanocristaux pour marquer les extrémités de l'ADN nous dispense d'utiliser des molécules de SYBR Gold le long de l'ADN. Il sera donc possible d'éviter la photodestruction des molécules d'ADN due au colorant et de vérifier que la présence de ce fluorophore n'a pas d'effet sur les interactions ADN/EcoRV.
- L'autofluorescence des surfaces recouvertes de streptavidine est beaucoup plus faible que celle des surfaces recouvertes de polystyrène. Ceci n'est pas vraiment critique lorsque l'on travaille avec des nanocristaux, que l'on parvient à détecter avec de bonnes résolutions spatiale et temporelle au-dessus de surfaces de polystyrène. En revanche, cette autofluorescence compromet la détection des enzymes marquées avec un fluorophore organique traditionnel. Or la réalisation d'une telle expérience serait souhaitable afin de tester les effets liés à la taille du fluorophore utilisé pour marquer EcoRV. Elle est sans doute possible au-dessus de surfaces streptavidinées.
- La taille des molécules étirées au-dessus d'une surface de polystyrène est variable. En effet une partie des molécules peuvent casser au cours de l'expérience, comme on l'a discuté au cours du chapitre précédent. L'utilisation de surfaces de polystyrène permet néanmoins l'étirement de ces fragments de molécules. Au contraire, sur des surfaces streptavidinées, les molécules qui ne sont pas entières ne peuvent s'étirer. Dans les expériences présentées dans ce mémoire, cette différence n'était pas vraiment gênante car nous nous sommes intéressés aux interactions des enzymes avec l'ADN non spécifique. Dans un futur proche, il serait intéressant d'étudier les effets de séquence le long de l'ADN, ou d'observer l'association d'EcoRV à une séquence-cible. De telles expériences ne peuvent être réalisées que si on peut corrélérer la séquence de l'ADN étudié aux positions sur l'ADN étiré. En l'absence de marquage séquence-spécifique supplémentaire, ceci n'est possible que sur des molécules entières.

3.4.2.1 Matériels et méthodes pour l'étirement d'ADN sur des surfaces recouvertes de streptavidine

a) Préparation de caséine biotinylée

Une solution stock de caséine biotinylée est préparée en mélangeant 15 mg de Blocking Reagent (Roche) et 10 mg de biotine-LC-LC-NHS (Pierce) dans 1 ml de PBS pendant quelques heures à 4 °C. Ce protocole permet une liaison covalente des biotines sur les groupements lysine de la caséine. Nous avons travaillé en très grand excès de biotine pour assurer une biotinylation quasi-totale de la caséine. Les meilleurs résultats ont été obtenus en stockant cette solution au réfrigérateur et en l'utilisant dans la semaine suivant sa fabrication.

b) Préparation des surfaces et étirement

Des lamelles de verre 24 mm × 36 mm sont tout d'abord nettoyées à l'éthanol

3.4. AMÉLIORATIONS EXPÉRIMENTALES (EN COURS)

puis passées au nettoyeur à plasma. Elles sont ensuite plongées dans une solution contenant 10 ml d'éthanol, 500 μ l d'acide acétique 1N, 20 μ l (soit une concentration de l'ordre de 10 mM) de silanes (APTES : Aminopropyltriethoxysilane, Sigma) mélangés dans cet ordre. Le mélange est placé à 4 °C pendant une nuit. Le lendemain, les lames sont rincées à l'éthanol puis à l'eau millipore et séchées. Ces lamelles sont ensuite utilisées pour bâtir une cavité à écoulement. 100 μ l d'une solution de caséine biotinylée à 1 mg/ml dans du PIPES 50 mM pH 6.8, NaCl 50 mM sont introduits dans la cavité pendant 10 minutes ; la cavité est ensuite rincée avec 1 ml de PIPES 20 mM pH 6.8. 100 μ l d'une solution de streptavidine (Sigma) à 10 μ g/ml dans du PIPES 20 mM pH 6.8, NaCl 50 mM sont ensuite introduits dans la cavité. Le pH utilisé ici n'est pas choisi au hasard : à ce pH très proche de son point isoélectrique, la streptavidine peut approcher de la surface alors qu'à des pH plus hauts cette approche est gênée par une répulsion électrostatique caséine-streptavidine et qu'à des pH plus bas la streptavidine risquerait de s'accrocher non-spécifiquement sur la surface. 1 ng d'ADN biotinylé marqué au SYBR Gold dilué dans du PIPES 20 mM pH 6.8 est introduit dans la cavité et interagit avec la surface pendant quelques minutes. L'application d'un flux permet ensuite d'étirer les molécules accrochées.

Annexe 1 : effets de la taille d'une protéine sur son temps d'interaction avec l'ADN

Nous présentons ici un calcul permettant de déterminer l'effet de la variation de taille d'EcoRV liée à son couplage à un nanocristal sur sa durée d'interaction avec l'ADN, en modélisant la liaison ADN-protéine par un potentiel harmonique. Le modèle utilisé est décrit dans le paragraphe 3.3.3.1 de ce chapitre.

Le mouvement d'une particule de rayon hydrodynamique R_h (par exemple EcoRV) dans un potentiel harmonique de raideur k est régi par l'équation de Langevin suivante [72] :

$$\zeta \frac{dx}{dt}(t) = -kx(t) + L(t), \quad (3.19)$$

où la force de Langevin vérifie [72] $\langle L(t)L(t') \rangle = 2\zeta k_B T \delta(t - t')$. Une particule de rayon hydrodynamique $R'_h = \alpha R_h$ (par exemple un NC-EcoRV) a un coefficient de friction $\zeta' = 6\pi\eta R'_h = \alpha\zeta$. Son mouvement est donné par l'équation de Langevin :

$$\alpha\zeta \frac{dy}{dt}(t) = -ky(t) + L'(t), \quad (3.20)$$

avec $\langle L'(t)L'(t') \rangle = 2\alpha\zeta k_B T \delta(t - t')$. Nous allons démontrer que $Y(t) = y(\alpha t)$ a la même équation d'évolution que x .

En réécrivant l'équation précédente au temps αt , il vient $\alpha\zeta dy/dt(\alpha t) = -ky(\alpha t) + L'(\alpha t)$, soit $\zeta dY/dt(t) = -kY(t) + L'(\alpha t)$. $L_{bis}(t) = L'(\alpha t)$ vérifie $\langle L_{bis}(t)L_{bis}(t') \rangle = \langle L'(\alpha t)L'(\alpha t') \rangle = 2\zeta k_B T \alpha \delta(\alpha[t - t'])$. La fonction de Dirac δ vérifie $\alpha\delta(\alpha[t - t']) = \delta(t - t')$. $Y(t) = y(\alpha t)$ obéit donc à l'équation

$$\zeta dY/dt(t) = -kY(t) + L_{bis}(t) \quad (3.21)$$

avec $\langle L_{bis}(t)L_{bis}(t') \rangle = 2\zeta k_B T \delta(t - t')$. Cette équation d'évolution est identique à celle qui régit le mouvement de x . Si un temps moyen T est requis pour que la première particule atteigne une longueur x_0 et rompe sa liaison avec l'ADN, cette durée moyenne sera donc de αT pour la seconde (rappelons qu' α représente le rapport des rayons hydrodynamiques de ces deux particules).

Annexe 2 : erreurs statistiques sur le calcul du déplacement quadratique moyen

Le déplacement quadratique moyen est calculé sur des trajectoires comportant un nombre fini de points (typiquement une centaine dans nos expériences). Il en résulte des erreurs statistiques qu'il convient d'estimer. Soit N le nombre total d'images du film analysé, k la $k^{ième}$ image et t_{exp} la durée séparant deux images consécutives. Le déplacement quadratique moyen peut être évalué pour les durées $\tau = t_{exp}n$ avec $1 \leq n \leq N$. Le calcul de $g(\tau = t_{exp}n)$ consiste à moyenner $(x(t + \tau = t_{exp}(n+k)) - x(t = t_{exp}k))^2$ pour $1 < k < N - n$, soit $(N - n)$ couples d'images. Plus n est grand, plus $g(t_{exp}n)$ est moyenné sur un petit nombre de données, et donc plus l'erreur statistique est grande.

Dans le cas d'un mouvement de fluctuations, l'erreur résultante peut être calculée facilement comme nous allons le voir. Le cas d'un mouvement diffusif a été traité par Qian et al. [103]. Nous allons ici reprendre ces résultats. Enfin, nous établissons ici la formule donnant l'erreur sur le déplacement quadratique moyen d'un mouvement combinant deux mouvements indépendants.

a) Erreurs statistiques pour un mouvement de fluctuations

Le fait que les coordonnées transverse et longitudinale d'un point fixe sur une molécule d'ADN étirée aient une distribution gaussienne au cours du temps permet de calculer la variance du déplacement quadratique moyen. Dans ce calcul, nous négligeons le temps de corrélation des fluctuations.

Soit z la coordonnée (transverse ou longitudinale) considérée. La variable z est distribuée avec une loi de probabilité $P(z) = Ae^{-z^2/2\sigma^2}$ avec $2\sigma^2 = k_B T/k_{\perp}$ pour le mouvement transverse et $2\sigma^2 = k_B T/k_{//}$ pour le mouvement longitudinal.

Si l'on néglige la corrélation des fluctuations sur les durées inférieure à τ_f , la variable $z'(t, \tau) = z(t + \tau) - z(t)$ a une distribution gaussienne de largeur σ' telle que $\sigma'^2 = 2\sigma^2$. L'utilisation de cette loi de probabilité permet de montrer à l'issue de calculs sans difficulté que la moyenne de $\langle z'^2 \rangle$ est $\langle z'^2 \rangle = \sigma'^2 = 2\sigma^2$ (on retrouve la valeur, constante au cours du temps, du déplacement quadratique moyen) et que sa variance est $\Delta(z'^2) = 2\sigma'^4 = 8\sigma^4$.

Le calcul de $g(\tau = t_{exp}n)$ s'effectue par une moyenne sur $(N - n)$ mesures. La variance de $g(\tau = t_{exp}n)$ est donc :

$$\Delta(g(\tau = t_{exp}n)) = 8\sigma^4/(N - n). \quad (3.22)$$

b) Erreurs statistiques pour un mouvement purement diffusif

Une formule due à Qian et al. donne la valeur de la variance $\sigma(g(t_{exp}n))$ dans le cas d'un mouvement de diffusion caractérisé par un coefficient de diffusion D [103] :

$$\Delta(g(\tau = t_{exp}n)) = 2Dt_{exp}n(4n^2(N-n) + 2(N-n) + n - n^3)/(6n(N-n)^2). \quad (3.23)$$

Cette formule est valable pour $n \leq N/2$.

Combinaison de deux mouvements indépendants

Comme précédemment, écrivons $y = y_1 + y_2$, où y_1 et y_2 sont deux variables indépendantes.

$$\begin{aligned}
 \Delta(g(\tau)) &= \Delta((y(t+\tau) - y(t))^2) \\
 &= \Delta([y_1(t+\tau) - y_1(t)] + [y_2(t+\tau) - y_2(t)])^2) \\
 &= \langle ([y_1(t+\tau) - y_1(t)] + [y_2(t+\tau) - y_2(t)])^4 \rangle \\
 &\quad - \langle ([y_1(t+\tau) - y_1(t)] + [y_2(t+\tau) - y_2(t)])^2 \rangle^2 \\
 &= \langle (y_1(t+\tau) - y_1(t))^4 \rangle - \langle (y_1(t+\tau) - y_1(t))^2 \rangle^2 \\
 &\quad + \langle (y_2(t+\tau) - y_2(t))^4 \rangle - \langle (y_2(t+\tau) - y_2(t))^2 \rangle^2 \\
 &\quad + 4 \langle (y_1(t+\tau) - y_1(t))^2 \rangle \langle (y_2(t+\tau) - y_2(t))^2 \rangle.
 \end{aligned}$$

En utilisant le fait que y_1 et y_2 sont indépendantes et de moyenne nulle Ce résultat donne la variance pour un couple de points $(t, t + \tau)$, pour n'importe quel couple (y_1, y_2) . Si y_1 correspond à un mouvement de fluctuations et y_2 à un mouvement diffusif, la variance sur la mesure de $g(\tau) = g_1(\tau) + g_2(\tau)$ est approximativement :

$$\Delta(g(\tau)) = \Delta(g_1(\tau)) + \Delta(g_2(\tau)) + 4 \langle g_1(\tau) \rangle \langle g_2(\tau) \rangle / (N - n). \quad (3.24)$$

Résumé et conclusions quant à l'utilisation du déplacement quadratique moyen

Nous avons calculé la valeur du déplacement quadratique moyen pour un mouvement de fluctuations et un mouvement diffusif, ainsi que les erreurs statistiques affectant le calcul pour chacun de ces deux mouvements. Nous avons également pu déterminer les caractéristiques du déplacement quadratique moyen pour une combinaison de ces deux mouvements.

La figure 3.25 récapitule ces résultats dans les cas : a) d'un mouvement de fluctuations longitudinales au milieu d'une molécule d'ADN T7 étirée à 75 %, b) d'un mouvement de diffusion (suivant le même axe) caractérisé par un coefficient de diffusion $D = 10^{-2} \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ et c) d'une combinaison de ces deux mouvements. Dans chaque cas, on considère que le déplacement quadratique moyen est calculé sur un film expérimental de 100 images prises avec un temps d'exposition de 20 ms. Les valeurs numériques choisies sont proches de celles de nos expériences.

Expérimentalement, D est estimé en calculant la pente du déplacement quadratique moyen. Comme le montre la figure 3.25, cette estimation est d'autant plus précise que les fluctuations de l'ADN sont faibles. Néanmoins, on s'attend à pouvoir détecter des mouvements diffusifs caractérisés par des coefficients de diffusion $D \simeq 10^{-3} - 10^{-2} \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$.

3.4. AMÉLIORATIONS EXPÉRIMENTALES (EN COURS)

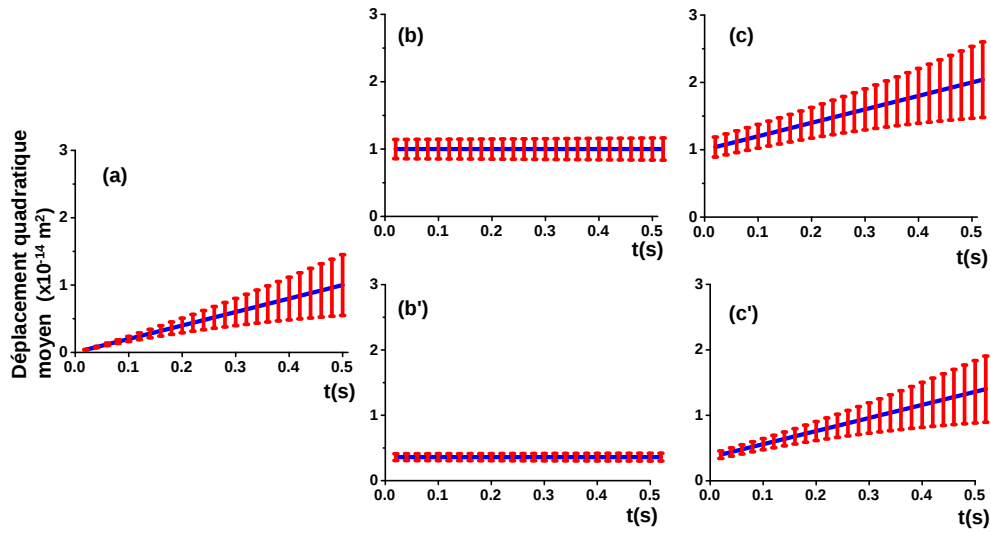


FIG. 3.25 – Déplacement quadratique moyen dans le cas d'un mouvement de diffusion avec $D = 10^{-2} \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ (a), d'un mouvement de fluctuations longitudinales au milieu (b) et près d'une extrémité (b', position relative : 0.1) d'une molécule d'ADN T7 étirée à 75 % et d'une combinaison de ces deux mouvements (c,c') pour un film de 100 images de 20 ms ; $g(\tau)$ a été représenté jusqu'à $\tau=0.5$ s, soit 1/4 de la durée totale du film.

Conclusions et perspectives

Le travail exposé dans ce mémoire présente des expériences menées à l'échelle de la molécule individuelle, destinées à répondre à une question importante en biologie : comment les protéines localisent-elles leurs séquences-cibles sur l'ADN ? Nos études par microscopie de fluorescence constituent l'une des premières observations de la diffusion de protéines sur l'ADN.

Afin d'observer l'interaction de nanocristaux-EcoRV avec des molécules d'ADN individuelles, nous avons développé un ensemble de protocoles permettant d'étirer des molécules d'ADN et d'observer leur interaction avec des enzymes couplées. Par rapport à la technique de peignage moléculaire dont elle s'inspire, notre technique présente l'avantage de placer les molécules d'ADN dans une configuration plus favorable à l'interaction avec les protéines. La technique d'étirement présentée ici est rapide et simple à mettre en œuvre, et permet d'étirer de nombreuses molécules en parallèle. Nous pensons qu'elle représente une alternative valable aux autres techniques utilisées pour les études de fluorescence, reposant par exemple sur l'utilisation de pinces optiques, notamment en raison de sa plus grande simplicité expérimentale. Les améliorations en cours devraient permettre d'en supprimer les principaux défauts, à savoir la possibilité d'étirer des molécules d'ADN non entières et l'autofluorescence des surfaces de polystyrène utilisées dans nos expériences, et permettre d'utiliser la technique de détection des molécules d'ADN par des nanocristaux développée au cours de cette thèse. Rétrospectivement, le point clé pour observer l'interaction des nanocristaux-EcoRV avec l'ADN aura été de déterminer des conditions expérimentales minimisant les interactions des molécules d'ADN étirées et des nanocristaux-EcoRV avec la surface, ainsi que les interactions non spécifiques entre ADN et nanocristaux.

Nos expériences démontrent l'importance de la diffusion unidimensionnelle d'EcoRV dans le processus de localisation de sa séquence-cible *in vitro*. Nous avons mesuré le coefficient de diffusion de nanocristaux-EcoRV le long de l'ADN. Le modèle de Schurr décrit dans le chapitre précédent nous a permis d'en déduire le coefficient attendu pour des enzymes EcoRV non marquées, dans l'hypothèse d'un sliding hélicoïdal. La longueur explorée en une phase de sliding correspondante est estimée à 1 à 2 kb dans les conditions les plus favorables. Cette distance est cohérent avec les estimations du groupe d'A. Pingoud. Il faut noter que nos résultats ne démentent pas l'implication des mécanismes de sauts (hopping, jumping) dans le processus de localisation de la séquence-cible d'EcoRV sur des pelotes d'ADN. Au contraire, nous avons occasionnellement observé des sauts

sur les molécules étirées ; la fréquence de sauts est certainement bien plus grande sur des molécules d'ADN en pelote, la plus grande densité de cette configuration augmentant la probabilité de réassociation d'une enzyme après sa dissociation.

Plusieurs expériences sont envisagées dans un proche futur en vue d'améliorer notre compréhension de l'action d'EcoRV sur l'ADN. Tout d'abord, parmi l'ensemble des événements analysés, seule une petite partie sont d'assez longue durée pour permettre d'estimer un coefficient de diffusion. Une statistique plus complète permettrait une meilleure estimation de ce coefficient et de sa dispersion. Elle permettrait également de vérifier plus précisément si ces coefficients dépendent ou non de la salinité des solutions utilisées. Il serait également intéressant d'étudier plus en détail les sauts des nanocristaux-EcoRV. Leur occurrence était faible dans nos expériences, il serait avantageux d'utiliser des molécules d'ADN de même longueur mais moins tendues, de manière à augmenter le nombre de sauts. La détermination de la fréquence des sauts à un taux d'étirement donné permettrait d'extrapoler celle dans une pelote, et donc de caractériser entièrement le processus de recherche (sliding+jumping) de la séquence-cible par EcoRV.

L'utilisation de nanocristaux a beaucoup facilité la mise au point de ces expériences. Néanmoins, leur taille modifie les propriétés diffusives d'EcoRV. Afin d'estimer le coefficient de diffusion d'EcoRV à partir de celui mesuré expérimentalement des nanocristaux-EcoRV, nous avons dû utiliser le modèle de Schurr, qui est basé sur l'hypothèse d'un mouvement hélicoïdal des enzymes autour de l'ADN, dont il est difficile de contrôler la validité. Pour cette raison, il serait souhaitable d'étudier la diffusion d'enzymes marquées avec un fluorophore de petite taille, comme le Cy3, dont le poids moléculaire, environ 1 kD, est très inférieur à celui d'EcoRV (55 kD). Ceci semble réalisable en s'inspirant du système "FIONA" (Fluorescence Imaging with One-Nanometer Accuracy) développé dans l'équipe de P. Selvin. La détection d'enzymes marquées avec ce type de fluorophores sera vraisemblablement plus délicate, pour les raisons exposées dans le troisième chapitre. En revanche, nous attendons un coefficient de diffusion plus élevé, et donc à un mouvement de plus grande amplitude pour des enzymes EcoRV couplées à des fluorophores de petite taille.

Une suite logique des expériences présentées consisterait à faire agir les nanocristaux-EcoRV sur des molécules d'ADN comportant une séquence-cible, et à observer leur association à cette séquence-cible, qui doit se traduire par l'arrêt de leur diffusion unidimensionnelle lorsque la cible est localisée. Cette expérience permettra de déterminer si le processus de recherche s'interrompt dès lors que l'enzyme atteint pour la première fois sa séquence-cible, ou si elle peut la dépasser par sliding sans s'y associer durablement.

Il serait ensuite intéressant d'examiner les effets de la séquence des molécules d'ADN sur la diffusion des protéines, en particulier de déterminer si la diffusion des nanocristaux-EcoRV est homogène sur toute la longueur des molécules. Yanagida a par exemple observé une variation importante des temps d'association de l'ARN polymérase de *E. Coli* selon sa localisation sur un domaine de la molécule d'ADN riche en purines (bases A et T) ou en pyrimidines (bases G et C) [11]. Le

protocole expérimental utilisé au cours de cette thèse rend cette étude difficile, car il ne permet pas d'orienter les molécules d'ADN et peut conduire à l'étirement de molécules fragmentaires. En revanche, l'étirement d'ADN biotinylé sur des surfaces recouvertes de streptavidine et sa détection avec des nanocristaux devrait autoriser cette étude, ce protocole ne présentant pas les inconvénients ci-dessus et permettant de connaître la séquence d'ADN correspondant à une position donnée sur l'ADN étiré. Les effets de la structure d'EcoRV peuvent aussi être examinés. En effet, les biochimistes sont capables de synthétiser des enzymes EcoRV mutantes, dont la structure diffère de quelques acides aminés par rapport à celle des enzymes sauvages. La détermination des caractéristiques de diffusion de ces mutants permettrait de déterminer quels sont les éléments de la structure d'EcoRV impliqués dans le processus de sliding.

Enfin, la question de savoir si le sliding d'EcoRV a lieu ou non dans le grand sillon de l'ADN, suivant un mouvement hélicoïdal, est importante. Cette information serait utile pour prédire le comportement *in vivo* de l'enzyme sur des molécules d'ADN couvertes de nombreuses protéines. Le mouvement étant diffusif, cette question ne peut pas être directement tranchée par l'analyse de la position, ni de l'orientation de l'enzyme par rapport à l'ADN. Il est en revanche probable que les coefficients de diffusion liés à ces mouvements soient affectés de manière différente par la composition des solutions employées (viscosité, salinité...). La mise en relation des variations expérimentalement mesurées à celles données par un modèle permet donc potentiellement de trancher entre les différents mécanismes microscopiques pouvant conduire à la diffusion unidimensionnelle d'EcoRV, encore que cette expérience constitue la plus délicate de celles présentées parmi ces perspectives.

Le système expérimental que nous avons développé est très flexible, et son utilisation autorise l'étude d'un grand nombre de protéines différentes, le point critique étant la possibilité de coupler dans de bonnes conditions ces protéines à un fluorophore. Il serait très intéressant de réaliser des expériences similaires à celles décrites dans cette thèse avec d'autres protéines qui ont à localiser une séquence-cible sur l'ADN. En effet, il est important de déterminer si les résultats obtenus sont spécifiques à EcoRV ou s'ils ont une portée plus générale. La possibilité d'un mouvement de sliding a été prévue pour de nombreuses protéines, et il est donc très probable que nos expériences puissent être réalisées avec d'autres protéines. Il serait alors instructif de déterminer si le coefficient de sliding varie beaucoup d'une protéine à l'autre : un effet de taille est attendu, en revanche il n'est pas évident de savoir si la structure du site de liaison des protéines à l'ADN influe sur leur vitesse de sliding.

L'utilisation de méthodes optiques est indispensable à l'étude des phénomènes diffusifs. Ces méthodes conservent aussi un large intérêt pour l'étude d'enzymes consommant de l'ATP, qui peuvent se déplacer par translocation de l'ADN. En effet, l'utilisation de pinces optiques/magnétiques permet d'étudier l'action mécanique de telles enzymes, et d'accéder à leur vitesse de déplacement sur l'ADN. Toutefois, ces techniques ne permettent en général pas de localiser la po-

sition de l'enzyme sur l'ADN, ce qui peut rendre l'interprétation des expériences délicate. En ce sens, les méthodes optiques offrent une information complémentaire utile à la compréhension de ces enzymes. Un enjeu des années à venir sera de coupler les subtilités de la micromanipulation de molécules d'ADN à la visualisation directe du mouvement des enzymes afin d'obtenir simultanément les informations fournies par ces deux approches.

Bibliographie

- [1] T. T. Perkins, D. E. Smith, and S. Chu, “Direct observation of tube-like motion of a single polymer chain,” *Science* **264**, pp. 819–822, 1994.
- [2] T. T. Perkins, S. R. Quake, D. E. Smith, and S. Chu, “Relaxation of a single DNA molecule observed by optical microscopy,” *Science* **264**, pp. 822–826, 1994.
- [3] P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J. Viovy, D. Chatenay, and F. Caron, “DNA : an extensible molecule,” *Science* **271**, pp. 792–794, 1996.
- [4] C. Bustamante, S. B. Smith, and Y. Cui, “Overstretching B-DNA : the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules,” *Science* **271**, pp. 795–799, 1996.
- [5] M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block, “Stretching DNA with optical tweezers,” *Biophys. J.* **72**, pp. 1335–1346, 1997.
- [6] B. Essevaz-Roulet, U. Bockelmann, and F. Heslot, “Mechanical separation of the complementary strands of DNA,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, pp. 11935–11940, 1997.
- [7] T. R. Strick, J. F. Allemand, D. Bensimon, and V. Croquette, “Behavior of supercoiled DNA,” *Biophys. J.* **74**, pp. 2016–2028, 1998.
- [8] B. M. Ali, R. Amit, I. Braslavsky, A. B. Oppenheim, O. Gileadi, and J. Stavans, “Compaction of single DNA molecules induced by binding of integration host factor (IHF),” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, pp. 10658–10663, 2001.
- [9] G. Wagner, A. Bancaud, J. P. Quivy, C. Clapier, G. Almouzni, and J. L. Viovy, “Compaction kinetics on single DNAs : purified nucleosome reconstitution systems versus crude extract,” *Biophys. J.* (**à paraître**), 2005.
- [10] M. D. Wang, M. J. Schnitzer, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block, “Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase,” *Science* **282**, pp. 902–907, 1998.
- [11] Y. Harada, T. Funatsu, K. Murakami, Y. Nonoyama, A. Ishihama, and T. Yanagida, “Single-molecule imaging of RNA polymerase-DNA interactions in real time,” *Biophys. J.* **76**, pp. 709–715, 1999.
- [12] G. J. Wuite, S. B. Smith, M. Young, D. Keller, and C. Bustamante, “Single-molecule studies of the effect of template tension on T7 DNA polymerase activity,” *Nature* **404**, pp. 103–106, 2000.

-
- [13] Z. Gueroui, C. Place, E. Freyssingeas, and B. Berge, "Observation by fluorescence microscopy of transcription on single combed DNA," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, pp. 6005–6010, 2002.
- [14] G. Charvin, D. Bensimon, and V. Croquette, "Single-molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-II topoisomerases," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, pp. 9820–9825, 2003.
- [15] D. A. Koster, V. Croquette, C. Dekker, S. Shuman, and N. H. Dekker, "Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase IB," *Nature* **434**, pp. 671–674, 2005.
- [16] T. Ha, I. Rasnik, W. Cheng, H. P. B. and G. H. Gauss and T. M. Lohman, and S. Chu, "Initiation and re-initiation of DNA unwinding by the Escherichia coli Rep helicase," *Nature* **419**, pp. 638–641, 2002.
- [17] M. N. Dessinges, T. Lionnet, X. G. Xi, D. Bensimon, and V. Croquette, "Single-molecule assay reveals strand switching and enhanced processivity of UvrD," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, pp. 6439–6444, 2004.
- [18] H. Kabata, W. Okada, and M. Washizu, "Single-molecule dynamics of the EcoRI enzyme using stretched DNA : its application to *in situ* sliding assay and optical mapping," *Jpn. J. Appl. Phys.* **39**, pp. 7164–7171, 2000.
- [19] B. Van der Broek, M. C. Noom, and G. J. Wuite, "DNA-tension dependence of restriction enzyme activity reveals mechanochemical properties of the reaction pathway," *Nucleic Acids Res.* **33**, pp. 2676–2684, 2005.
- [20] A. D. Riggs, S. Bourgeois, and M. Cohn, "The lac repressor-operator system interaction III. Kinetic studies," *Biophys. Chem.* **9**, pp. 413–414, 1979.
- [21] J. M. Schurr, "The one-dimensional diffusion coefficient of proteins absorbed on DNA. Hydrodynamic considerations," *J. Mol. Biol.* **53**, pp. 401–417, 1970.
- [22] R. B. Winter, O. G. Berg, and P. H. Von Hippel, "Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 3. The Escherichia coli lac repressor-operator interaction : kinetic measurements and conclusions.," *Biochemistry* **20**, pp. 6961–77, 1981.
- [23] B. J. Terry, W. E. Jack, and P. Modrich, "Facilitated diffusion during catalysis by EcoRI endonuclease. Nonspecific interactions in EcoRI catalysis.," *J. Biol. Chem.* **260**, pp. 13130–13137, 1985.
- [24] W. E. Jack, B. J. Terry, and P. Modrich, "Involvement of outside DNA sequences in the major kinetic path by which EcoRI endonuclease locates and cleaves its recognition sequence," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, pp. 4010–4014, 1982.
- [25] H. Ehbrecht, A. Pingoud, C. Urbanke, G. Maas, and C. Gualerzi, "Linear diffusion of restriction endonucleases on DNA," *J. Biol. Chem.* **260**, pp. 6160–6166, 1984.

BIBLIOGRAPHIE

- [26] O. G. Berg, R. B. Winter, and P. H. Von Hippel, "Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 1. Models and theory," *Biochemistry* **20**, pp. 6948–6960, 1985.
- [27] P. H. Von Hippel and O. G. Berg, "Facilitated target location in biological systems," *J. Biol. Chem.* **264**, pp. 675–678, 1978.
- [28] M. Arrio-Dupont, S. Cribier, G. Foucault, P. F. Devaux, and A. D'Albis, "Diffusion of fluorescently labeled macromolecules in cultured muscle cells," *Biophys. J.* **70**, pp. 2327–2332, 1996.
- [29] S. E. Halford and J. F. Marko, "How do site-specific DNA-binding proteins find their targets?," *Nucleic Acids Res.* **32**, pp. 3040–3052, 2004.
- [30] H. C. Berg, *Random Walks in Biology*, Princeton University Press, 1993.
- [31] M. V. Smoluchowski, "Versuch einer methematischen Theorie der Koagulationskinetik kolloidier Lösungen," *Z. Phys. Chem.* **92**, pp. 129–198, 1917.
- [32] J. Alves, C. Urbanke, A. Fliess, G. Maass, and A. Pingoud, "Fluorescence stopped-flow kinetics of the cleavage of synthetic oligodeoxynucleotides by the EcoRI restriction endonuclease," *Biochemistry* **28**, pp. 7879–7888, 1989.
- [33] N. P. Stanford, M. D. Szczelkun, J. F. Marko, and S. E. Halford, "One- and three-dimensional pathways for proteins to reach specific DNA sites," *EMBO J.* **19**, pp. 6546–6557, 2000.
- [34] A. Jeltsch and C. Urbanke, "Sliding or hopping? How restriction enzymes find their way on DNA," *Restriction endonucleases (A. Pingoud editor)*, pp. 95–110, 2004.
- [35] M. Kampmann, "Obstacle bypass in protein motion along DNA by two-dimensional rather than one-dimensional sliding," *J. Biol. Chem.* **279**, pp. 38715–38720, 2004.
- [36] H. X. Zhou, "A model for the mediation of processivity of DNA-targeting proteins by nonspecific binding : dependence on DNA length and presence of obstacles," *Biophys. J.* **88**, pp. 1608–1615, 2005.
- [37] S. E. Halford, D. M. Gowers, and R. Sessions, "Two are better than one," *Nature Struct. Biol.* **7**, pp. 705–707, 2000.
- [38] R. Roberts, M. Belfort, T. Bestor, A. S. Bhagwat, T. Bickle, J. Bitinaite, R. Blumenthal, S. Degtyarev, D. T. Dryden, K. Dybvig, K. Firman, E. S. Gromova, R. I. Gumport, S. Halford, S. Hattman, J. Heitman, D. Hornby, A. Janulaitis, A. Jeltsch, J. Josephsen, A. Kiss, T. Klaenhammer, I. Kobayashi, H. Kong, D. Kruger, S. Lacks, M. Marinus, M. Miyahara, R. Morgan, N. Murray, V. Nagaraja, A. Piekarowicz, A. Pingoud, E. Raleigh, D. Rao, N. Reich, V. Repin, E. Selker, P. Shaw, D. Stein, B. Stoddard, W. Szybalski, T. Trautner, J. Van Etten, J. Vitor, G. Wilson, and S. Xu, "A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes," *Nucleic Acids Res.* **31**, pp. 1805–1812, 2003.

-
- [39] A. Jeltsch and A. Pingoud, "Kinetic characterization of linear diffusion of the restriction endonuclease EcoRV on DNA," *Biochemistry* **37**, pp. 2160–2169, 1998.
- [40] M. Slutsky and L. Mirny, "Kinetics of protein-DNA interaction : facilitated target location in sequence-dependent potential," *Biophys. J.* **87**, pp. 4021–4035, 2004.
- [41] D. M. Gowers and S. E. Halford, "Protein motion from non-specific to specific DNA by three-dimensional routes aided by supercoiling," *EMBO J.* **22**, pp. 1410–1418, 2003.
- [42] H. Viadu and A. K. Aggarwal, "Structure of BamHI bound to nonspecific DNA : a model for DNA sliding," *Mol. Cell* **5**, pp. 889–895, 2000.
- [43] A. Jeltsch, J. Alves, H. Wolfes, G. Maass, and A. Pingoud, "Pausing of the restriction endonuclease EcoRI during linear diffusion on DNA," *Biochemistry* **33**, pp. 10215–10219, 1994.
- [44] C. Schulze, A. Jeltsch, I. Franke, C. Urbanke, and A. Pingoud, "Crosslinking the EcoRV restriction endonuclease across the DNA-binding site reveals transient intermediates and conformational changes of the enzyme during binding and catalytic turnover," *EMBO J.* **17**, pp. 6757–6766, 1998.
- [45] E. R. Hildebrandt and N. R. Cozzarelli, "Comparison of recombination in vitro and in *E. coli* cells : measure of the effective concentration of DNA in vivo," *Cell* **81**, pp. 331–340, 1995.
- [46] A. Jeltsch, C. Wenz, F. Stahl, and A. Pingoud, "Linear diffusion of the restriction endonuclease EcoRV on DNA is essential for the function of the enzyme," *EMBO J.* **15**, pp. 5104–5111, 1996.
- [47] L. E. Engler, K. K. Welch, and L. Jen-Jacobson, "Specific binding by EcoRV endonuclease to its DNA recognition site GATATC," *J. Mol. Biol.* **269**, pp. 82–101, 1997.
- [48] M. Guthold, X. Zhu, C. Rivetti, G. Yang, N. H. Thomson, S. Kasas, H. G. Hansma, B. Smith, P. K. Hansma, and C. Bustamante, "Direct observation of one-dimensional diffusion and transcription by escherichia coli RNA polymerase," *Biophys. J.* **77**, pp. 2284–2294, 1999.
- [49] S. J. T. Van Noort, K. O. Van der Werf, P. M. Eker, C. Wyman, B. De Grooth, N. F. Van Hulst, and J. Greve, "Direct visualization of dynamic protein-DNA interactions with a dedicated atomic force microscope," *Biophys. J.* **74**, pp. 2840–2849, 1998.
- [50] C. Bouchiat, M. D. Wang, J. F. Allemand, T. Strick, S. M. Block, and V. Croquette, "Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements," *Biophys. J.* **76**, pp. 409–413, 1999.
- [51] Z. Bryant, M. D. Stone, J. Gore, S. B. Smith, N. R. Cozzarelli, and C. Bustamante, "Structural transitions and elasticity from torque measurements on DNA," *Nature* **424**, pp. 338–341, 2003.

BIBLIOGRAPHIE

- [52] S. B. Smith, L. Finzi, and C. Bustamante, "Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads," *Science* **258**, pp. 1122–1126, 1992.
- [53] T. R. Strick, J. F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, and V. Croquette, "The elasticity of a single supercoiled DNA molecule," *Science* **271**, pp. 1835–1837, 1996.
- [54] M. Washizu, O. Kurosawa, I. Arai, S. Suzuki, and N. Shimamoto, "Applications of electrostatic stretch-and-positioning of DNA," *IEEE Trans. Ind. Appl.* **31**, pp. 447–456, 1995.
- [55] F. Dewarrat, M. Calame, and C. Schönenberger, "Orientation and positioning of DNA molecules with an electric field technique," *Single Mol.* **3**, pp. 189–193, 2002.
- [56] P. S. Doyle, B. Ladoux, and J. L. Viovy, "Dynamics of a tethered polymer in shear flow," *Phys. Rev. Lett.* **84**, pp. 4769–1772, 2000.
- [57] A. Bensimon, A. Simon, A. Chiffaudel, V. Croquette, F. Heslot, and D. Bensimon, "Alignment and sensitive detection of DNA by moving interface," *Science* **265**, pp. 2096–2098, 1994.
- [58] D. Bensimon, A. Simon, V. Croquette, and A. Bensimon, "Stretching DNA with a receding meniscus : experiments and models," *Phys. Rev. Lett.* **74**, pp. 4754–4757, 1995.
- [59] J. F. Allemand, D. Bensimon, L. Jullien, A. Bensimon, and V. Croquette, "pH dependent specific binding and combing of DNA," *Biophys. J.* **73**, pp. 2064–2070, 1997.
- [60] J. F. Allemand, *Thèse de doctorat de l'université Pierre et Marie Curie*, 1997.
- [61] A. Benight and R. Wartell, "Influence of basepairs changes and cooperativity parameters on the melting curves of shorts DNAs," *Biopolymers* **22**, pp. 1409–1425, 1983.
- [62] X. Michalet, R. Ekong, F. Fougereuse, S. Rousseaux, C. Schurra, N. Hornigold, M. Van Slegtenhorst, J. Wolfe, S. Povey, J. S. Beckmann, and A. Bensimon, "Dynamic molecular combing : stretching the whole human genome for high-resolution studies," *Science* **277**, pp. 1518–1523, 1997.
- [63] B. Geron-Landre, T. Roulon, P. Desbiolles, and C. Escudé, "Sequence-specific fluorescent labeling of double-stranded DNA observed at the single molecule level," *Nucl. Acids Res.* **31**, p. e125, 2003.
- [64] Z. Gueroui, *Thèse de doctorat de l'ENS Lyon*, 2002.
- [65] T. Perkins, D. E. Smith, and S. Chu, "Single polymer dynamics in an elongational flow," *Science* **276**, pp. 2016–2021, 1997.
- [66] D. E. Smith, H. P. Babcock, and S. Chu, "Single-polymer dynamics in steady shear flow," *Science* **283**, pp. 1724–1727, 1999.

-
- [67] T. T. Perkins, D. E. Smith, R. G. Larson, and S. Chu, "Stretching of a single tethered polymer in a uniform flow," *Science* **268**, pp. 83–87, 1995.
- [68] B. Ladoux and P. S. Doyle, "Stretching tethered DNA chains in shear flow," *Europhys. Lett.* **52**, pp. 511–517, 2000.
- [69] S. R. Quake, H. P. Babcock, and S. Chu, "The dynamics of partially extended single molecules of DNA," *Nature* **264**, pp. 151–154, 1997.
- [70] C. Bustamante, J. F. Marko, E. D. Siggia, and S. Smith, "Entropic elasticity of lambda-phage DNA," *Science* **265**, pp. 1599–1600, 1994.
- [71] B. H. Zimm, "Extension in flow of a DNA molecule tethered at one end," *J. Chem. Phys.* **24**, pp. 269–278, 1956.
- [72] M. Doi and S. F. Edwards, *The theory of polymer dynamics*, Oxford Science, 1986.
- [73] R. G. Larson, T. T. Perkins, D. E. Smith, and S. Chu, "Hydrodynamics of a DNA molecule in a flow field," *Phys. Rev. E* **55**, pp. 1794–1797, 1997.
- [74] F. Brochard, "Deformations of one tethered chain in strong flows," *Europhys. Lett.* **23**, pp. 105–111, 1993.
- [75] F. Brochard, "Polymer chains under strong flows : stems and flowers," *Europhys. Lett.* **30**, pp. 387–392, 1995.
- [76] B. H. Zimm, "Extension in flow of a DNA molecule tethered at one end," *Macromolecules* **31**, pp. 6089–6098, 1998.
- [77] T. Nikiforov, "Oligonucleotide attachment to QDot streptavidin conjugates," *QDots Vision* **2**, pp. 12–14, 2004.
- [78] X. Meng, W. Cai, and D. C. Schwartz, "Inhibition of restriction endonuclease activity by DNA binding fluorochromes," *J Biomol Struct Dyn.* **13**, pp. 945–951, 1996.
- [79] S. Matsuura, J. Komatsu, K. Hirano, H. Yasuda, K. Takashima, S. Katsura, and A. Mizuno, "Real-time observation of a single DNA digestion by exonuclease under a fluorescence microscope field," *Nucl. Acids Res.* **29**, p. e79, 2001.
- [80] M. Nirmal, B. O. Dabbousi, M. G. Bawendi, J. J. Macklin, J. K. Trautman, T. Harris, and L. Brus, "Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals," *Nature* **383**, pp. 802–804, 1996.
- [81] K. T. Shimizu, R. G. Neuhauser, C. A. Leatherdale, S. A. Empedocles, W. K. Woo, and M. G. Bawendi, "Blinking statistics in single semiconductor nanocrystal quantum dots," *Phys. Rev. B* **63**, pp. 205311–205316, 2001.
- [82] X. Brokmann, J. Hermier, G. Messin, P. Desbieres, J. P. Bouchaud, and M. Dahan, "Statistical aging and non ergodicity in the fluorescence of single nanocrystals," *Phys. Rev. Lett.* **90**, p. 120601, 2003.
- [83] S. Bonneau, L. Cohen, and M. Dahan, "Single quantum dot tracking based on perceptual grouping using minimal paths in a spation temporal volume," *IEEE Transactions in Image Processing* **accepté pour publication**, 2005.

BIBLIOGRAPHIE

- [84] M. Dahan, S. Levi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau, and A. Triller, "Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking," *Science* **302**, pp. 442–445, 2003.
- [85] C. Conti, S. Caburet, C. Schurra, and A. Bensimon, "Molecular combing," *Current protocols in Cytometry*. **8.10**, pp. 1–23, 2001.
- [86] T. Roulon, C. Hélène, and C. Escudé, "A ligand-modulated padlock oligonucleotide for supercoiled plasmids," *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, pp. 1523–1526., 2001.
- [87] F. Winkler, D. Banner, C. Oefner, D. Tsernoglou, R. Brown, S. Heathman, R. Bryan, P. Martin, K. Petratos, and K. Wilson, "The crystal structure of EcoRV endonuclease and of its complexes with cognate and non-cognate DNA fragments," *EMBO J.* **12**, pp. 1781–1795, 1993.
- [88] J. D. Taylor, I. G. Badcoe, A. R. Clarke, and S. E. Halford, "EcoRV restriction endonuclease binds all DNA sequences with equal affinity.," *Biochemistry* **30**, pp. 8743–8753, 1991.
- [89] I. B. Vipond, G. S. Baldwin, and S. E. Halford, "Divalent metal ions at the active sites of the EcoRV and EcoRI endonucleases," *Biochemistry* **34**, pp. 697–704, 1995.
- [90] G. S. Baldwin, R. B. Sessions, S. G. Erskine, and S. E. Halford, "DNA cleavage by the EcoRV restriction endonuclease : roles of divalent metal ions in specificity and catalysis," *J. Mol. Biol.* **288**, pp. 87–103, 1999.
- [91] A. Yildiz, J. N. Forkey, S. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman, and P. Selvin, "Myosin V walks hand-over-hand : single fluorophore imaging with 1.5-nm resolution," *Science* **300**, pp. 2061–2066, 2003.
- [92] H. J. Gruber, C. D. Hahn, G. Kada, C. K. Riener, G. S. Harms, W. Ahrer, T. G. Dax, and H. G. Knaus, "Anomalous fluorescence enhancement of Cy3 and Cy3.5 versus anomalous fluorescence loss of Cy5 and Cy7 upon covalent linking to IgG and noncovalent binding to avidin," *Bioconjugate Chem.* **11**, pp. 696–704, 2000.
- [93] J. R. Taylor, M. M. Fang, and S. Nie, "Probing specific sequences on single DNA molecules with bioconjugated fluorescent nanoparticles," *Anal. Chem.* **72**, pp. 1979–1986, 2000.
- [94] L. Jen-Jacobson, M. Kurpievski, D. Lesser, J. Grable, H. W. Boyer, J. M. Rosenberg, and P. J. Greene, "Coordinate ion pair formation between EcoRI endonuclease and DNA," *J. Biol. Chem.* **258**, pp. 14638–14646, 1983.
- [95] D. S. Lidke, P. Nagy, R. Heintzmann, D. J. Arndt-Jovin, J. N. Post, H. E. Grecco, E. A. Jares-Erijman, and T. M. Jovin, "Quantum dots ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction," *Nature Biotechnology* **22**, pp. 198–203, 2004.
- [96] S. Husale, W. Grange, and M. Hegner, "DNA mechanics affected by small DNA interacting ligands," *Single Mol.* **3**, pp. 91–96, 2002.

- [97] R. E. Thompson, R. D. Larson, and W. W. Webb, "Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes," *Biophys. J.* **82**, pp. 2775–2783, 2002.
- [98] S. G. Erskine, G. S. Baldwin, and S. E. Halford, "Rapid-reaction analysis of plasmid DNA cleavage by the EcoRV restriction endonuclease," *Biochemistry* **36**, pp. 7567–7576, 1997.
- [99] J. Alves, C. Urbanke, A. Fliess, G. Maas, and A. Pingoud, "Fluorescence stopped-flow kinetics of the cleavage of synthetic oligodeoxynucleotides by the EcoRI restriction endonuclease," *Biochemistry* **28**, pp. 7879–7888, 1989.
- [100] X. Gao, Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. K. Chung, and S. Nie, "In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots," *Nat. Biotechnol.* **22**, pp. 969–976, 2004.
- [101] C. Luccardini, F. Vial, V. Marchi-Artzner, M. Dahan, and C. Tribet, "Size, polydispersity and interaction with lipid membranes of quantum dots coated with an amphiphilic macromolecule," **en préparation**.
- [102] M. Barbi, C. Place, V. Popkov, and M. Salerno, "A model of sequence dependent protein diffusion along DNA," *Phys. Rev. E* **70**, p. 041901, 2004.
- [103] H. Qian, M. P. Sheetz, and E. L. Elson, "Single particle tracking analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems," *Biophys. J.* **60**, pp. 910–921, 1991.

De nombreuses protéines doivent localiser de courtes séquences-cibles sur de longues molécules d'ADN. Le temps nécessaire à cette localisation est souvent beaucoup plus court que celui qui résulterait d'une diffusion 3D des protéines. Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour rendre compte de l'efficacité remarquable du processus de localisation (diffusion 1D le long de l'ADN, sauts...). Cependant, malgré les nombreuses études menées par des biochimistes depuis plus de vingt ans, en particulier sur les enzymes de restriction EcoRI et EcoRV, à ce jour aucune expérience n'a pu trancher définitivement entre les différents mécanismes proposés.

Au cours de cette thèse, nous sommes parvenus à observer en microscopie de fluorescence l'interaction entre une enzyme de restriction EcoRV individuelle et une molécule d'ADN. Pour cela, nous avons développé une technique permettant d'étirer les molécules d'ADN au-dessus d'une surface, et nous avons couplé les enzymes EcoRV à des nanocristaux semi-conducteurs, sondes très fluorescentes non sujettes au photoblanchiment. Les enzymes ainsi marquées, toujours actives, sont détectables avec une résolution spatiale de l'ordre de 10 nm et une résolution temporelle de 20 ms.

Nous avons observé de nombreux événements d'association/dissociation d'enzymes sur les molécules d'ADN étirées. L'analyse de ces événements nous a permis de mesurer la constante de dissociation des enzymes couplées, de mettre en évidence une diffusion facilitée d'EcoRV le long de l'ADN et d'estimer les caractéristiques de cette diffusion.

Mots-clés : ADN, EcoRV, molécule individuelle, interaction ADN-protéines, nanocristaux, microscopie de fluorescence.

Many proteins have to localize short target sequences on long DNA molecules. The time necessary for the localization is often much shorter than the upper limit estimated for a 3D diffusion process. Several mechanisms have been proposed to account for this extraordinary efficiency (1D diffusion along DNA, jumps...). However, in spite of the large number of studies performed by biochemists in the last twenty years, especially on EcoRI and EcoRV enzymes, a clear conclusion regarding the involved mechanisms has not yet been reached.

In this work, we used fluorescence microscopy to observe the interaction between a single EcoRV enzyme and a DNA molecule. To achieve this aim, we developed a new technique to stretch DNA on a surface, and we labeled EcoRV enzymes with quantum dots, which are very bright dyes that are devoid of photobleaching. The labeled enzymes were still active and could be detected with a spatial resolution close to 10 nm and a temporal resolution of 20 ms.

We observed many association/dissociation events of enzymes on stretched DNA molecules. The analysis of these events allowed us to measure the dissociation rate of the labeled enzymes, and provided evidence for a facilitated diffusion of EcoRV along DNA, whose characteristics could be obtained.

Keywords : DNA, EcoRV, single molecule, DNA-proteins interaction, quantum dots, fluorescence microscopy.