HAL
open science

Étude de MutS à l'échelle de la molécule unique

Fabien Guillemot

To cite this version:

Fabien Guillemot. Étude de MutS à l'échelle de la molécule unique. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2007. Français. NNT : . tel-00186125

HAL Id: tel-00186125

https://theses.hal.science/tel-00186125v1

Submitted on 8 Nov 2007

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.

ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE - DÉPARTEMENT DE PHYSIQUE

Laboratoire Pierre Aigrain

Thèse de Doctorat de l'Université Paris VII

spécialité : Physique des liquides

présentée par :

Fabien Guillemot

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris VII

Étude de MutS à l'échelle de la molécule unique

Soutenue le 13 février 2007
devant le jury composé de :

M.	Paolo Galatola	Président
M.	Mounir Maaloum	Rapporteur
M.	Yvan Matic	Rapporteur
M.	Didier Chatenay	Examinateur
M.	François Heslot	Directeur de thèse

Remerciements

« Un ami c'est une route, un ennemi c'est un mur. »

Proverbe chinois

Je veux tout d'abord remercier chaleureusement François Heslot pour son encadrement qui permet une grande liberté de travail, tout en ayant une présence rassurante dès que besoin, il a su me faire profiter de son expérience et de ses intuitions. Il a su me remotiver malgré les difficultés rencontrées, pour cela encore une fois merci.

Je remercie également les membres du jury : Yvan Matic et Mounir Maaloum qui ont accepté le travail de rapporteur, ainsi que Didier Chatenay pour sa présence malgré mon erreur. Merci également à Paolo Galatola qui a accepté d'être le représentant Paris 7 de cette thèse.

Merci également à Claude Delalande de m'avoir accepté au sein du laboratoire Pierre Aigrain, je tiens aussi à remercier les membres de ce laboratoire (chefs d'équipes, thesards, jeunes, secrétaires, techniciens).

Merci à tous les membres de l'équipe Physique du vivant : Le « professeur » Côte, « MC » Thomen, Alexandre Dawid (avec qui j'ai travaillé sur les jonctions de Holliday), Camille Brème (avec qui j'ai travaillé sur MutS et les jonctions de Holliday), pour leur gentillesse et les nombreuses discussions à la fois pour le boulot, mais également plus informelles à la cantines, ou devant un café. Je salue les stagiaires que j'ai côtoyés et encadrés et particulièrement Peyman Memari pour son travail sur le bromure d'éthidium.

Je remercie également ma famille et mes amis qui savent tout ce que je leur dois.

Table des matières

Introduction **9**

1 La réparation des erreurs d'appariement de l'ADN **11**
1.1 Existence d'un système de réparation 12
1.1.1 Première preuves de l'existence d'un système de réparation . . . 12
1.1.2 Reconnaissance du brin à réparer 13
1.2 La réparation des erreurs d'appariement chez *Escherichia coli* 13
1.2.1 Les protéines d'initiation du système de réparation chez *E. coli* 13
1.2.2 Le système réparation chez *E. coli* 14
1.3 La protéine qui initie la réparation des erreurs d'appariement chez *E. coli* : MutS 15
1.3.1 Les formes cristallisées 16
1.3.2 MutS, l'ATP et l'ADP 17
1.3.3 MutS et la reconnaissance des dommages causés à l'ADN 22
1.4 MutL, et sa relation avec MutS 23
1.4.1 Présentation de MutL 23
1.4.2 L'activation de MutL par MutS est-elle ATP dépendante ? . . . 24
1.5 La protéine qui crée une cassure simple brin : MutH 24
1.6 Effet de MutS et MutL sur la recombinaison 25
1.7 Les analogues bactériens de MutS 26
1.7.1 MutS chez *Thermus aquaticus* 26
1.7.2 MutS chez *Thermus thermophilus* 26
1.8 Les analogues de MutS, MutL et MutH chez les eucaryotes 27
1.8.1 Présentation des analogues chez les eucaryotes 27
1.8.2 Reconnaissance du brin à réparer 29
1.8.3 Fixation sur les mésappariements 29
1.8.4 Effet de l'ATP sur les analogues 29
1.9 Les mécanismes proposés 30
1.9.1 Le modèle de translocation 31
1.9.2 La pince coulissante 31

1.9.3 Le modèle de recherche dans l'espace 32
1.9.4 La polymérisation 33

2 Montages expérimentaux 35
2.1 La Pince Magnétique 35
2.1.1 Présentation 35
2.1.2 Montage 35
2.1.3 Méthode de mesure 36
2.1.4 La mesure de force 36
2.2 Le piège optique 39
2.2.1 Présentation du montage 39
2.2.2 De la lumière vient la force 39
2.2.3 Mesure de force 39
2.3 Comparaisons pince magnétique et piège optique 41
2.3.1 Effet des montages sur les biomolécules 41
2.3.2 Les différences dans le mode d'application de la force 41
2.3.3 Avantages et désavantages propres à chaque montage 42
2.3.4 Utilisation des deux montages 42
2.4 Microscopie électronique 42
2.4.1 Préparation des grilles de microscopie 43
2.4.2 Mise en place d'une expérience 43
2.4.3 Avantages et inconvénients de la technique utilisée 44

3 Étude de MutS à l'échelle de la molécule unique 45
3.1 Constructions d'ADN 45
3.2 Premières observations 45
3.2.1 Observations en l'absence d'ATP et à bas sel sur une molécule sans mésappariement 46
3.2.2 Observations en l'absence d'ATP et à haut sel sur une molécule sans mésappariement 48
3.2.3 Observations en présence d'ATP sur une molécule sans mésappariement 48
3.2.4 Effet de la concentration en MutS sur une molécule sans mésappariement 48
3.2.5 Observations expérimentales sur une molécule avec mésappariement 49
3.3 Ajout d'un surfactant : disparition des effets de MutS 50
3.4 Effet de l'ajout de MutS sur l'élasticité de la molécule 53
3.5 Discussion des résultats 54

4 Micromanipulation d'une jonction de Holliday 59
4.1 Expériences sur une jonction de Holliday 59
4.2 Article : PRL **96**, 188102 (2006) 60
4.3 Supplementary data 64

5 Effet du Bromure d'Ethidium sur la torsion d'une molécule d'ADN 69
5.1 Présentation du bromure d'éthidium 69
5.2 Expériences en torsion 70
5.3 Effet de stabilisation de l'EtBr 72
5.3.1 Préparation de l'ADN simple brin 72
5.3.2 Le bromure d'éthidium stabilise les paires de bases non complémentaires 73
5.3.3 Ouverture de l'ADN en présence de bromure d'éthidium 74
5.4 Discussion des résultats 75

Conclusion 77

A L'ADN et la production d'erreurs d'appariements 79
A.1 L'ADN 79
A.1.1 Un polymère 79
A.1.2 Structure de ce polymère 79
A.1.3 Propriétés mécaniques de l'ADN 80
A.2 La réplication de l'ADN 83
A.2.1 Le processus de réplication 84
A.2.2 Les polymérases : des protéines presque parfaites 84
A.2.3 Les erreurs d'appariements lors de la réplication 85
A.2.4 Lésions d'ADN dues à la réplication 86
A.3 La recombinaison 87
A.3.1 La recombinaison et les jonctions de Holliday 87
A.3.2 Réparation par recombinaison 88
A.3.3 Production d'erreurs lors de la migration des jonctions de Holliday 88

B Protocoles expérimentaux 91
B.1 Constructions d'ADN 91
B.1.1 Schéma de préparation des ADN intervenant dans les constructions 91
B.1.2 Séquence des oligonucléotides 92
B.1.3 Protocole 94
B.2 Efficacité de rinçage d'un capillaire 94
B.3 Gels d'électrophorèse 95
B.3.1 Principe de l'électrophorèse 95
B.3.2 Visualisation 96
B.3.3 L'électrophorèse en champ pulsé 96

Bibliographie 99

Introduction

« Mesure la profondeur de l'eau avant de t'y plonger. »

Proverbe arabe

« Je viens de réaliser tardivement que l'ADN est tellement précieux qu'il doit exister probablement des mécanismes de réparation », écrivait en 1974 Francis Crick, dans une rétrospective sur la découverte que lui et Watson avait fait vingt et un ans plus tôt [29]. L'ADN pour être transmis de façon fidèle doit comporter peu d'erreur lors de la réplication et l'action des agressions chimiques, ou des UV doit être limitée. Pour y faire face, la nature a adopté de nombreuses stratégies pour réparer ces lésions, qui peuvent être létales à terme pour les cellules.

Un des mécanismes de réparation consiste à remplacer une base qui n'est pas appariée correctement. L'existence de ce mécanisme de réparation des erreurs d'appariement a été prouvé *in vivo* en 1975 [131, 126], puis reconstitué *in vitro* [79]. Il intervient pour réparer les erreurs d'appariement qui peuvent apparaître pendant la réplication mais également lors de la recombinaison.

L'un des mécanismes de réparation des erreurs d'appariement, appelé « réparation à longue distance », fait intervenir en particulier les protéines MutS et MutL. MutS semble être la protéine qui initie la réparation, tandis que le rôle de MutL n'est pas bien connu. Le mécanisme de réparation induit par MutS est très particulier car il a la capacité d'agir à distance entre une erreur d'appariement et le déterminant indiquant quel est le brin à réparer. Ce mécanisme d'action à distance reste à l'heure actuelle une énigme. De nombreuses hypothèses ont été proposées : activité mécanique de formation de boucles, polymérisation le long de l'ADN, pince coulissante qui se déplace le long de l'ADN ; cependant parmi ces hypothèses, aucune n'a été tranchée. Les expériences en molécule unique sont un moyen pour chercher à observer et caractériser l'activité de la protéine MutS en vue de déterminer le mécanisme d'action cette protéine.

Une première partie dresse un bilan des connaissances sur la protéine MutS. Le chapitre suivant présente les outils que nous avons utilisés pour étudier MutS à l'échelle de la molécule unique Nous exposons les résultats dans un troisième chapitre. Les deux derniers chapitres sont d'autres expérience que j'ai réalisées durant ma thèse : expériences de micromanipulation d'ADN cruciforme et modifications des propriétés d'une molécule d'ADN en présence d'un intercalant, le bromure d'éthidium.

Chapitre 1

La réparation des erreurs d'appariement de l'ADN

« La science ne sert guère qu'à nous donner une idée de l'étendue de notre ignorance. »

Félicité de Lamennais

Il existe des systèmes de réparation des erreurs d'appariement[1] de l'ADN, chez tous les êtres vivants. La grande conservation à travers l'évolution du système, basé sur les protéines MutS, MutL et leurs analogues, permet de supposer que ces protéines, existant à la fois chez les procaryotes et les eucaryotes et mises en jeu durant ce processus partagent des mécanismes d'action ayant certaines similitudes. L'étude de ce processus de réparation des mésappariements chez les mammifères a été stimulée par la découverte de prédisposition au cancer chez des individus possédant des mutations dans des gènes du système de réparation [43].

Des mésappariements ou des boucles d'insertion peuvent être produits lors de la réplication (*cf* annexe A). Ces erreurs sont réparées par le système de réparation des erreurs d'appariement. Le brin d'ADN étant constitué de deux simples brins complémentaires (*cf* annexe A), il est alors nécessaire de distinguer le brin matrice du brin à corriger. Cette discrimination de brin peut être locale, on parle de « short patch repair » ; ou elle peut reposer sur un signal à « longue distance », on parle de « long patch repair ». C'est ce dernier système qui permet d'obtenir une réparation des erreurs de réplication. Les organismes peuvent avoir différents stratégies de reconnaissance du brin à réparer, mais ils font tous appels pour la réparation dite à « longue distance » à des protéines appartenant à la famille de MutS et MutL qui sont des protéines clés associées à la réparation et initialement étudiées chez la bactérie *Escherichia coli*.

Des erreurs d'appariement ou des boucles d'insertion peuvent aussi se produire lors de la formation d'hétéroduplexes entre deux molécules qui se recombinent et dont la séquence peut être légèrement différente (*cf* annexe A). Le système de réparation des

[1] paires de bases non-complémentaires dans une molécule d'ADN, que nous appellerons dans la suite mésappariement (*cf* annexe A)

erreurs d'appariement reconnaît alors les erreurs produites et exerce une contrôle sur la production de ces hétéroduplexes.

Enfin ce système reconnaît également certaines modifications de l'ADN dues à des agressions chimiques durant lesquelles une base peut être altérée.

De nombreuses revues sont disponibles sur le sujet dont les plus récentes permettent d'avoir une vue générale sur le sujet (voir en particulier [77, 61, 109]). Ce chapitre se focalisera essentiellement sur des données obtenues chez la bactérie *Escherichia coli*, tout en faisant une brève présentation des connaissances chez les autres organismes, afin de compléter les résultats obtenues sur *E. coli* de ceux obtenus chez les autres organismes.

1.1 Existence d'un système de réparation

1.1.1 Première preuves de l'existence d'un système de réparation

Les premières hypothèses de l'existence d'un système de réparation ont été suggérées par R. Holliday en 1964 [58] qui a proposé un mécanisme pour expliquer la conversion de gènes découvert à travers l'étude de nombreux champignons[2], Il a proposé l'existence de molécules d'ADN en croix : les jonctions de Holliday (*cf* section A.3) qui permettent un échange de de brins entre deux molécules d'ADN. Cet échange de brin est associé à la migration de la jonction. Au cours de cette migration, des mésappariements peuvent survenir là où les deux molécules d'ADN diffèrent ; la migration est supposée se produire même si les doubles brins formés ne sont pas exactement complémentaires ce qui a fait suggérer à Robin Holliday dans ce même article l'existence d'enzymes de réparation des mésappariements [58].

Les premières preuves directes de l'existence d'un système de réparation ont été apportées par Meselson *et al* en 1975 [131, 126]. Leurs expériences consistaient à infecter une bactérie *E. coli* avec un bactériophage λ préparé artificiellement et contenant un ou plusieurs mésappariements localisés dans des gènes associés à des phénotypes facilement identifiables. Ils ont observé que différents mésappariements sont réparés avec des efficacités différentes. De plus si l'hétéroduplexe contient deux mésappariements, ou plus, proches sur le brin, une analyse des descendants suggère que la réparation s'est faite sur un seul brin, et que les mésappariements proches étaient coréparés. Ces observations ont été interprétées comme étant dues à un mécanisme de réparation par excision, avec une excision pouvant avoir lieu sur une distance allant jusqu'à 3000 paires de bases.

Ce système de réparation intervient également dans la stabilité du génome pour empêcher les recombinaisons intrachromosomale illégitimes [105]. Il intervient aussi dans la formation de barrière inter-espèce, interdisant la conjugaison entre espèce voisine [108].

[2]La conversion de gène est un phénomène observé au cours de la méiose et qui se traduit par un échange inégal d'information génétique entre deux molécules d'ADN homologues

1.1.2 Reconnaissance du brin à réparer

Le système de réparation doit dans un premier temps déterminer quel est le brin à réparer. Meselson *et al*, en 1976 [126] ont postulé pour *E. coli* que cette discrimination de brin se faisait grâce à un phénomène secondaire de modification partielle des brins d'ADN : la méthylation de l'ADN. Le brin père est méthylé alors que le brin fils qui vient d'être synthétisé ne l'est pas encore.

Ce mécanisme est dû à des enzymes (les Dam-méthylases) présentes chez *Escherichia coli* qui reconnaissent certains enchaînements de base (les sites : GATC) et qui ajoutent un groupement méthyl à la position N^6 des adénines du groupe 5'GATC. Pendant une brève période, après la réplication, le brin nouvellement synthétisé n'est pas methylé. L'asymétrie du double brin due à la méthylation est un mécanisme qui permet ensuite la discrimination entre brin père et brin fils [84].

Cela fut confirmé chez *E. coli* : des doubles brins hémiméthylés sont réparés, des brins non méthylés sont réparés mais sans préférence d'un des deux brins comme brin référence, enfin un double brin méthylé n'est pas réparé [87]. Il a été également observé que des mutants sans Dam-méthylase étaient sujet à une augmentation du taux de mutations [88, 44], de même que des mutants qui la produisent en excès [57, 89]. Ce dernier effet peut être interprété par la réduction du temps durant lequel l'ADN est hémiméthylé, ce qui réduit les possibilités de réparation.

1.2 La réparation des erreurs d'appariement chez *Escherichia coli*

1.2.1 Les protéines d'initiation du système de réparation chez *E. coli*

L'étude *in vivo* de bactéries *Escherichia coli* ou *Salmonella* présentant un taux de mutation anormalement élevé a permis de mettre en évidence qu'une inactivation des gènes *mutS, mutL et mutH* augmentait le taux de mutation des cellules [28]. D'autres expériences chez *Escherichia coli* ont effectivement montré *in vivo* que ces trois gènes entraient en jeux pour la réparation d'erreur d'appariements. L'inactivation de *mutS* ou *mutL* conduit à une augmentation du taux d'erreur de près de deux ordres de grandeur [44, 106]

Des expériences *in vitro* à partir d'extrait de cellule, ont confirmé l'importance de ces trois loci [87] puis le système complet de réparation a été reproduit *in vitro* [79].

Les enzymes qui initient la réparation chez *E. coli* sont au nombre de trois : MutS [119], MutL [51] et MutH [129] ; sans MutS ou MutL, il n'y a pas de réparation. D'autres protéines sont impliquées dans un second temps dans le système de réparation, elles sont données figure 1.1.

Dans les parties suivantes je ne ferai référence qu'aux manipulations faites sur les protéines de *E. coli*.

1.2.2 Le système réparation chez *E. coli*

Des manipulations in vitro sur gel ont montré qu'en l'absence d'ATP MutS se fixe préférentiellement sur une molécule d'ADN qui possède un mésappariement [119, 118, 67]. Ce n'est pas le cas de MutL seule [51]. MutH est activée en présence de MutS, MutL et d'ATP et d'un mésappariement : elle incise le brin d'ADN à réparer [79].

MutS est donc *a priori* la protéine qui initie la réparation des erreurs d'appariement chez *E. coli*. Il a été montré *in vitro* que MutL se fixe à l'hétéroduplexe, en présence de MutS et d'ATP [114]. L'assemblée de ce complexe MutS-MutL en présence d'ATP est nécessaire pour activer la protéine MutH qui va inciser le nouveau brin au niveau d'un site GATC hémiméthylé [129]. Il est intéressant de noter que la réparation est bidirectionnelle [27], c'est à dire que l'incision peut se produire d'un côté ou de l'autre du mésappariement et sur une distance qui peut aller jusqu'à plusieurs milliers de bases [7]. Il est supposé que la cassure simple brin effectué par MutH sert de signal pour diriger la réparation par excision [61]. Ensuite l'hélicase II est chargée sur un des brins de la double hélice au niveau de la cassure du brin d'ADN et permet son déroulement [136]. L'hélicase II a une directionnalité pour sa translocation le long de l'ADN simple brin, elle doit donc s'installer soit sur le brin néosynthétisé, soit sur l'autre brin, selon la position de l'incision par rapport au mésappariement. De même, pour dégrader transitoirement le brin à réparer, des exonucléases 3'exo ou 5'exo selon la position du mésappariement par rapport au site incisé [50], vont intervenir. Si la cassure simple brin, induite par MutH, se produit sur la partie du brin qui va du mésappariement vers le 5' (figure 1.1 à gauche), la correction nécessite l'activité hydrolytique 5' vers 3' de l'exonucléase VII ou de l'exonucléase RecJ. Si la cassure se produit vers le 3', alors l'activité nécessite l'exonucléase I. La partie simple brin d'ADN ainsi formée est stabilisée par des protéines SSB[3]. L'absence de protéines SSB diminue l'efficacité de réparation *in vitro* [79]. La partie simple brin est resynthétisée par une ADN-polymérase III, et finalement une ADN ligase restaure la continuité du brin réparé [79, 97, 61].

L'efficacité *in vivo*, de ce système, dépend du type de mésappariement. Le système reconnaît et répare les mésappariements : G-T, G-G, C-A A-A, T-T, T-C, A-G. La réparation des mésappariements G-A et C-T est moins efficace et dépend du contexte de séquence [31,69]. Par contre le mésappariement C-C n'est pas réparé par ce système [61]. Des mésappariements d'insertion ou de délétion contenant jusqu'à trois paires non appariées sont également réparés par ce système, par contre avec quatre paires de bases non appariées, la réparation se fait moins bien, et avec cinq paires de bases non appariées la réparation n'est pas détectable [102, 115].

[3] « single strand binding protein », protéines qui se fixent sur le simple brin

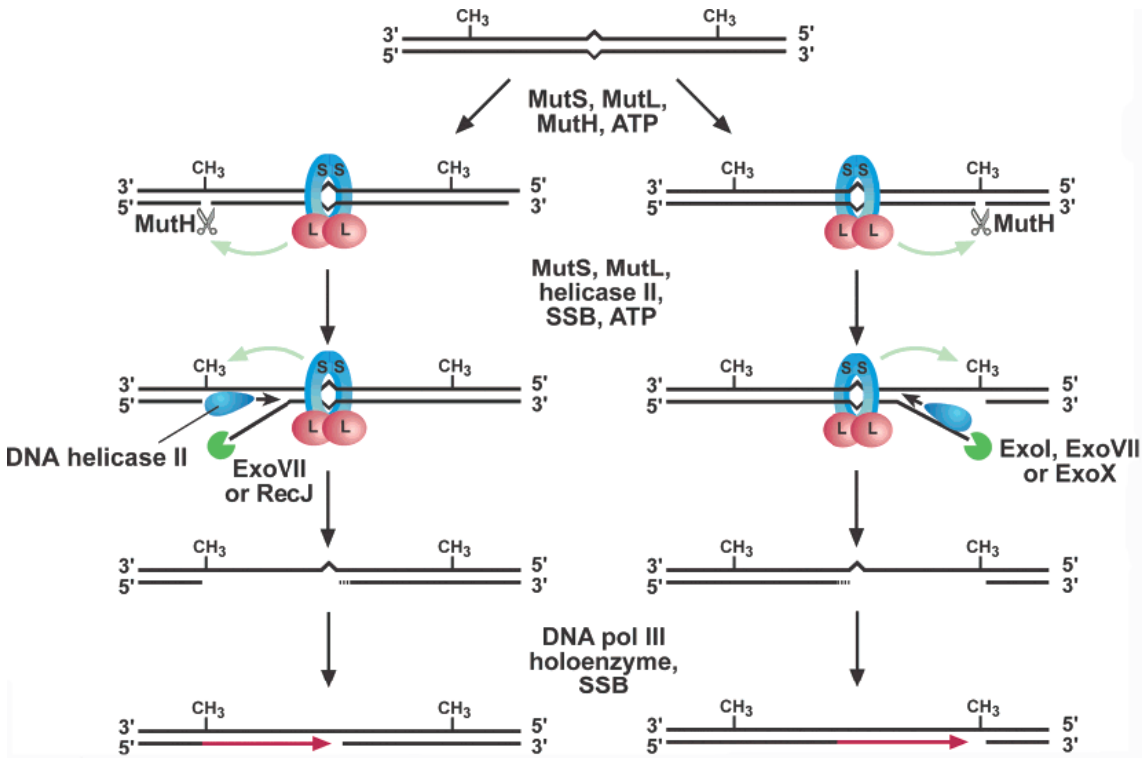

Figure 1.1 - Schéma des étapes de la réparation chez *Escherichia coli* des erreurs d'appariement. Les flèches vertes indiquent les « signaux » envoyés par MutS et MutL entre les sites impliqués lors de la réparation. Les différentes étapes présentées ont été identifiées au moyen d'expériences *in vitro* et *in vivo*. Figure tirée de [61]

1.3 La protéine qui initie la réparation des erreurs d'appariement chez *E. coli* : MutS

MutS est la protéine qui initie la réparation des erreurs d'appariement chez *E. coli* : elle se fixe au mésappariement et permet le démarrage de la réparation [119, 61].

Cette protéine est un polypeptide de 97 kDa soit 97 $g \cdot mol^{-1}$ [119] qui existe en solution sous forme de dimères et de tetramères [14].

Des expériences d'électrophorèse sur gel, avec des fragments d'ADN d'environs 50 bases, ont montré que, sans ATP, MutS se fixe préférentiellement aux molécules d'ADN contenant un mésappariement ainsi que des boucles d'insertion/deletion de une à quatres bases [109]. On observe, toujours par migration sur gel, une affinité variable selon le mésappariement avec dans un ordre décroissant d'affinité : GT > GG > AA ≈ TT ≈ TC > CA > GA > CC > GC [20]. La fixation dépend aussi du contexte de la séquence [119]. On remarquera que cette affinité de fixation reflète l'efficacité de réparation du système complet (*cf* section 1.2.2).

Cependant la fixation de MutS sur un ADN de petite taille (environ 50 paires de

bases) contenant un mésappariement, n'est qu'environ dix fois supérieure à la fixation non spécifique, sur un ADN ne contenant pas de mésappariement [71]. Cette différence d'affinité observé *in vitro*, sur des petits fragments, parait faible, comparée à la très grande spécificité finale du mécanisme de réparation *in vivo* qui améliore la fidélité de réplication de près d'un facteur 100. Sur un génome de $4,7.10^6$ paires de bases chez *Escherichia coli* [84], la présence du système de réparation conduit à moins d'une erreur par réplication de génome.

1.3.1 Les formes cristallisées

MutS est une protéine difficile à cristalliser. Ce n'est que récemment (en 2000) que celle-ci a été cristallisée avec un mutant de MutS : le MutSΔ800 qui est une protéine MutS de *Escherichia coli*, tronquée des derniers 53 acides aminés de l'extrémité C-terminale. Les cristaux ont été réalisés sous forme de complexe avec de l'ADP et de l'ADN contenant différents mésappariements : G-T [81], C-A, A-A, G-G et une boucle d'insertion contenant une base T seule [99] (figure 1.2). Plus récemment, en 2004, des structures cristallines du complexe MutSΔ800-ATP-ADN ont été réalisées (figure 1.3) [80].

La structure de ce MutSΔ800 est constitué de cinq grands domaines, appelés : « Mismatch » (I), « Connector »(II), « Core »(III), « Clamp et Lever » (IV) et « ATPase et HTH » (V) (figure 1.2). En présence d'ADP, il forme des dimères reliés par les domaines IV et V , avec une structure ressemblant à la lettre Θ [59] ou à une pince entourant l'ADN (cf figure 1.2) (les auteurs de l'article [66] ont utilisé le terme de mains en prière pour décrire la position de MutS sur l'ADN autour du mésappariement).

Le dimère de MutS possède deux canaux : un premier (le plus large) qui est formé des sous unités I et IV qui se fixent à l'ADN et l'entourent au niveau du mésappariement ; et un deuxième canal, qui est formé entre les domaines I, II, III et V, dont la fonction n'est pas encore connue mais dont la charge (électrique positive) et la taille suggère qu'il pourrait aussi incorporer potentiellement un segment d'ADN [81, 59].

Cette structure sous forme de dimère est asymétrique : un seul des monomères se fixe au mésappariement et fixe de l'ADP, l'autre monomère possède le site fixant l'ADP mais celui-ci est vide [81]. De plus l'interaction de MutS avec l'ADN induit un angle de la molécule d'ADN de l'ordre de 60° [81, 99]. Cet angle peut être dû au mésappariement qui est susceptible de changer localement la courbure de l'ADN [96]. Il a été ainsi argumenté que ce changement de courbure et/ou de flexibilité locale pourrait être un moyen de reconnaissance du mésappariement. Des observations par AFM ont également montré que l'ADN forme un angle d'environ 60° quand MutS est fixé dessus que ce soit selon un mode spécifique ou non spécifique [127].

Lorsqu'on observe la structure obtenue en remplaçant l'ADP par de l'ATP [82] (figure 1.3) on ne remarque pas de différences notables entre cette structure et celle obtenue avec de l'ADP. Les deux monomères fixent de l'ATP, mais avec des différences de conformation, ce qui rappelle l'asymétrie observée dans les structures effectuées avec de l'ADP (*cf* ci-dessus). En effet un des monomère fixe l'ATP dans une position telle

que cet l'ATP semble prêt à être hydrolysé, tandis que l'autre monomère fixe l'ATP dans une position qui ne serait pas favorable à l'hydrolyse [80]. De plus on observe sur la figure 1.3 la présence de boucles qui semblent fermer la structure autour du mésappariement [80].

Malheureusement des expériences faites sur le mutant MutSΔ800 ont montré que son activité n'était pas équivalente à celle de la protéine sauvage.

Lorsque le gène du mutant MutSΔ800 est sur un plasmide multicopie[4] et est introduit dans une bactérie dont le gène MutS est inactivé, la bactérie ne présente pas de différences significatives pour la réparation des erreurs par rapport à une bactérie sauvage [24]. Par contre il n'y a pas d'anti-recombinaison[5] ni de réparation des dommages dus au cisplatine[6] [24].

Dans le cas ou MutSΔ800 est introduit en copie unique sur le chromosome, à la place du gène MutS intact, on observe des différences par rapport à une souche contenant MutS : il n'y a plus de réparation des erreurs d'appariements dans la bactérie qui a le gène du MutSΔ800.

Par ailleurs il a été montré *in vitro* que MutSΔ800 avait une moins bonne affinité de fixation sur les mésappariements que MutS sauvage [14, 24]. Enfin MutS sauvage peut former des tetramères ce que ne fait pas le MutSΔ800 et ce dernier a, *in vitro*, une moins bonne efficacité pour induire l'excision par MutH [14].

Les 53 acides aminés de l'extrémité C-terminale sont donc essentiels pour la réparation [23], dans le cas où la protéine n'est pas fortement sur-exprimée.

1.3.2 MutS, l'ATP et l'ADP

Activité ATPase de MutS

L'activité ATPase de MutS est nécessaire à la réparation *in vivo* [135] et l'hydrolyse de l'ATP est nécessaire pour l'initiation de la réparation *in vitro* [7].

Dans les dimères de MutS il y a deux sites ATPases qui ont différentes affinités pour l'ADP et l'ATP. Cette différence est compatible avec l'asymétrie observée dans les structures cristallines [81, 82].

Il a été montré que MutS fixe l'ADP et l'AMPPNP[7] avec une affinité similaire lorsqu'il n'y a pas d'ADN. La protéine a, sous forme de dimère, un site de plus grande affinité pour l'ADP et un site de plus grande affinité pour l'ATP. Ces sites peuvent être occupés simultanéments. Cela a servi d'argument pour conclure que la protéine existe en solution essentiellement sous forme de complexe ATP-MutS-MutS-ADP [15]. La spécificité de ces sites n'est pas absolue car une grande concentration d'AMPPNP peut déplacer l'ADP de MutS, laissant supposer que deux molécule AMPPNP peuvent

[4] Un plasmide multicopie est plasmide qui se réplique pour former plusieurs copies dans une bactérie donnée

[5] les effets de MutS sur la recombinaison sont présentées dans la partie 1.6

[6] les propriétés du cisplatine et son effet sur les bactéries sont expliquées dans la partie 1.3.3

[7] 5'-adenylylimidodiphosphate, analogue non-hydrolysable de l'ATP

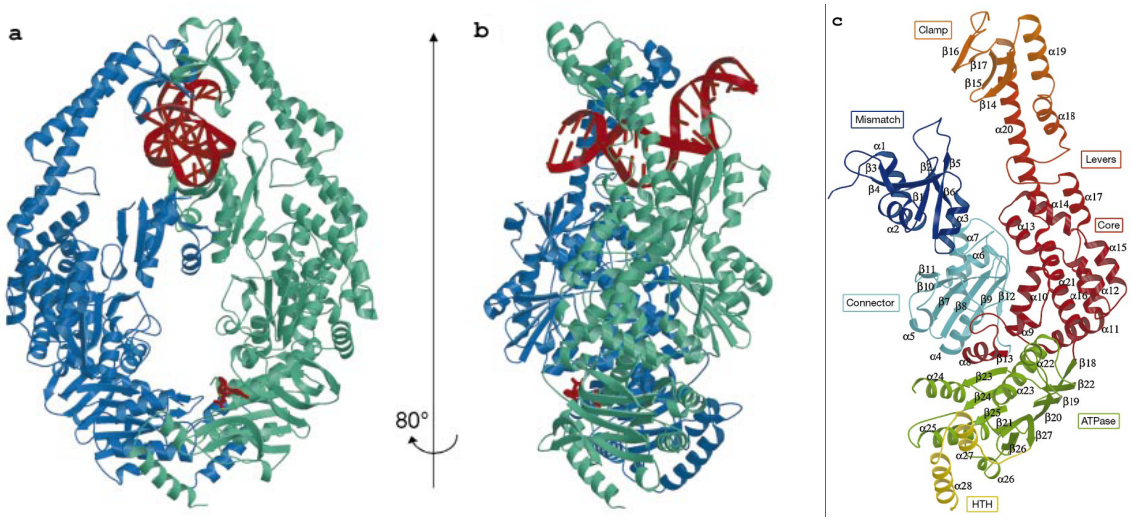

Figure 1.2 - Représentation en ruban d'un complexe MutS-ADN-ADP. En a et b on a représenté deux sous unités de MutS (une bleue, une verte), l'ADN et l'ADP sont représentés en rouge. En c, on a représenté un monomère de MutS seul, avec la dénomination des différents domaines (images tirées de [81]). On remarque la présence d'un deuxième canal en bas et au milieu du dimère.

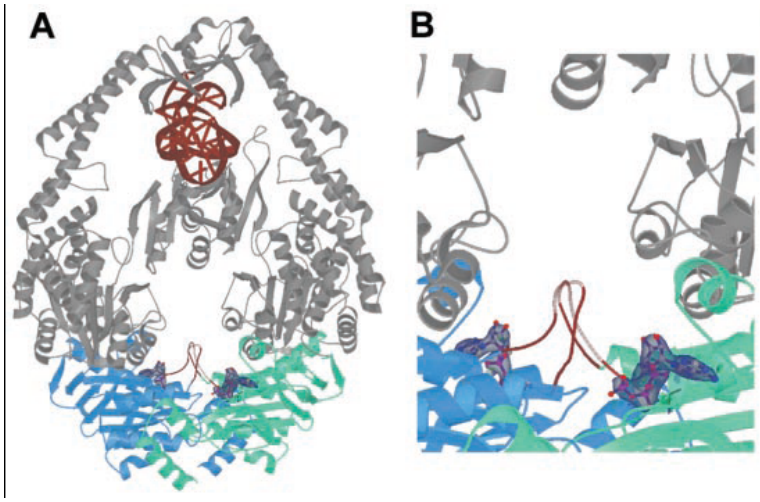

Figure 1.3 - Représentation en ruban d'un complexe MutS-ADN-ATP. A : Vue du complexe avec les domaines ATPases des monomères colorés respectivement en vert et bleu, la molécule d'ATP est en bleu foncé, les "signature loops" sont en rouge. Le reste de la molécule est en gris et l'ADN en rouge foncé. B : vu agrandie de A montrant la position des nucléotides et de boucles qui semblent fermer la structure autour de l'ADN [80].

se fixer au dimère de MutS [77]. Enfin l'ajout d'un excès d'ADP est un compétiteur de l'ATPγS [8] [15].

Il a été montré *in vitro* que MutS possède une activité ATPase avec cependant un taux d'hydrolyse faible de l'ordre de 2 à 26 min^{-1} par dimères sans ADN [61]. Cette hydrolyse est stimulée au moins d'un facteur quatre par la présence d'ADN sous forme d'homoduplexes ou d'hétéroduplexes [13, 1, 77]. L'activité dépend des conditions expérimentales. En mesurant la concentration de phosphate produit lors de la réaction d'hydrolyse avec un ADN de 41 paires de bases et à 37 °C, il a été montré que l'activité ATPase de MutS dépend de la concentration en sel NaCl [1]. Le maximum de l'activité ATPase en présence d'un mésappariement a été observé pour une gamme de concentration en sel NaCl comprise entre 100 et 160 mM. En dessous de 50 mM et au dessus de 250 mM en sel, on ne peut distinguer aucune différence entre l'activité ATPase en présence d'un mésappariement ou sans mésappariement [1]. Avec une analyse à 100 mM en sel NaCl, les mêmes auteurs ont montré que le taux d'hydrolyse était de $5,3$ min^{-1} en présence d'un mésappariement G-T, de $3,1$ min^{-1} pour un homoduplexe et de $1,8$ min^{-1} sans ADN [1]. En outre l'activité ATPase dépend de la longueur de l'ADN : cette activité est moins importante avec une molécule de 50 paires de bases contenant un mésappariement qu'avec une molécule de 20 paires de bases contenant un mésappariement [13].

Ces observations (influence de la concentration en sel, et de la taille de l'ADN) rendent souvent difficiles les comparaisons entre les publications. Par exemple si on compare les expériences de Bjornson *et al* [13] et celles de Acharya *et al* [1] on se rend compte que dans un cas l'activité ATPase est plus grande sans ADN qu'avec [13] et inversement dans l'autre [1]. L'origine de cette différence pourrait provenir soit de la taille de l'ADN utilisé : 20 paires de bases pour Bjornson *et al* et 41 paires de bases pour Acharya *et al* ; soit de la concentration en sel NaCl : Bjornson *et al* utilisent 20 mM de KCl et Acharya *et al* 100 mM NaCl.

Effet de l'ATP sur la fixation de MutS sur un mésappariement

Des expériences de résonance plasmonique de surface[9] ont été réalisées à 25 °C en utilisant des ADN de 41 paires de bases. Ces expériences ont montré pour l'affinité de fixation de MutS sur l'ADN (hétéroduplexes ou homoduplexes) que la présence ou non d'ATP n'avait que peu d'influence [16]. Ces expériences ont également montré que

[8] adenosine5'-O-(3-thiotriphosphate), autre analogue de l'ATP très peu hydrolysable

[9] La résonance plasmonique de surface permet une mesure de la quantité d'un « ligand » (ici MutS) se fixant sur un « récepteur » (ici l'ADN) lui-même attaché à la surface d'un substrat contenant une couche métallique fine. Un faisceau de lumière incident crée dans la couche métallique des excitations de type plasmon qui se traduisent par des variations de la lumière réfléchie. Les plasmons étant très sensibles à leur environnement immédiat, la mesure des propriétés de la lumière réfléchie est sensible à l'indice de la solution, au voisinage immédiat (moins de 100 nm) de la couche métallique. Le système détecte donc une variation de l'indice quand des ligands se fixent aux récepteurs. La mesure n'est cependant pas en général calibrée et ne permet pas un dosage car on ne connaît pas la densité d'ADN fixé sur la surface.

le complexe ADP-MutS-ADN se dissocie de l'ADN en présence d'ATP ou d'ATPγS. En présence de 50 mM KCl le temps de dissociation est de l'ordre de 200 s [16]. Des expériences de retard sur gel ont montré que le complexe ADP-MutS-ADN sur un ADN linéaire (hétéroduplexe ou homoduplexe) dont les extrémités ne sont pas bloquées, se dissocie en présence d'ATP, et également en présence d'ATPγS [16, 1, 110]. L'ATP et l'ATPγS diminuent donc l'affinité de MutS pour les mésappariements.

Différentes expériences de retard sur gels avec des ADN courts, de l'ordre de la centaine de bases, ont été menées en « bloquant » les extrémités soit à l'aide d'une jonction de Holliday [110] soit avec de la streptavidine [16]. Si les deux cotés de l'ADN sont bloqués, on observe une diminution du taux de dissociation de MutS en présence d'ATP sur un hétéroduplexe. De plus, que ce soit avec le blocage via la streptavidine ou avec des jonctions de Holliday, on ne voit pas de différences de migration dans le gel, entre la présence d'ATP ou non. Toujours par observation de retard sur gel, il suffit en fait d'un seul côté bloqué avec la streptavidine pour que MutS reste lié à l'ADN en présence d'ATP et d'un mésappariement [16]. Par contre si un seul côté est bloqué par une jonction de Holliday, d'autres auteurs ont observé que MutS se dissocie en présence d'ATP et d'un mésappariement [110]. Ces deux résultats paraissent contradictoires. On peut faire l'hypothèse que MutS pourrait reconnaître la streptavidine comme une erreur d'appariement, mais il n'existe pas d'expériences permettant d'affirmer ou d'infirmer cela. On remarquera de plus que les expérience de résonnance plasmonique de surface sont effectuées avec des substrats dont la surface a été modifiée par greffage de polymères, et ancrage de streptavidine. Les fragments d'ADN sont biotinylés et se fixent donc sur cette surface. On peut se demander si une partie du signal observé n'est pas due à des fixations non-spécifiques de MutS sur cette surface.

Il a également été proposé pour interpréter les expressions de retard sur gel montrant une faible spécificité de fixation de MutS sur des petits fragments d'ADN contenant un mésappariement que MutS pourrait également se fixer en partie sur les extrémités des molécules d'ADN utilisées [1], mais cela n'a pas été observé par des expériences de microscopie électronique [4] ou d'AFM [127].

Agrégation de MutS en présence de mésappariement et d'ATP

En utilisant des expériences de diffusion dynamique de la lumière[10] effectuées à température ambiante ($\simeq 22$ °C) [98], il a été montré qu'une solution de MutS à une concentration de $0,15$ μM, sans nucléotides et sans ADN, forme des agrégats de petits rayon ($R_h \simeq 10 - 12$ nm). Toujours sans ATP, et à une concentration en MutS de $0,15$ μM ces agrégats ont leur rayon qui augmente en présence d'un homoduplexe de 121 paires de bases ($R_h \simeq 14$ nm) ; l'accroissement de taille monte à 18-20 nm en présence d'hétéroduplexes de 121 paires de bases avec un mésappariement unique. Une solution

[10] appelée en anglais « Dynamic light scattering » ou encore « Photon correlation spectroscopy » : technique utilisant la dispersion de la lumière d'un laser dans une suspension colloïdale. À partir des fluctuations d'intensité on obtient des informations sur le coefficient de diffusion des particules. En connaissant la viscosité de milieu on peut remonter au diamètre des particules, appelé Rayon hydrodynamique (R_h).

de MutS à une concentration de $0,15$ μM, et sans ADN, forme de très grands agrégats en présence d'ATP ($R_h > 500$nm), mais pas en présence d'analogues peu hydrolysables de l'ATP (ATPγS). L'addition d'hétéroduplexes ou d'homoduplexes diminue la taille de l'agrégat de façon équivalente. Enfin les complexes MutS-ADN forment, à hautes concentrations en ATP (10 mM) des agrégats plus grands en présence d'hétéroduplexes, comparativement à ceux formés avec des homoduplexes.

Des expériences faites par résonance plasmonique de surface ne font pas apparaître ce type de phénomène [8]. Cependant dans ces expériences : (i) des effets de surfaces ne sont peut-être pas négligeables, (ii) les fragments d'ADN sont immobilisés à une extrémité ce qui pourrait rendre très difficile une éventuelle agrégation entre molécules d'ADN.

Ces expériences de diffusion dynamique de la lumière, démontrant des effets importants d'agrégations, suggèrent que les expériences de retard sur gel ou de résonnance plasmonique de surface n'ont pas données des informations nécessairement relevantes si l'agrégation est le mode d'action de MutS pour induire la réparation. En effet, pour les expériences de retard sur gel, la taille typique des mailles du gel empêche la pénétration d'agrégats d'ADN éventuels, si leur taille est trop grande. Dans les articles abordant des études de retard sur gel avec MutS, les photos présentées incluent rarement les « puits » de départ et dans le cas où ceux-ci apparaissent, on y voit souvent des accumulations résiduelles importantes mais très peu discutées ou évoquées.

En conclusion ces expériences de diffusion de lumière font ressortir un mode éventuellement coopératif de fixation de MutS sur l'ADN.

MutS formerait des boucles d'ADN en présence d'ATP

Des expériences de microscopie électronique, sur des ADN d'environs 6 kb possédant un mésappariement, tendent à montrer que MutS en présence d'ATP formerait des boucles sur l'ADN. Des photographies obtenues en faisant varier le temps entre le début de la réaction en présence de MutS et la fixation de l'échantillon sur une surface pour l'observation, tendent à montrer que la taille moyenne des boucles augmente avec le temps. Ce phénomène n'est pas observé en présence d'AMPPNP. MutS n'est pas nécessairement localisé sur le mésappariement, il y a des boucles qui contiennent le mésappariement et d'autres qui ne le contiennent pas [49, 4]. La majorité de ces expériences ont été faites avec une étape de fixation en présence de glutaraldéhyde, qui crée des liaisons covalentes entre l'ADN et les protéines. Les auteurs précisent cependant qu'ils ont observé le même phénomène sans fixation au glutaraldéhyde, en refroidissant très rapidement les échantillons, les complexes étant ensuite rincés et déposés sur grille pour les observations. Encore une fois se pose la question des agrégats observés en présence de MutS [98] et éventuellement non visibles lors de ces expériences car il y a rinçage [4]. Les auteurs argumentent que MutS ne reste pas sur le mésappariement et forme des boucles en présence d'ATP.

La vitesse estimée de croissance des boucles varie entre 370 paires de bases par minutes et 10000 paires de bases par minutes [4] et les auteurs estiment que la boucle

est stabilisé par un tetramère de MutS [4, 14]. Un des problèmes avec ces résultats est qu'il est délicat de les rendre compatibles avec le taux d'hydrolyse de l'ATP par MutS, estimé par ailleurs, qui est d'environ 1 hydrolyse par minute et par monomère [13]. En effet une vitesse de 10 kb/min correspond à 1 kb en 6 secondes, c'est-à-dire environ 170 bases par secondes (soit 50 nm/s) pour la vitesse de translocation. Si on se base sur un taux d'hydrolyse de MutS par minute et par monomère (donc 4 par minutes par tétramères), une hydrolyse d'ATP serait associée à 750 bases (soit 230 nm) de translocation de la boucle. Ce « rendement » de 1 ATP/230 nm parait singulièrement élevé par rapport à celui d'autres protéines capables de réaliser des déplacements : pour la kinesine 1 ATP/8nm, pour la polymerase 1 ATP/0,3 nm [123]. Si on se base sur une énergie d'hydrolyse de l'ATP d'environ 10 kT, la force typique développée ne peut excéder environ 0,2 pN à comparer à 5 pN et 100 pN respectivement pour la kinésine et la polymérase. Une force aussi faible parait peu adaptée pour permettre de lutter contre d'éventuelles blocages dus par exemple à des fixations de protéines sur l'ADN qui empêcherait l'avancé de la boucle

Enfin ces observations de microscopie électronique n'ont jamais été reproduites par d'autres équipes.

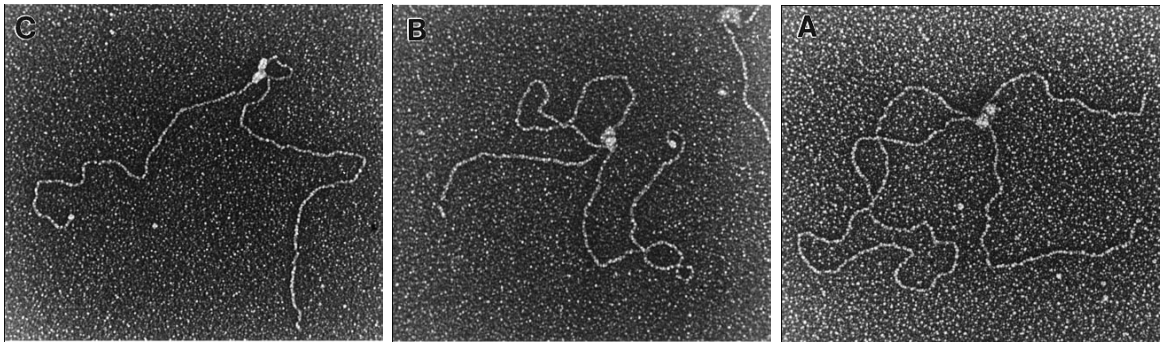

Figure 1.4 - Observation en microscopie électronique des boucles en présence de MutS et après fixation au glutaraldéhyde sur une molécule d'ADN contenant un mésappariement(images tirées de [4])

1.3.3 MutS et la reconnaissance des dommages causés à l'ADN

MutS reconnaît également certains dommages chimiques de l'ADN causée par des agents alkylant ou du *cis*-diamminedichloroplatinum(II) (Cisplatine). Les agents alkylant et plus particulièrement N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) génèrent notamment une lésion O^6-methylguanine (O^6MeG) sur l'ADN. Cette base G modifiée peut s'apparier avec une base cytosine ou thymine [103, 104]. Le cisplatine réagit sur l'ADN préférentiellement sur les atomes N^7 des bases puriques. Il peut aussi former des pontages intra- et inter-brins. Il s'agit majoritairement (90%) de pontages intrabrins 1,2 d(GpG) et d(ApG). Minoritairement il se forme des pontages intrabrins de type 1,3 d(GpNpG) (N étant un des nucléotides) et des pontages interbrins entre les

sites d(GpC/GpC) [40]. Ces deux lésions sont létales pour les cellules des eucaryotes et pour certaines bactéries [43]. Les effets cytotoxiques de ces produits sont même utilisés comme médicaments anticancéreux, mais leur efficacité est parfois mitigée par le développement de résistances, un phénomène qui a été attribué pour partie à des défauts du système de réparation des erreurs d'appariement [61].

L'implication du système de réparation dans la toxicité du cisplatine et du MNNG a été décrit chez *E. coli*. Les bactéries sauvages de *E. coli* sont relativement résistantes à ces produits, par contre des bactéries qui n'ont plus de Dam méthylases sont tuées plus facilement par ces agents, enfin cette sensibilité ne se retrouve plus quand on introduit des mutations des gènes mutS ou mutL [61, 41, 72].

MutS se fixe sur un ADN qui possède un appariement O^6MeG-C [107]. Elle reconnaît la plus importante lésion due au ciplatine : 1,2-d(GpG), mais pas les nombreux autres types de lésions, dont la lésion d(ApG) considérée comme très similaire [40].

Un modèle basé sur ces observations, suggère que la reconnaissance de l'appariement O^6MeG-C par le système de réparation des erreurs d'appariement, entraîne une répétition de cycles inutiles de réparation (c'est-à-dire excision et synthèse d'un nouveau brin utilisant le brin endommagé comme matrice), qui entraînerait la mort de la bactérie. En l'absence de système de réparation, le O^6MeG est toléré par la cellule et devient une lésion non létale. [56]

1.4 MutL, et sa relation avec MutS

1.4.1 Présentation de MutL

Cette protéine est la moins bien connue quant à son rôle dans la réparation ; elle est nécessaire pour que la réparation ait lieu [51, 79].

Elle a un poids moléculaire de 67,924 kD et peut former un complexe avec MutS sur un ADN avec un mésappariement. L'empreinte de MutS sur l'ADN augmente en présence de MutS [79]. L'interaction entre MutL et MutS est mal connue [43]. On sait cependant qu'une fois le complexe MutS-MutL « activé » par un mésappariement, le domaine N-terminal de MutL peut se fixer de façon non-spécifique à l'ADN et stimuler l'activité de MutH [10, 54].

Les études sur les mutants de MutL qui n'hydrolysent pas l'ATP donnent des résultats suivants : l'hydrolyse de l'ATP n'est pas nécessaire pour la formation du complexe MutS-MutL sur un hétéroduplexe [1, 111]. Par contre l'activité ATPase de MutL est nécessaire pour activer MutH [9].

La structure cristalline de la protéine MutL entière n'est pas disponible. Néanmoins la structure de certains fragments a été déterminée : le fragment 1-349 (partie N-terminale), ainsi que les acides aminés 432-615 (partie C-terminale) [10, 9, 59, 52]. Les structures cristallines, à partir de l'extrémité C-terminale, semblent suggérer que MutL s'assemble en dimère qui entoure l'ADN [52, 43].

1.4.2 L'activation de MutL par MutS est-elle ATP dépendante ?

Différentes expériences ont été effectuées pour tenter de déterminer si MutS a besoin d'hydrolyser l'ATP pour activer MutL. Ces manipulations ont donné des résultats contradictoires.

Des analyses *in vivo* et *in vitro* faites sur des mutants de MutS (G619D et G614D) qui n'ont pas de fonction ATPase, ont montré qu'ils ne réparaient pas [132]. Par ailleurs d'autres expériences faites sur le mutant E694A qui fixe l'ATP mais ne l'hydrolyse pas, ont montré sur des expériences de résonance plasmonique de surface que la formation du complexe MutS-E694A-MutL n'était pas observé sur un ADN de 201 paires de bases contenant un mésappariement G-T [8]. Par contre des expériences de retard sur gels ont montré que la protéine MutS-E694A permet la formation du complexe MutS-E694A-MutL sur un ADN de 110 paires de bases contenant une base T non appariée [111]. Cependant ce complexe n'est pas détectable par technique d'empreinte [11] [111], suggérant que le complexe est mobile sur l'ADN.

1.5 La protéine qui crée une cassure simple brin : MutH

Cette protéine de 25 kDa est une endonucléase qui a de nombreuses homologies avec les enzymes de restrictions de type II [11]. Une structure cristalline de MutH est disponible [11], qui montre que la protéine est constituées de deux lobes reliés par une région flexible. Sur un ADN double brin hémiméthylé, MutH clive en 5' du G de la séquence GATC sur le brin non-méthylé [129, 7]. Si l'ADN double brin n'est pas méthylé, MutH peut cliver les deux brins d'ADN en deux fois, ce qui entraîne une cassure double brin [7]. Le taux de clivage est faible en l'absence de MutS et MutL, mais il est fortement augmenté en leurs présences [129, 7]. Il a été également montré que la seule présence de MutL suffisait à augmenter le taux de clivage dû à MutH [54]. Cette activation en l'absence de MutS et d'un mésappariement suggère que MutL est la protéine du complexe MutS-MutL qui active MutH durant la réparation des erreurs d'appariements.

Il est supposé que la cassure simple brin effectué par MutH sert de signal pour diriger la réparation par excision [61]. En effet, des expériences *in vivo* et *in vitro* ont montré que l'existence d'une cassure simple brin permettait au système de réparation de se passer de MutH et du site GATC hemiméthylé [79, 83].

Il a été montré *in vitro* qu'un complexe MutS-MutL fixé sur une ADN double brin de petite taille (oligonucléotide) et contenant un mésappariement, mais pas de séquences GATC hémiméthylé, peut activer le clivage par MutH d'un autre fragment d'ADN contenant un site GATC hémiméthylé [71]. On a retrouvé cette effet en «

[11] En anglais «DNAse footprinting», méthode utilisée pour déterminer la séquence d'ADN sur laquelle se fixe une protéine. La «DNAse footprinting» utilise une enzyme (la DNAse) qui va cliver le brin d'ADN à chaque base, le clivage n'ayant pas lieu sur la région d'ADN où le ligand est fixé à l'ADN.

trans » lorsqu'un mésappariement qui se trouve sur un bras d'une jonction de Holliday synthétisé, peut activer une incision de MutH sur une séquence GATC se trouvant sur un autre bras [110]. Ces expériences, *in vitro* tendent à montrer l'existence d'une activation « trans », même si cette dernière parait peu fréquente *in vivo* car susceptible alors de donner lieu à de multiples cycles d'excisions inutiles.

1.6 Effet de MutS et MutL sur la recombinaison

Le complexe MutS-MutL est essentiel pour la sauvegarde de l'intégrité du génome, et exerce ainsi un contrôle sur l'échange de séquences entre différentes espèces. Les bactéries *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli*, dont les génomes présentent une divergence de séquence d'environ 10%, ne font normalement pas de conjugaison[12], mais lorsqu'il y a des mutations de MutS ou MutL dans l'une des espèces, la bactérie mutée peut alors incorporer de l'ADN de l'autre dans son génome. En d'autres termes le système MutS-MutL joue également un rôle dans la barrière inter-espèces chez les bactéries [108, 93].

Les mésappariements pouvant apparaître lors de la recombinaison sont reconnus par MutS. Des expériences *in vivo* de recombinaison entre deux segments d'ADN quasi homologues, ont montré que la fréquence de recombinaison était augmentée d'un facteur dix lorsque des mutations inactivaient les gènes mutS ou mutL [105].

MutS-MutL n'ont aucun effet sur les recombinaison homologues ce qui suggère que le blocage de la recombinaison par MutS-MutL nécessite la présence d'un ADN intermédiaire avec un ou plusieurs mésappariements. Il a été montré sur des expériences *in vitro* d'échange de brin, catalysées par RecA, entre un ADN simple brin circulaire et un ADN double brin linéaire, que MutS en présence de 2 mM d'ATP empêche cette réaction lorsque l'hétérologie de séquences entre les ADN se recombinant est de 3% [133]. Il a été également montré que MutL améliore l'efficacité de l'action anti recombinante de MutS ; par contre pour MutL seule sans MutS il n'a pas été observé d'effet d'anti-recombinaison [133]. Cela suggère que MutL a un rôle similaire à celui qu'elle a lors de la réparation des erreurs de réplication. Elle n'intervient que si MutS est fixé sur un mésappariement. Enfin ce système a besoin d'ATP pour fonctionner.

MutS ne se fixe pas sur une molécule d'ADN contenant une jonction de Holliday [111, 110], contrairement à ce qui avait été proposé théoriquement avec une analyse des structures cristallographiques [124].

Les études d'échange de brin ont également été abordé sur la même configuration, en présence du complexe RuvAB . Ce dernier aide à passer plus rapidement les 3% d'hétérologies de séquences [62], mais n'améliore pas le taux final d'échange de brins entre les molécules d'ADN [35]. Enfin, MutS et MutL en présence d'ATP empêchent RuvAB d'améliorer la recombinaison entre des séquences hétérologues [35]. Finalement le même type d'expérience a été mené sur des intermédiaires de recombinaison dépro-

[12] la conjugaison est un échange d'information génétique utilisée par les bactéries, elle consiste en une transmission d'ADN entre une bactérie donneuse et une bactérie receveuse

téinisés (RecA a été éliminé). A nouveau le complexe RuvAB facilite la recombinaison, même en présence d'hétérologies, mais est bloqué en présence de MutS et MutL, si il y a des hétérologies. Enfin, toujours sur des intermédiaires déprotéinisés, le blocage du complexe RuvAB n'est pas observé si on utilise un mutant de MutS incapable d'hydrolyser l'ATP.

Ces travaux suggèrent que le complexe MutS-MutL déstabilisent les complexes ADN-RecA et ADN-RuvAB sen présence de mésappariements multiples.

1.7 Les analogues bactériens de MutS

1.7.1 MutS chez *Thermus aquaticus*

L'analogue de MutS chez *Thermus aquaticus* (*Taq* MutS) a été très étudié. *Thermus aquaticus* est une bactérie thermophile qui vit dans des sources naturelles d'eau chaude à 70 °C. L'analogue de MutS est une protéine de 90,7 kDa. Cette protéine existe *in vitro* essentiellement sous forme de dimères en solution pour des concentrations de 1 µM. *In vitro* et dans une gamme de température de 4 à 70 °C, cette protéine se fixe sans ATP à de l'ADN contenant un mésappariement ou une base non appariée [12]. Ainsi pour un ADN de 37 paires de base à une concentration de 0,25 mM et avec 1,25 µM de MutS, il est observé une fixation de MutS sous forme de dimère [12].

La structure cristallographique de *Taq* MutS a été obtenue avec un mutant dont les 43 derniers amino-acides ont été retirés [101]. La structure de ce mutant de *Taq* MutS est très proche de celle de MutS [137], dans laquelle on retrouve les cinq domaines (cf partie 1.3.1). Malgré tout il y a quelques différences dans la structure obtenue en présence d'ADP car pour *Taq* le complexe a les deux sites de fixations de nucléotides occupés par de l'ADP [101] alors que chez *E. coli*, un des sites est occupé par de l'ADP alors que l'autre est vide [82]. De plus pour les sructures disponibles, *Taq* MutS est fixé à une base T non apparié alors que *E. coli* MutS est fixé à une paire G-T.

1.7.2 MutS chez *Thermus thermophilus*

L'analogue de MutS chez la bactérie *Thermus thermophilus* est une protéine de 91,4 acides aminés. Sa séquence d'acides aminés possède 56% d'homologie avec la protéine MutS de *Escherichia coli*. *Thermus thermophilus* MutS hydrolyse de l'ATP avec un taux maximum à 80 °C. Enfin des expériences sur gels ont montré que cette protéine existe sous forme de tétramères [121]. Elle reconnaît tous les types de mésappariements et les boucles d'insertions jusqu'à trois bases [130].

1.8 Les analogues de MutS, MutL et MutH chez les eucaryotes

La classification des homologues de MutS est basée sur la reconnaissance d'enchaînements d'acides aminés qui se conservent [38]. De nombreuses expériences ont donc été effectuées sur divers analogues de MutS obtenus chez différents organismes, de multiples homologues distincts pouvant exister chez un même organisme. La conservation de MutS et MutL à travers l'évolution permet de supposer des similarités de mécanismes à la fois chez les procaryotes et eucaryotes. De nombreuses propriétés de MutS se retrouvent chez les analogues, mais il existe des différences entre ces systèmes : par exemple il n'y a pas d'analogue de MutH chez les eucaryotes. Toutefois les différents mécanismes proposés reposent sur les manipulations faites soit avec les protéines de *E. coli*, soit avec d'autres homologues, je présenterai donc dans cette partie les principaux résultats obtenus sur ces analogues.

1.8.1 Présentation des analogues chez les eucaryotes

Les gènes homologues de la protéine MutS, appelés MSH pour MutS Homologues, ont été identifiés chez de nombreux eucaryotes comme les levures, les plantes les insectes, les nématodes et les mammifères [73, 97, 65, 74, 21, 37, 91]. Le système de réparation de mésappariements chez les eucaryotes présente des analogies avec le système de réparation des mésappariements chez *E. coli*, mais les protéines impliquées peuvent ne pas être les mêmes selon la nature de l'erreur (Tableau 1.1) [109, 77, 56]. La réparation est initiée par les protéines MSH2, MSH3 et MSH6, sous forme de complexes : MSH2-MSH6 (appelé aussi MutSα) ou MSH2-MSH3 (MutSβ) qui se fixent à un mésappariement. MutSα est l'initiateur de la réparation de petites boucles d'insertion et d'erreur d'appariements, et MutSβ est l'initiateur de la réparation de boucles d'insertion contenant jusqu'à 12 bases [94].

Il existe d'autres analogues de MutS qu'on ne considérera pas ici tels : MSH7 chez *Aradadopsis* [134], MSH4 et MSH5 qui ont un rôle lors de la recombinaison meïotique [109, 77, 61] ou encore MSH1 qui intervient lors des transactions mitochondriales chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, mais qui n'existe pas chez les mammifères [77, 61].

Les eucaryotes ont également des analogues de MutL, appelés MLH pour MutL Homologues, ou PMS car les mutants en pms1 avait une augmentation du niveau de ségrégation postméïotique (« Postmeiotic Segregation » en anglais). Ceux-ci forment différents hétérodimères (tableau 1.1) : MutLα (MLH1-PMS2 chez l'homme, MLH1-PMS1 chez la levure) est mis en jeu lors de la réparation de nombreux types de mésappariements ; les fonctions de MutLβ chez l'homme (MLH1-PMS1) ne sont pas connues, mais MutLβ chez la levure (MLH1-MLH2) et MutLγ (MLH1- MLH3) sont supposés participer à la réparation de boucles d'insertion [56, 77]. MutLγ est aussi mis en jeux dans la recombinaison meïotique [77].

Propriétés *in vitro* chez *E.coli*		**Levure**	**Mammifères**	**Propriétés *in vitro* chez les eucaryotes**
MutS	Se fixe aux mésappariements et aux petites boucles d'insertion	MSH1	$-^b$	Évite les mutations dans les mitochondries et protège des substitutions de bases
		MSH2	MSH2	Forme des hétérodimères avec : - MSH3 (appelé MutSβ) qui reconnaît les mésappariements et les boucles d'insertions de 1-2 bases - MSH6 (appelé MutSα) qui reconnaît des boucles d'insertion d'une seule base et les boucles d'insertions de plus de 2 bases
		MSH3	MSH3	Forme des complexes MutSβ avec MSH2
		MSH4	MSH4	Forme des complexes avec MSH5 pour promouvoir le « crossing over » durant la méiose
		MSH5	MSH5	Forme un complexe avec MSH4
		MSH6	MSH6	Forme le complexe MutSα avec MSH2 (appelé MutLα)
MutL	Interagit avec MutS en présence de mésappariement pour activer MutH	MLH1 PMS1 MLH2 MLH3	MLH1 PMS2 PMS1 MLH3	Forme des hétérodimères avec PMS1, MLH2 et MLH3 Forme des hétérodimères avec MLH1 (appelé MutLα) Forme des hétérodimères avec MLH1 (appelé MutLβ) Forme des hétérodimères avec MLH1
MutH	clive le brin non methylé sur un site GATC hemiméthylé	$-^b$	$-^b$	

$-^b$ pas identifié.

Tableau 1.1 - Analogues eucaryotes de MutS et MutL

Les eucaryotes n'ont pas d'analogues connus de MutH [77, 61].

1.8.2 Reconnaissance du brin à réparer

Chez les eucaryotes, les origines et l'identification des points d'entrée pour l'initiation de l'excision ne sont pas aussi bien caractérisées que pour *E. coli* [77, 61].

Chez *E. coli*, l'incision sur un site hémiméthylé permet de démarrer la réparation du brin qui possède un mésappariement. Les premières observations d'une réparation des mésappariements dans les cellules d'eucaryotes ont été effectuées en utilisant un ADN hétéroduplexe circulaire qui possédait avant la réparation une cassure simple brin [61]. L'incubation de ce type d'ADN avec des extraits cellulaires de *Drosophila melanogaster* ont montré qu'il existait une réparation de mésappariements G-T, A-C, A-A, G-A, G-G, T-T, C-T et C-C et des petites boucles d'insertion [36, 61, 43].

Le problème est que les eucaryotes n'utilisent pas la méthylation pour distinguer le brin à réparer. Le mécanisme de discrimination n'est pas encore élucidé [77, 74, 61]. Il a été proposé que les discontinuités dans la formation du nouveau brin synthétisé pouvait être le moyen de discrimination [64]

Enfin, le mécanisme complet qui a été reproduit *in vitro* pour *E. coli*, n'a pas été complètement caractérisé chez les eucaryotes [109, 61]

1.8.3 Fixation sur les mésappariements

Des expériences *in vitro* de retard sur gels, avec des ADN de petites tailles, ont montré, que les complexes Mutα et MutSβ avaient une affinité seulement 10 à 30 fois plus grandes pour les hétéroduplexes par rapport aux homoduplexes [90, 138]. Avec des manipulations sur molécule unique, en utilisant l'ouverture de l'ADN, c'est-à-dire la séparation mécanique progressive des brins de l'ADN double brin, on peut détecter la fixation éventuelle de protéines sur l'ADN double brin, car une telle fixation induit une augmentation de la force nécessaire pour séparer les brins. En utilisant un ADN hétéroduplexe présentant un unique mésappariement, il a été montré que sans ATP, le complexe MSH2-MSH6 avait une affinité pour les hétéroduplexes au moins trois ordres de grandeurs plus élevée que pour les hétéroduplexes [63]. Les manipulations sur molécules uniques ont l'avantage d'éviter les problèmes putatifs de fixation des protéines MSH aux extrémités de l'ADN [127, 138, 95]. On peut dès lors se questionner sur les affinités mesurées pour MutS, qui ne sont également que 10 fois plus grandes pour un hétéroduplexe par rapport à un homoduplexe [71] et se demander si l'affinité *in vivo* n'est pas plus grande que celle déterminée via des gels sur des ADN de petites tailles.

1.8.4 Effet de l'ATP sur les analogues

Comme pour MutS les analogues eucaryotes hydrolysent l'ATP avec un très faible taux. Cette activité ATPase est une fonction importante chez les analogues de MutS car

une mutation dans le domaine de fixation des nucléotides entraine un taux de mutation important par exemple chez la levure [53, 135]

En absence d'ADN le taux d'hydrolyse est de 7-14 min^{-1} pour MutSα de la levure [117, 2] et de $0.2 - 1$ min^{-1} pour le MutSα humain [45, 17, 46]. La variabilité des mesures paraissent dues à différentes conditions expérimentales. Par contre il y a consensus sur le fait que la présence d'ADN augmente le taux d'hydrolyse de l'ATP, mais cela dépend toutefois des conditions expérimentales [45, 17, 46, 5]. MutSα humain montre une augmentation de son taux d'ATPase de 10 à 20 fois [45, 17, 46] et pour la levure de 4 fois [61]. Les ADN hétéroduplexes sont de meilleurs activateurs que les homoduplexes pour les deux systèmes.

Des analyses de la fixation de nucléotides sur le complexe MutSα humain ont montré que comme pour *E. coli* MutS, il existe une asymétrie : il y a deux types de sites de fixation par dimères, un qui fixe préférentiellement l'ADP et l'autre préférentiellement l'ATP, ce qui suggère que le complexe ADP-MutSα-ATP serait l'espèce la plus présente en solution [92]. Cette asymétrie observée chez *E. coli* est plus marquée chez les analogues qui possèdent deux types de protéines par complexe.

Comme pour *E. coli* MutS, l'ADP modifie peu l'affinité de MutSα pour les hétéroduplexes, mais cette affinité est réduite en présence d'ATP et de Mg^{2+} [2, 18, 45, 92]. De plus par la technique de l'ouverture de l'ADN double brin, le point de blocage partiel induit sans ATP par la présence de MSH2-MSH6 disparaît en présence d'ATP.

1.9 Les mécanismes proposés

Le moyen qu'utilise le complexe MutS-MutL chez la bactérie *E. coli* pour communiquer à distance entre un mésappariement d'une part et un site GATC hémiméthylé de la molécule d'ADN, et MutH d'autre part (le site émiméthylé pouvant se trouver à des milliers de bases du mésappariement) n'est pas encore tranché. Différents modèles ont été proposés essentiellement composé de deux types : le premier modélise l'action de MutS-MutL par une recherche le long du squelette de l'ADN avec translocation soit « motorisée » avec éventuellement formation de boucles dans l'ADN ? soit « diffusive ». Le second type de modèle est une recherche aléatoire dans l'espace avec formation de boucle d'ADN pour assurer les contacts entre sites distants.

Ces modèles reposent sur des expériences faites avec MutS de *E. coli*, mais également sur des manipulations d'analogues à la fois bactériens et procaryotes. L'hypothèse est que la conservation de MutS et MutL à travers l'évolution permet de supposer qu'elles jouent un rôle équivalent dans le mécanisme à la fois chez les systèmes procaryotes et eucaryotes.

1.9.1 Le modèle de translocation

Ce modèle a été proposé par l'équipe de Paul MODRICH suite aux observations de microscopie électronique qui montrait la formation de boucles [4] et des expériences sur le taux d'hydrolyse de l'ATP sur l'analogue humain [18].

Dans ce modèle MutS, après s'être fixé sur un mésappariement et, probablement après la formation d'un complexe MutS-MutL, recherche le signal de reconnaissance du brin père en hydrolysant de l'ATP, le tout en formant des boucles. Ce modèle suppose que le dimère de MutS quitte le mésappariement en présence d'ATP (*cf* figure 1.5).

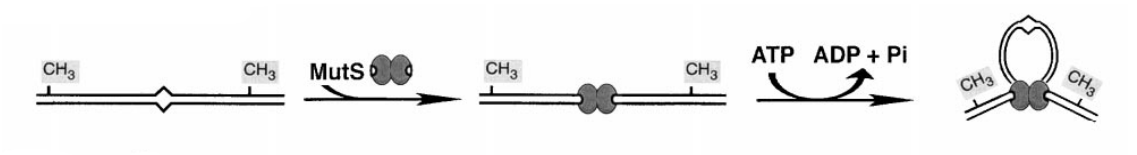

Figure 1.5 - Modèle de translocation Le mésappariement est représenté par le *«û»* dans l'ADN et des sites hemimethylés avec les «CH_3». Après la reconnaissance du mésappariement par un dimère de MutS, il se forme une boucle en forme de α avec le dimère de MutS à la base de la boucle. Le complexe est supposé se transloquer activement via hydrolyse de l'ATP, assurant la croissance de boucles au cours du temps. La rencontre du complexe avec un site hémiméthylé et MutH induit l'activation de MutH.

Ce modèle rend compte (i) de l'observation des boucles par microscopie électronique, et (ii) de l'observation par retard dur gel que MutS quitte le mésappariement en présence d'ATP, sur un ADN de petite taille. Mais ce modèle semble laisser de côté les expériences montrant qu'avec de l'ATPγS, MutS quitte aussi le mésappariement. De plus ce modèle de « translocation motorisée » parait difficilement conciliable avec les faibles taux d'hydrolyse d'ATP de MutS et des homologues de MutS (*cf* section 1.3.2).

1.9.2 La pince coulissante

Ce modèle a été proposé par l'équipe de Richard FISHEL [47], il repose sur les observations de retard sur gel de MutS quittant le mésappariement en présence d'ATP ou d'ATPγS. Le modèle repose également sur le fait que la fixation d'un complexe ADP MutSα sur un mésappariement peut être accompagnée de l'échange de l'ADP par de l'ATP.

Le modèle propose que MutS sur le mésappariement se transforme en une forme de pince coulissante par l'échange d'ADP par de l'ATP. Cette pince quitte le mésappariement par diffusion sans hydrolyse de l'ATP. Ce processus est supposé pouvoir se dérouler de façon iterative, en chargeant éventuellement plusieurs pinces MutS-ATP. Ces pinces sont supposées interagir également avec MutL et ce complexe active ensuite MutH sur un site hémiméthylé.

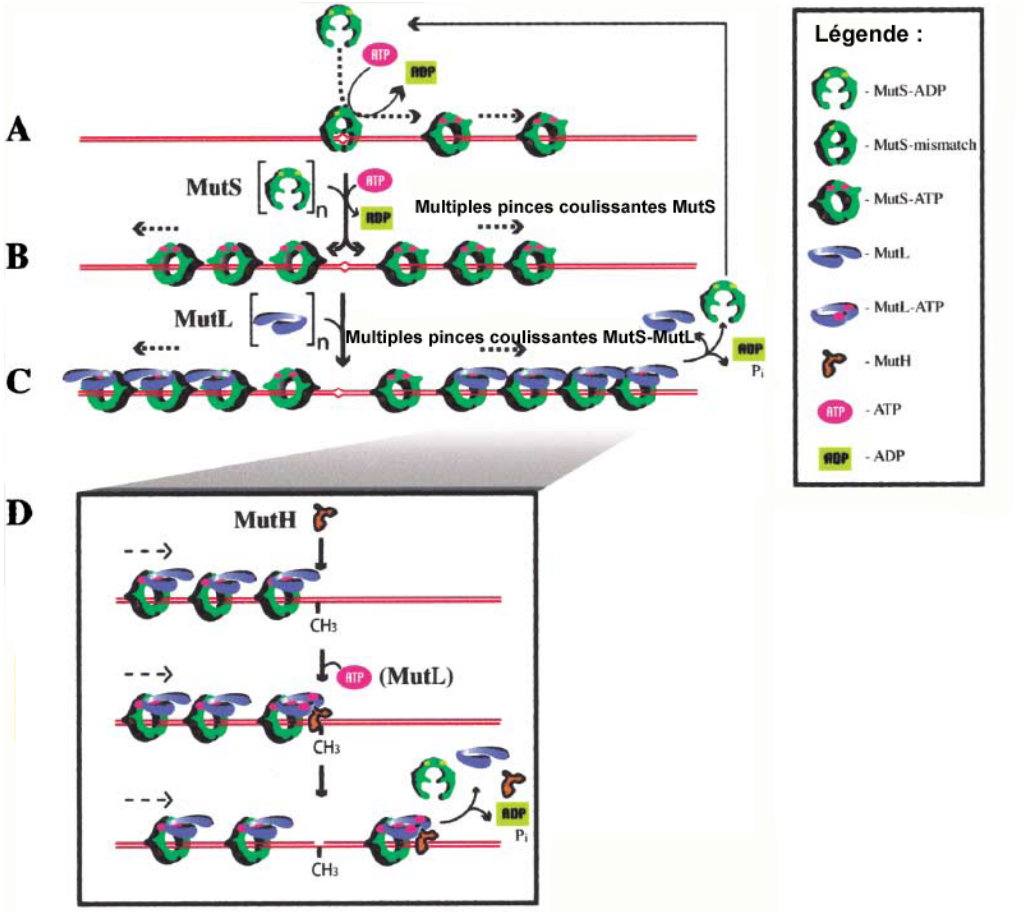

Figure 1.6 - Modèle de pinces coulissantes MutS reconnaît le mésappariement puis passe dans un état pince coulissante. Plusieurs pinces sont chargées. MutL interragit alors avec MutS pour activer MutH sur le site GATC (image tirée de [1])

Ce modèle présente aussi certaines simplifications : il repose sur le fait qu'il n'y aurait que deux états possibles : les formes ATP-MutS et ADP-MutS. Or il a été observé que le dimère de MutS possède deux sites de fixation de nucléotides. Ainsi, l'état ADP-MutS-ATP existe également en grand nombre (*cf* ci-dessus).

1.9.3 Le modèle de recherche dans l'espace

Ce modèle proposé par l'équipe de Peggy Hsieh [71], postule que lorsque la protéine se fixe au mésappariement, la fixation de l'ATP serait suffisante pour activer un changement de conformation de MutS, puis la suite du processus. Par contre si MutS se fixe à l'ADN sur une zone sans mésappariement, la fixation d'ATP sur MutS est suivie de son hydrolyse et MutS quitterait l'ADN. L'ATP et son hydrolyse servirait donc à recycler MutS sur l'ADN, lui permettant de vérifier la présence ou non d'un

mésappariement.

La protéine une fois activée serait fixée au mésappariement ou resterait aux alentours. MutL bloquerait la migration de MutS qui s'éloignerait alors que très peu du mésappariement et l'activation de MutH se produirait à des taux equivalents soit sur un site GATC du même ADN (*cis*-activation), soit sur une molécule différente (*trans*-activation).

Ce modèle rend compte des observations de clivage même lorqu'il y a un obstacle entre le mésappariement et le site GATC

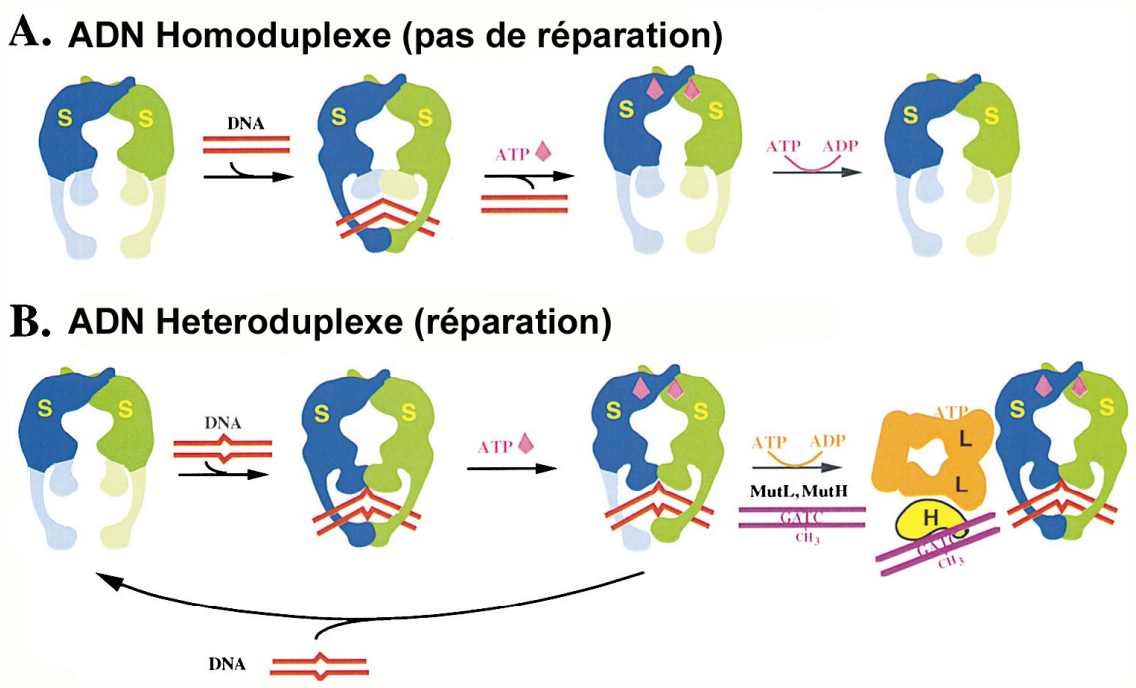

Figure 1.7 - Modèle de recherche dans l'espace MutS se fixe à l'ADN. Si MutS est fixé sur un mésappariement, MutL se fixe à MutS et active MutH par recherche dans l'espace. Si MutS n'est pas fixée à un mésappariement, l'hydrolyse de l'ATP sert à provoquer la dissociation de MutS de l'ADN (image tirée de [71])

1.9.4 La polymérisation

Ce modèle a été proposé par Paul Modrich avant le modèle de translocation [96], mais n'a pas été beaucoup cité dans la littérature [43, 55]. Selon ce modèle des éléments du système de réparation polymérisent entre le mésappariement et le signal de discrimination des deux brins. Cela permettrait une discrimination sans que MutS ne quitte le mésappariement. Et la déformation de l'ADN au niveau du mésappariement pourrait être utilisée pour le processus. L'hypothèse que MutS reste au niveau du mésappariement est un argument pour interpréter la bidirectionnalité de l'excision puis la terminaison de la réaction.

Ce modèle a été affiné par l'équipe de Basuthkar Rao [70]. Ils proposent un modèle dit de « treadmilling » c'est-à-dire en « tapis roulant » : le mésappariement servirait de point de nucléation. Une polymérisation de MutS en tête de chaîne étant supposé se faire plus rapidement qu'en queue, on aurait donc un petit amas de MutS qui avancerait le long de l'ADN comme un tapis roulant.

Chapitre 2

Montages expérimentaux

« Ne rien livrer au hasard, c'est économiser du travail. »
Antoine Albalat

De nombreux moyens expérimentaux permettent de manipuler des molécules uniques (AFM [39], micropipettes de verre [25], leviers flexibles [34], piège optique [100], pince magnétique [116]), Au laboratoire nous utilisons essentiellement deux techniques : le piège optique[1] et la pince magnétique[2]. Je présenterai les principes de ces deux montages brièvement ; ces deux montages ont été déjà décris précisément dans les thèses de mes prédécesseurs : Alexandre Dawid [30] pour la pince magnétique et Philippe Thomen [123] pour le piège optique.

Nous avons également effectué des observations sur microscope électronique en collaboration avec l'équipe d'Eric LeCam à l'institut Gustave Roussy.

2.1 La Pince Magnétique

2.1.1 Présentation

Le principe de la pince magnétique est de piéger une molécule d'ADN entre une bille paramagnétique et une surface. À l'aide d'un champ magnétique créé par des aimants au-dessus de l'échantillon, on produit une force qui agit sur la bille et donc la molécule d'ADN. La valeur de la force peut être modulée en éloignant ou rapprochant les aimants. De plus si on fait tourner les aimants, la bille peut être entraînée en rotation, et exercer une torsion sur la molécule d'ADN.

2.1.2 Montage

Une molécule d'ADN est attachée entre la surface intérieure d'un capillaire de verre de section rectangulaire (dont les dimensions internes sont de $0,1$ mm $\times$ 1 mm) et

[1] Une partie de mon travail de thèse a consisté à adapter le système de capillaire utilisé sur pince magnétique, au piège optique

[2] Une autre partie de mon travail de thèse a consisté à monter une deuxième pince magnétique, c'est à dire dupliquer la première pince magnétique qu'avait montée Alexandre Dawid

une bille paramagnétique magnétique (de diamètre 1 µm ou 2, 8 µm de chez Dynal). Les extrémités du capillaire sont ensuite connectées à des tubes souples qui permettent l'injection de solutions tampons pouvant contenir des protéines, par l'intermédiaire d'un pousse seringue. Puis il est incorporé au montage en microscope inversé comprenant :

- une source de lumière monochromatique, dans notre cas une LED ;
- un système de lentilles qui permet d'avoir un éclairage en lumière quasi parallèle sur l'échantillon (*cf* plus loin) ;
- un objectif de microscope 100× à huile, monté sur un « PIFOC », qui permet de déplacer verticalement l'objectif au moyen de cales piezzoélectriques ;
- une caméra CCD avec une fréquence d'acquisition de 60 Hz qui permet l'acquisition des images de l'échantillon qui sont ensuite digitalisées par une carte d'acquisition vidéo ;
- un ordinateur pour l'analyse des données.

Le long de l'axe optique se trouve un couple d'aimants montés sur un dispositif qui peut être tourné et translaté (*cf* figure 2.1.3). De cette façon, on contrôle la distance entre le capillaire et les aimants, et donc la force d'étirement, mais on contrôle également la rotation des aimants par rapport à l'axe optique et donc l'état d'enroulement de la molécule.

Un système de régulation en température permet de maintenir le système à la température désirée.

2.1.3 Méthode de mesure

Les mesures se font par acquisition d'images vidéo, à l'aide d'un programme développé par Vincent Croquette. Ce programme analyse en temps réel l'image vidéo en deux dimensions de la bille d'étude. L'étude du mouvement brownien de la bille permet de remonter à la valeur de la force exercé sur celle-ci (voir suite).

Un tel système permet d'avoir une mesure des fluctuations latérale de la bille. L'éclairage étant réalisé par un faisceau quasi parallèle, cela permet d'avoir des anneaux d'interférences autour de l'image de la bille. La taille et l'allure de ces anneaux dépend de la hauteur de la bille par rapport à l'objectif ; ainsi on peut comparer la taille de ces anneaux avec des images de calibration préalablement faites, ce qui permet une mesure de la position verticale de la bille.

2.1.4 La mesure de force

La mesure de la force qui s'exerce sur la bille repose sur l'analyse du mouvement Brownien. Intuitivement plus on tire sur la bille, moins celle-ci va avoir de fluctuations latérales (cf figure 2.2) ; on peut ainsi à l'aide d'une analyse du mouvement Brownien remonter à la valeur de la force de traction verticale qui s'exerce sur la bille et donc sur la molécule d'ADN.

Sous l'effet du mouvement Brownien, la bille s'écarte d'une distance $\delta x = \ell \sin\theta$ de sa position d'équilibre, dans le plan horizontal (*cf* figure 2.3). Elle subit alors une force

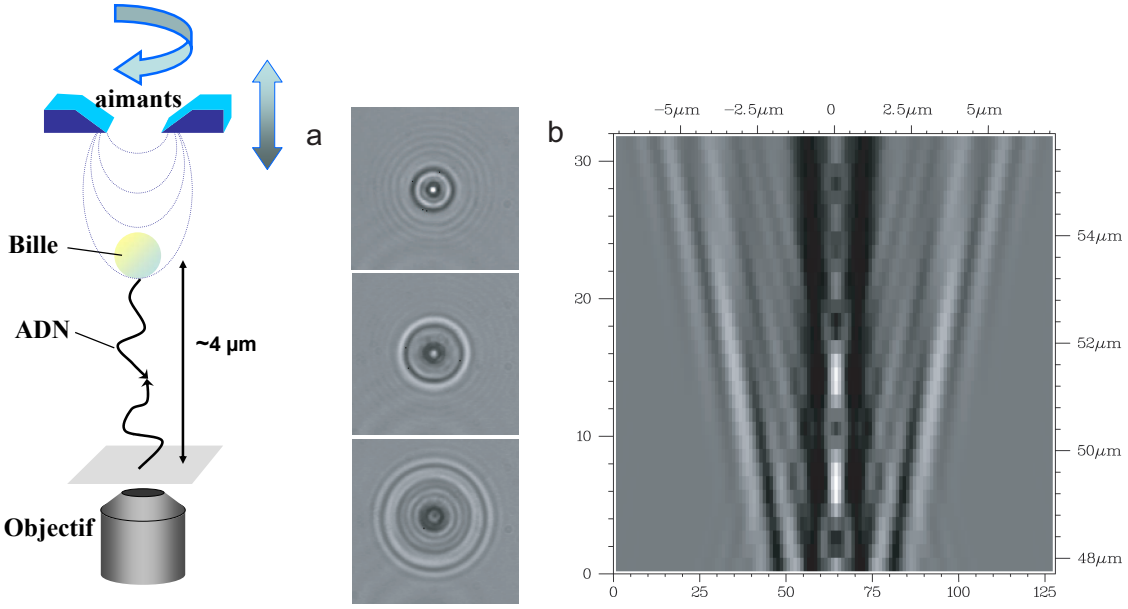

Figure 2.1 - Figure de gauche : schéma de principe de la pince magnétique. Figure de droite : allure des anneaux d'interférences (a) allure des anneaux tels qu'ils apparaissent lorsqu'on déplace le plan focal vers le haut (b) profil radial des anneaux d'interférences en fonction de la hauteur, servant de référence pour obtenir une mesures de la position de la bille selon z.

de rappel

$$F_x^{rappel} = -F\sin\theta = -F\frac{\delta x}{\ell}$$

Pour des petites fluctuations horizontales, le système est donc equivalent a un ressort exerçant une force de rappel $F_x^{rappel} = -k_x\delta x$ avec $k_x = \dfrac{F}{\ell}$. L'énergie élastique moyenne associée aux fluctuations de position de ce ressort est

$$\frac{1}{2}k_x\langle\delta x^2\rangle = \frac{1}{2}\frac{F}{\ell}\langle\delta x^2\rangle$$

où $\langle\delta x^2\rangle$ correspond a la moyenne du carré des déplacements de la bille dans le plan horizontal. Cette énergie est fournie par les collisions Browniennes avec les molecules d'eau. Selon le théorème d'équipartition de l'énergie, elle vaut $\dfrac{1}{2}k_BT$ ou k_B est la constante de Boltzmann et T la temperature en Kelvin. On a alors

$$F = k_BT\frac{\ell}{\langle\delta x^2\rangle}$$

La mesure de $\langle\delta x^2\rangle$, et de ℓ permet de remonter à la valeur de la force magnétique F exercée sur la molécule.

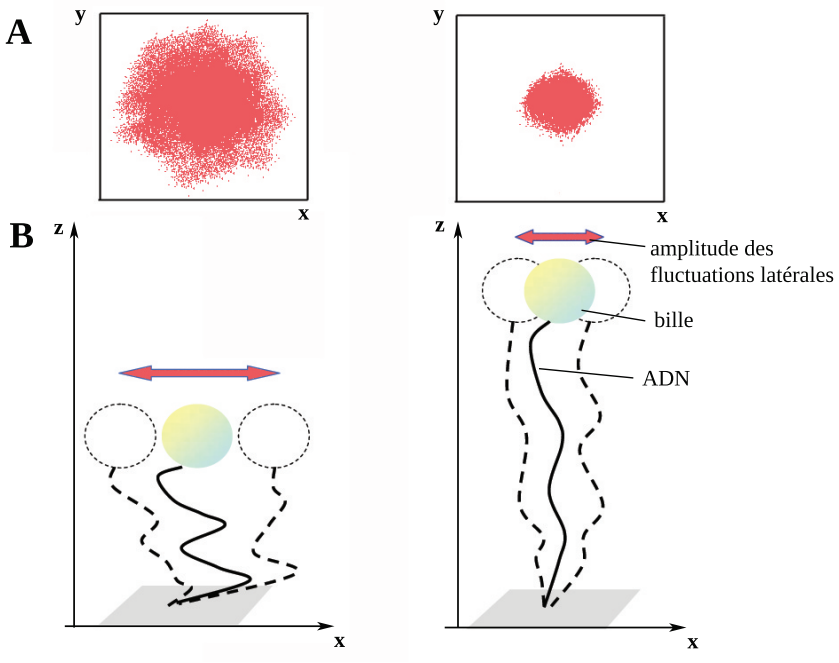

Figure 2.2 - Principe de la mesure de force avec la pince magnétique. Le schéma B présente la conformation pour deux forces différentes : « force faible » (environ $0,1$ pN) à gauche et « haute force » (environ 3 pN) à droite. En A sont représentées une superposition des positions du centre de la bille dans le plan xy sur un interval de temps de 120 s. On peut remarquer que l'amplitude des fluctuations diminue avec la force.

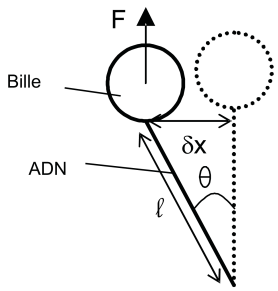

Figure 2.3 - Principe de la mesure de force. La bille fluctue dans le plan horizontal et s'écarte de δx de sa position horizontale. La molécule fait donc un angle θ avec la verticale. La valeur moyenne du carré des fluctuations permet de remonter à la force verticale exercée sur la bille (*cf* texte).

Pour les fluctuations verticales (c'est à dire dans la direction z), l'enregistrement des fluctuations $\langle \delta z^2 \rangle$ permet d'obtenir la raideur dans cette direction qui est simplement

celle de la molécule d'ADN.

2.2 Le piège optique

La première utilisation de cette technique, qui consiste à capturer et manipuler, avec un faisceau de lumière intense et convergent, une bille de dimension micrométrique, remonte aux années 1970 [6], les applications aujourd'hui sont nombreuses [120] : manipulation de microbilles (sur lesquelles sont fixées des molécules biologique : ARN, ADN), ou directement de virus, ou de bactéries. Ces dispositifs permettent également d'appliquer et mesurer des forces jusqu'à des centaines de picoNewton (figure 2.4 (A)).

2.2.1 Présentation du montage

On immobilise une molécule d'ADN entre une micro-bille de verre et la surface d'un capillaire de verre identiques à ceux utilisés pour la pince magnétique. À l'aide d'un laser, focalisé à l'aide de l'objectif d'un microscope, on produit une force (voir suite) qui agit sur la bille et donc la molécule d'ADN. On peut déplacer l'échantillon latéralement, au moyen de cales piezzoélectriques, par rapport au laser. Si la bille est capturée par le faisceau, on peut alors tendre la molécule d'ADN par un déplacement de l'échantillon. C'est le déplacement qui est imposé, et la force résulte de l'extension de la molécule entre la bille et la surface. On peut exercer des forces qui peuvent atteindre la centaine de picoNewton.

2.2.2 De la lumière vient la force

Les billes que nous utilisons sont des billes de verre, et on un indice optique plus grand que celui de l'eau dans laquelle nous faisons toutes nos expériences. Ainsi la lumière, lorsqu'elle est transmise ou réfléchie sur l'interface séparant l'eau du verre, change d'impulsion. Il s'exerce donc une force sur la surface de la bille de verre.

Si on observe la figure 2.4 (B), on remarque que cette force va être dirigée vers le centre du piège et tend donc à ramener la bille vers ce centre. Une étude précise [6,113] montre que ce régime n'est possible que pour un angle d'incidence suffisamment grand. Sinon les forces dues à la réflexion l'emportent : la bille est « poussée », il n'y a pas de position d'équilibre stable.

La bille est soumise à un potentiel qui peut-être approximé par un potentiel harmonique dans la limite de petits déplacements autour du centre du piège (typiquement de l'ordre de ± 2 µm). Dans ce régime, le piège exerce une force sur la bille équivalente à celle d'un ressort.

2.2.3 Mesure de force

Un montage d'interférométrie différentielle [123] permet de mesurer le déplacement de la bille par rapport au centre du piège. Pour déterminer la force de rappel correspondante, il faut donc déterminer : (i) quelle est la raideur du piège optique et (ii) quel est

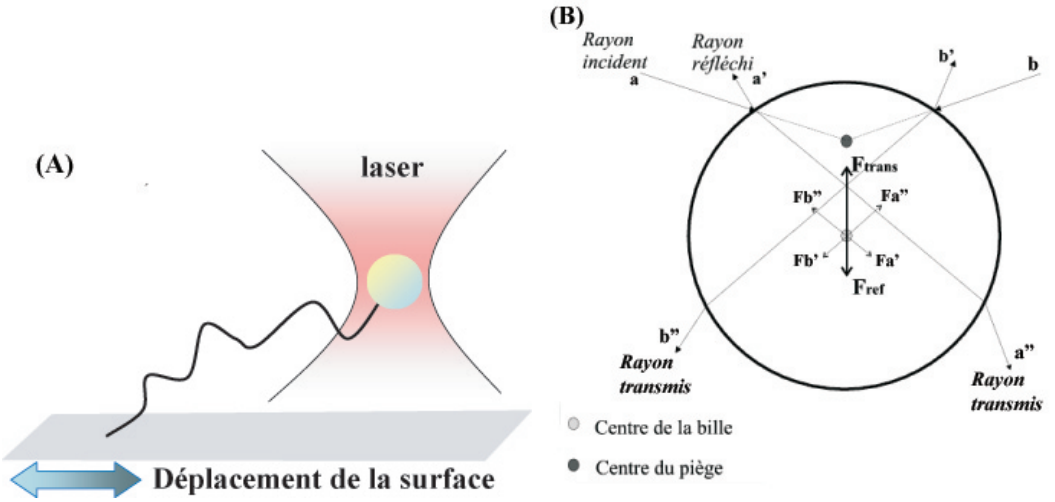

Figure 2.4 - (A) : schéma de principe du piège optique : un faisceau laser piège et tire sur un bille qui a un indice élevé par rapport à l'eau. On peut déplacer la surface sur laquelle est accrochée la molécule d'ADN. (B) : schéma des forces s'exerçant sur une bille diélectrique induite par deux rayons focalisés au-dessus du centre de la bille. Les rayons incidents sont en partie réfléchis (rayons a' et b') et en partie transmis (a et b). La variation de quantité de mouvement entre le rayon incident a (resp b) et le rayon réfléchi a' (resp b') crée la force Fa' (resp Fb'), de même la variation de quantité de mouvement entre le rayon incident a (resp b) et le rayon transmis a' (resp b') crée la force Fa" (resp Fb"). Si l'angle d'incidence est assez élevé la force résultante est dirigée vers le centre du piège

le facteur de conversion entre la tension de sortie de l'interféromètre et le déplacement dans le piège.

Le diamètre de notre bille de verre est $d \simeq 1$ µm , qui est de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde du laser : $\lambda = 1064$ nm. Nous ne sommes donc pas dans un des cas limites où on peut déterminer théoriquement la valeur de la force : pour $d \ll \lambda$ appelé régime de Rayleigh on utilise la théorie électromagnétique ou pour $d \gg \lambda$ on est dans le régime de l'optique géométrique. Il faut donc nécessairement une détermination expérimentale.

Pour cela on utilise une technique proche de celle utilisée pour la détermination de la force dans le cas de la pince magnétique : l'analyse du mouvement Brownien d'une bille libre dans le piège. En effet comme dans le cas de la pince magnétique (*cf* partie 2.1.4) nous avons une force équivalente à celle d'un ressort qui tend à ramener la bille vers une position centrale. Par ailleurs, la bille est soumise au mouvement Brownien, et l'amplitude de ce mouvement est reliée à l'amplitude de la force qui s'exerce sur la bille. Ainsi, on réalise une acquisition du mouvement latéral de la bille au cours du temps, et on analyse le signal par transformée de Fourier. On en extrait deux paramètres : l'amplitude quadratique moyenne et la densité spectrale avant la fréquence de coupure.

On réalise ce type d'acquisition à différentes valeur de la puissance du laser. On peut alors remonter en fonction de la puissance du laser : (i) au facteur reliant la force au signal électrique en sortie de l'interféromètre (environ $1,1\ \mathrm{pN}\cdot\mathrm{mV}^{-1}$) et (ii) la raideur du piège (en $\mathrm{pN}\cdot\mu\mathrm{m}^{-1}$). On obtient typiquement pour une puissance laser de 100 mW une raideur du piège : $k \simeq 110\ \mathrm{pN}\cdot\mu\mathrm{m}^{-1}$.

2.3 Comparaisons pince magnétique et piège optique

La pince magnétique et le piège optique, présentent chacun certains avantages et inconvénients spécifiques que je résume ci-dessous [22].

2.3.1 Effet des montages sur les biomolécules

Comme la majorité des biomolécules n'ont pas de susceptibilités magnétiques significatives, la technique de pince magnétique est non-invasive, ce qui n'est pas forcément le cas du piège optique qui du fait de la puissance du laser, peut, par réaction photochimique, endommager les biomolécules si elles sont proches du piège.

2.3.2 Les différences dans le mode d'application de la force

Avec la pince magnétique, du fait de la faible variation spatiale (au maximum 4 µm dans nos expériences) par rapport à la distance bille-aimant ($>$ 200 µm), la force exercée reste quasi-constante. Par contre la fréquence vidéo de la caméra impose une fréquence de coupure qui empêche de suivre les mouvements rapides.La fréquence de Nyquist est 30 Hz.Par ailleurs, la force exercée dépend des billes car on a des variations de la susceptibilité d'une bille à l'autre, cela oblige à effectuer des calibrations pour chaque nouvelle bille. Ces calibrations sont longues : de l'ordre de la demi-heure, car pour les faibles forces les fluctuations du mouvement Brownien étant grande et de basse fréquence , il est nécessaire de faire de longues acquisitions. On peut descendre à des valeurs de forces de l'ordre du centième de piconewton.

Le piège optique a une constante de raideur dépendant d'une part du laser et d'autre part des billes utilisés. En effet celle-ci ont un diamètre qui peut varier de 10%. Une calibration n'est pas possible pour tous les événements. On a donc une erreur sur la valeur de la force de l'ordre de 10%. Dans le fonctionnement habituel du piège optique, on impose un déplacement et il en résulte une force due à la molécule attachée entre une bille capturée dans le piège et la surface. La force n'est donc pas constante, contrairement au piège magnétique. On peut toutefois obtenir ce mode de fonctionnement avec le piège optique en utilisant une boucle de rétroaction qui maintient une force constante et déplace la surface pour cela. Les valeurs des forces peuvent atteindre des valeurs de l'ordre de la centaine de picoNewton, mais il est difficile de descendre en dessous du picoNewton, car cela nécessite de longue acquisition, or le piège optique utilisé n'a pas de compensation des dérives possibles du montage, et donc on ne peut pas faire d'acquisitions longues, ce qui limite son utilisation à basse force.

2.3.3 Avantages et désavantages propres à chaque montage

Un des avantages de la pince magnétique par rapport au piège optique est la possibilité d'exercer facilement une torsion sur la molécule. Avec un piège optique, il est possible d'utiliser la polarisation pour faire tourner une particule micronique de matériaux anisotropes ou encore de forme complexe. Cependant l'obtention de telles particules est délicate. On peut dans ce cas exercer une torsion avec le piège optique (REFS), mais la mise en œuvre n'est pas simple.

Un désavantage du piège optique est que le laser attire les billes libres de l'échantillon dès qu'il est allumé, cela impose en pratique une limitation dans le temps pour les expériences. De plus la mesure de l'extension de la molécule peut-être sensible à des dérives possibles du système dans le temps, c'est une autre raison de la limitation dans le temps pour les expériences effectuées avec le montage de piège optique du laboratoire.

Par contre avec la pince magnétique, le système de mesure se fait à l'aide d'une bille de référence collée à la surface. Cela permet de tenir compte des dérives possibles du montage, on peut ainsi avoir des expériences qui peuvent durer plusieurs heures.

Prenons quelques exemples de manipulations faites dans notre équipe. Tout d'abord l'ouverture de l'ADN avec le piège optique [19]. Cette expérience permet d'observer la séparation progressive des deux brins d'ADN en imposant un déplacement entre la bille et la surface. Si cette expérience est faite avec une pince magnétique, on tend à observer une transition brutale entre la molécule fermée à basse force et la molécule ouverte à haute force. Les manipulations effectuées sur les jonctions de Holliday (*cf* chapitre 4) ont été réalisées sur piège magnétique, pour exercer facilement une torsion sur la molécule.

2.3.4 Utilisation des deux montages

Nous avons donc deux outils complémentaires : on utilise plutôt le piège optique pour des expériences avec un déplacements imposé. La pince magnétique sera utilisée pour des expériences de torsion ou des expériences où l'on cherche à observer uniquement des variations de longueurs de la molécule à force constante sur de longues périodes.

2.4 Microscopie électronique

Durant cette thèse nous avons effectué des manipulations en collaboration avec l'équipe d'Eric LeCam à l'institut Gustave Roussy (IGR) à Villejuif. Cette équipe est spécialisée dans les observations de microscopie électronique. Une présentation rapide de leur technique est présenté dans cette section.

	Pince magnétique	**Piège Optique**
Avantages	Force constante (10^{-14}-10^{-11} N) Torsion de la molécule possible Calibration de force directe, mais longue	Force élevée (10^{-13}-10^{-10} N) Déplacement imposé (Force variable en fonction de l'étirement de la molécule) Pour travailler à force constante, nécessite d'avoir une boucle de rétroaction
Inconvénients	Limités à des basses forces Pas de mesure du couple	Calibration indirecte Possibilité d'endommagement des biomolécules

Tableau 2.1 - Avantages et inconvénients des montages de piège optique et de pince magnétique

2.4.1 Préparation des grilles de microscopie

Les complexes nucléoprotéiques sont formés dans les conditions précisées plus loin pour chaque expérience et sont étalés sur une grille en cuivre recouverte d'une fine couche de carbone fonctionnalisée.

Les grilles de microscopie sont faites d'un maillage de cuivre formant des alvéoles (carrées ou hexagonales) plus ou moins grandes. Les grilles utilisées contiennent environ 200 alvéoles d'environ 42 µm de longueur.

Le film de carbone qui constitue le support d'observation sur lequel les molécules s'adsorbent est préparé en appliquant un courant de haute intensité à une tresse de carbone maintenue sous vide au-dessus d'un feuillet de mica fraîchement clivé. Cela provoque la vaporisation du carbone sur la surface du mica en un film de plusieurs dizaines à quelques centaines d'Angströms. Ce film de carbone est alors décollé de la surface du mica et déposé à la surface de la grille de microscopie. On procède alors à la fonctionnalisation de cette surface.

Pour l'adsorption de l'ADN et des complexes ADN-protéine et leur observation en coloration positive, on réalise une ionisation en présence de pentylamine[3] dans une enceinte maintenue sous-vide [33].

2.4.2 Mise en place d'une expérience

Une goutte (5 µL) de la solution contenant les complexes à étudier est déposée à la surface de la grille pendant 60 secondes. On ajoute ensuite une goutte d'une solution d'acétate d'uranyle[4] qui agit comme un agent contrastant en réagissant avec l'ADN. Il s'agit donc d'une coloration positive. On élimine l'excès de colorant à l'aide d'un papier

[3] de formule chimique $CH_3(CH_2)_4NH_2$

[4] de formule chimique $(CH_3COO)_2UO_2$, utilisé à 2% (w/v)

filtre.

Le microscope électronique est un Leo Zeiss 902. Le mode d'imagerie est le mode fond noir annulaire filtré. La source électronique est un filament de tungstène. Une tension de 80 kV est appliquée entre les électrodes émettrices. Le premier diaphragme est annulaire et permet de sélectionner les électrons émis aux grands angles, qui sont focalisés au niveau de l'objet. Un autre diaphragme permet de sélectionner le centre du cliché de diffraction, où se trouve le maximum d'information. Un filtre spectroscopique permet de sélectionner les électrons élastiques et d'éliminer les électrons inélastiques pour une amélioration du contraste [26]. L'image impressionne un film négatif argentique qui est ensuite révélé et numérisé. Les images sont ensuite traitées numériquement

2.4.3 Avantages et inconvénients de la technique utilisée

La technique de dépôt des échantillons sur la surface de la grille ne fait pas appel à la fixation chimique. Les complexes nucléoprotéiques sont adsorbés à la surface de la grille en conservant les informations structurales de l'interaction (par opposition à une projection 3D-2D) [68]. Cette technique a permis de mettre en évidence que les paramètres conformationnels de la molécule d'ADN sont conservés [48, 60, 122].

Par contre cette technique empêche l'utilisation de fortes concentrations d'ATP, car cette molécule réagit avec l'acétate d'uranyle, ce qui qui limite la qualité de la visualisation. De plus les manipulations à hautes concentrations en protéines (au delà de 100 nM) rendent également les observations difficiles, car les protéines libres se fixent à la surface et rendent difficile la visualisation. Toutefois des manipulations à hautes concentrations en ATP ou en protéine peuvent être réalisées mais elles nécessitent une filtration sur colonne afin d'éliminer les molécules libres ou les protéines libres. Mais cette technique de filtration rajoute une étape et peut éliminer des complexes, ce qui la rend plus difficile à exploiter.

Chapitre 3

Étude de MutS à l'échelle de la molécule unique

« N'entretiens pas l'espoir de ce qui ne peut être espéré. »

Pythagore

Afin de déterminer le mode d'action de MutS en présence d'un mésappariement (*cf* section 1.9), nous avons utilisé la pince magnétique. Cette outil nous permet de suivre en temps réel l'extension d'une molécule d'ADN contenant ou pas un mésappariement en son centre. Cette molécule est arrimée entre une bille microscopique et une surface de verre (*cf* section 2.1). Nous pouvons aussi obtenir une estimation de la raideur de cette même molécule, à l'aide des courbes de force-extension et en utilisant le modèle du ver (la section A.1.3 rappelle les propriétés mécanique de l'ADN). Nous avons donc un outil pour déterminer quel est le mode d'action de MutS. Les expériences présentées dans cette partie on été effectuées avec Camille Brème.

3.1 Constructions d'ADN

Nous avons utilisé durant ces expériences deux types de constructions : une contenant un mésappariement, et une n'en contenant pas. Ainsi à l'aide de ces deux constructions nous pouvons distinguer les effets spécifiques (c'est-à-dire en présence d'un mésappariement) et non spécifiques (c'est-à-dire en l'absence d'un mésappariement).

Ces deux constructions ont une architecture similaire : une extrémité de la construction porte des ligands biotines et l'autre extrémité des ligands digoxygénines.

Les deux molécules sont construites à partir d'un plasmide de 7,5 kb (*cf* annexe X pour les détails de préparation).

3.2 Premières observations

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, il est connu que MutS a une affinité non-spécifique importante pour l'ADN. Afin de mieux caractériser cette propriété, nous

avons effectué des manipulations sur des molécules d'ADN qui ne contenaient pas de mésappariement. Le but est de trouver les conditions expérimentales pour minimiser ces effets non-spécifiques.

3.2.1 Observations en l'absence d'ATP et à bas sel sur une molécule sans mésappariement

Lorsqu'il n'y a pas de protéines dans la solution, dans une solution tampon Tris-HCl 10 mM à pH 8, $MgCl_2$ 6 mM, NaCl 50 mM, sur une molécule surenroulable, l'extension de la molécule varie quasi immédiatement avec la modification de la valeur de la force (figure 3.1). Les fluctuations, dues au mouvement Brownien, augmentent lorsqu'on diminue la force, la valeur moyenne à une force donnée reste constante lorsque la force reste constante.

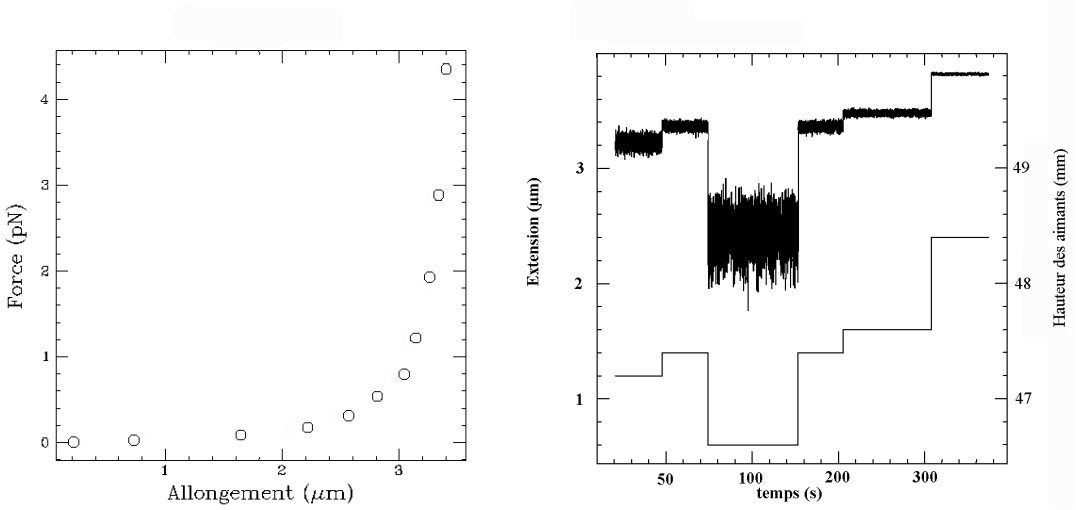

Figure 3.1 - Extension d'une molécule d'ADN sans mésappariement et en l'absence de MutS et d'ATP. Figure de gauche : courbe force-extension, montrant l'allongement de la molécule en fonction de la force. Figure de droite : le trait continu non bruité représente la hauteur des aimants qu'on fait varier par palier au cours du temps : 46,6 correspond à une force d'environ 0,16 pN, 47,2 à une force de 0,65 pN, 47,4 à une force de 0,93 pN, 47,6 à une force de 1,38 pN et 48,4 à une force de 6,46 pN. L'extension de la molécule suit rapidement les variations de la force. De plus le mouvement Brownien diminue si la force augmente.

Lorsqu'on injecte ensuite 1 μM de MutS, sans ATP ni ADP, dans la même solution tampon, on n'observe pas de différences d'extension lorsqu'on reste à des forces supérieures à 1 pN. Pour des forces comprises entre 0,2 pN et 1 pN, l'extension de la molécule à une force donnée varie très peu (moins de 5% d'écart entre les deux extensions). Par contre pour des forces inférieures à 0,2 pN, l'extension diminue jusqu'à

zéro. La bille ne colle pas immédiatement à la surface du capillaire ; on observe sur la figure 3.2 que la bille « tape » la surface, il n'y a pas toujours interaction entre la bille et la surface dans ces conditions (la bille colle toutefois après quelques minutes « au sol » c'est-à-dire sur la surface interne inférieure de l'échantillon). Si on remonte alors la force a une valeur supérieure à 0,2 pN, la bille revient à une position où la valeur de l'extension est identique à celle obtenue précédemment à cette force . Cette remontée, contrairement au cas sans protéine, ne se fait pas immédiatement, l'extension remonte par niveaux (figure 3.2).

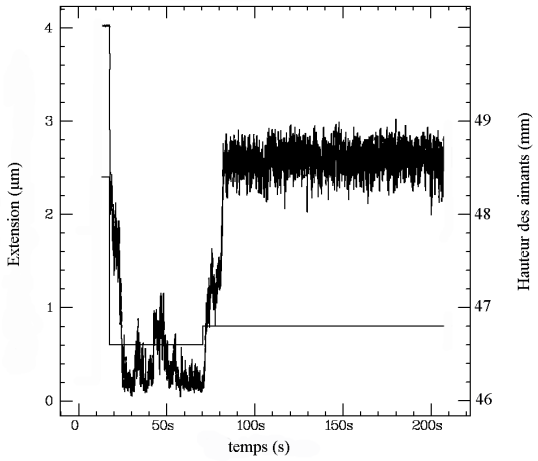

Figure 3.2 - Extension d'une molécule d'ADN sans mésappariement en présence de MutS sans ATP. Pour cette expérience la concentration de MutS est de 1 μM. La trait continu non bruité représente la hauteur des aimants et l'autre courbe est le signal enregistré. Le cycle démarre à 48,4 mm, ce qui correspond à une force d'environ 5 pN,puis on baisse la hauteur des aimants à 46,6 mm soit une force de 0,15 pN, enfin on remonte à 46,8 mm soit une force de 0,26 pN. Lorsque la force est de 0,15 pN l'extension chute à zéro, puis lorsqu'on remonte la force à 0,26 pN l'extension réaugmente, mais en marquant ici une « pause » (comprise entre quelques secondes et plusieurs minutes) avant de remonter à l'extension maximale pour cette force.

On observe donc un effet de la protéine MutS sur une molécule sans mésappariement. À une force plus faible que $0,2$ pN environ, la molécule d'ADN en présence de MutS est plus courte que sans MutS. On a donc un effet de compaction à faible force. Par ailleurs on observe également une cinétique lente pour la réponse de l'extension de la molécule à ue force qui augmente. Il n'est pas exclu que l'ADN ait tendence à coller sur la surface du capillaire, ou sur la bille, en présence de MutS. Ces effets de compactions et de remontée par paliers, nous ont obligé à injecter la protéine en gardant la force au dessus de 3 pN. en effet si on n'exerce pas une force importante sur la molécule lors de l'injection de MutS, la bille colle systématiquement à la surface et on ne trouve plus aucun événements dans le capillaire.

Nous avons effectué les mêmes expériences en présence de la même solution tampon à laquelle on a substitué les 50 mM NaCl par 50 mM KCl : nous avons observé les mêmes phénomènes de compaction et de remontées par paliers.

3.2.2 Observations en l'absence d'ATP et à haut sel sur une molécule sans mésappariement

Comme présenté dans la section 1.3.2, les propriétés de MutS dépendent de la concentration en sel NaCl dans la solution. Nous avons donc effectué les mêmes expériences que ci-dessus dans un tampon Tris-HCl 10 mM, pH 8, $MgCl_2$ 6 mM, NaCl 150 mM, avec une molécule d'ADN sans mésappariement. Dans ces conditions nous n'observons aucune différence entre l'ajout de MutS à 1 µM et l'absence MutS.

A des concentrations en sel de 150 mM, il a déjà été observé que les effets non spécifiques de MutS : hydrolyse de l'ATP sans ADN ayant de mésappariements ou fixation à de l'ADN sans mésappariement, diminuaient (*cf* section 1.3.2).Il semblerait donc que les effets que nous observons pour des concentrations faibles en sel NaCl ou KCl à 50 mM : diminution de longueur à basse force et remontée par palier avec la force, ne soient que des interactions non spécifiques de la protéine sur l'ADN ou de la protéine avec la surface.

3.2.3 Observations en présence d'ATP sur une molécule sans mésappariement

Toujours sur une molécule d'ADN qui ne possède pas de mésappariement, nous avons exploré l'effet de l'ajout d'ATP à différentes concentrations (*cf* tableau 3.2) en présence de MutS dans les mêmes solutions tampon et avec une concentration de 50 mM en sel NaCl.

Nous avons toujours les mêmes effets de compaction de la molécule à basse force, mais contrairement aux expériences sans ATP cette fois-ci la bille colle à la surface quasi immédiatement (figure 3.3, comparativement à la figure 3.2).

De plus à des forces de l'ordre de 0,25 pN on observe des fluctuations de l'extension de la molécule qui sont très différentes du mouvement Brownien observé sans protéine (figure 3.4) : on observe, superposé au mouvement Brownien, des fluctuations de basse fréquences, sur des temps caractéristiques de l'ordre de 5 à 20 secondes et d'amplitude importante.

Par contre si on augmente la concentration en sel NaCl, en passant à 150 mM, on ne voit plus aucun effet ni de compaction ni de fluctuations.

3.2.4 Effet de la concentration en MutS sur une molécule sans mésappariement

Nous avons cherché à déterminer l'éventuelle influence de la concentration en MutS. Il ressort que les effets de compaction et de fluctuations décrits ci-dessus, dépendent de

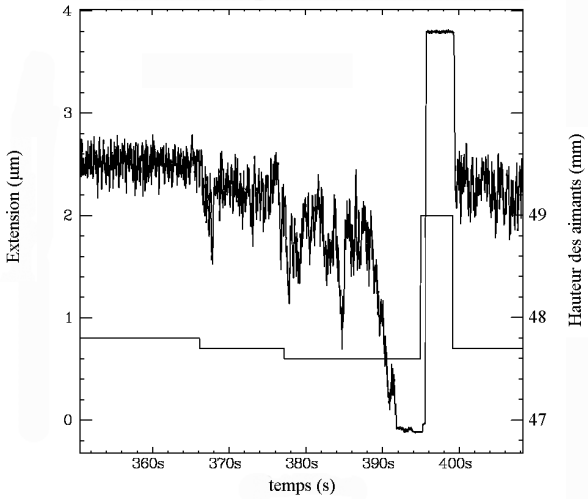

Figure 3.3 - Extension d'une molécule d'ADN sans mésappariement en présence de MutS et d'ATP Cette expérience a été effectuée en présence de 1 µM de MutS, de 0,5 mM d'ATP, de 6 mM de $MgCl_2$, de 50 mM de NaCl dans un tampon Tris-HCl pH8 10 mM. Le trait continu non bruité représente la hauteur des aimants : 47,8 mm correspond à une force de 0,25 pN, 47,7 mm à une force de 0,2 pN, et 47,6 mm à une force de 0,18 pN, enfin 48 mm à une force de 3,2 pN. On remarque une nouvelle fois que la molécule se compacte à basse force ; la bille « va au sol », et le mouvement Brownien diminue : la bille colle à la surface. Si on tire à haute force, sans attendre trop longtemps, on décolle la bille

la concentration en MutS apportée. Nous avons utilisé deux préparations de protéines envoyées par Paul Modrich[1]. La première préparation montrait une apparition des effets de compaction et de fluctuations pour une concentration de 200 nM en protéine, la deuxième pour une concentration de 500 nM. Les effets de compaction apparaissent donc pour des concentrations de MutS supérieures à 200-500 nM.

3.2.5 Observations expérimentales sur une molécule avec mésappariement

De façon très surprenante et malgré tous nos efforts, nous n'avons vu aucune différence entre l'utilisation d'une construction avec mésappariement et une concentration sans mésappariement, dans tous les types de tampon utilisés ci-dessus. Les expériences fournissent les mêmes résultats : il y a des effets de compaction, et de fluctuations à des concentrations en sel NaCl de 50 mM. Enfin ces effets disparaissent complètement pour une concentration en NaCl de 150 mM.

Nous ne sommes donc pas arrivés à distinguer de différence entre l'ajout de MutS

[1]la concentration en MutS est de 106 µM en monomères, soit $10,1\ \mathrm{mg \cdot mL^{-1}}$, stocké dans une solution tampon : 20 mM KPO_4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, et 50% glycérol

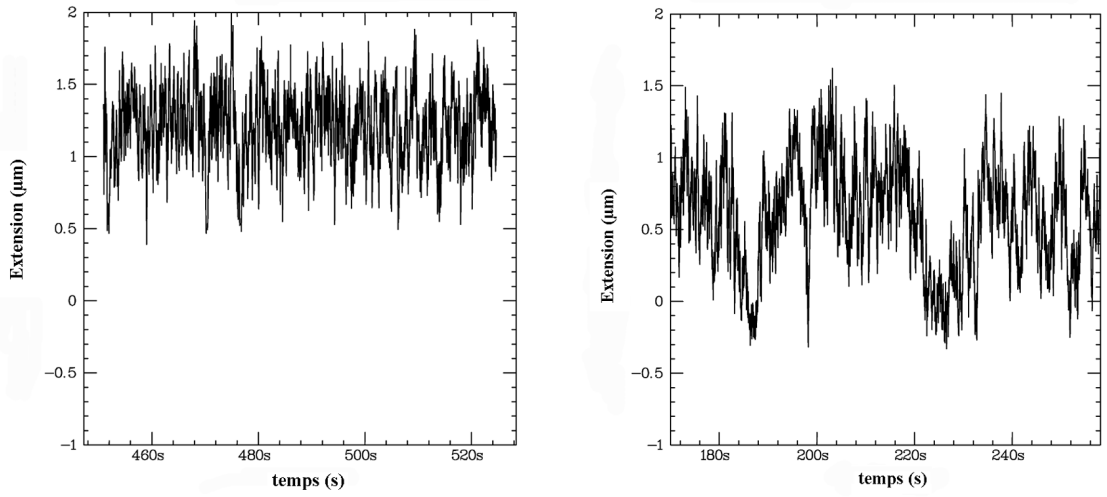

Figure 3.4 - Extension d'une molécule d'ADN sans mésappariement en présence de MutS et d'ATP Lorsqu'on compare l'extension d'une molécule d'ADN, à force constante, ici 0,18 pN, sans MutS (figure de gauche) et avec MutS (figure de droite), on remarque qu'en présence de MutS l'extension de la molécule fluctue de façon très différente du mouvement Brownien. Sur la figure de droite, on remarque que l'extension peut être négatives, cela est du à la méthode de mesure de la pince magnétique (*cf* thèse d'Alexandre Dawid [30])

sur une molécule sans mésappariement et une molécule avec mésappariement dans nos conditions expérimentales. Cela nous a conduit à supposer que les effets que nous observons pourraient être dus à des artefacts.

3.3 Ajout d'un surfactant : disparition des effets de MutS

Afin de déterminer si les effets de compaction et de fluctuations n'étaient pas dus à une fixation non spécifique de la protéine sur la surface, nous avons ajouté un surfactant (le pluronic[2] utilisé à 0,005% en masse) à la solution.

Le pluronic est susceptible de s'adsorber sur la surface, car cette dernière possède éventuellement des zones hydrophobes : en effet, pour réaliser l'attachement des anticorps anti-dig, on recouvre l'intérieur du capillaire avec une fine couche de polystyrène hydrophobe, pour que les anticorps s'adsorbent dessus. Des zones incomplètement couverte et donc hydrophobes peuvent malgré tout subsister. Notre idée initiale était de cherche à éviter d'éventuelles interactions entre MutS et la surface ayant des parties hydrophobes. Nous avons donc « passivé » la surface avec le tampon voulu contenant en plus le pluronic, puis nous avons rincé deux fois avec 200 µL du même tampon sans

[2]copolymère d'oxyde d'éthylène et d'oxyde de propylène, utilisé comme surfactant.

pluronic (à comparer au volume intérieur du capillaire : 10 µL). Ainsi, nous avons une concentration résiduelle de pluronic en solution inférieure à 0,005% en masse[3], et il reste aussi les molécules de pluronic qui se sont fixées aux parties hydrophobes de la surface du capillaire.

Avec ce type de passivation, les effets de compaction et de fluctuations ne sont plus observés, à la fois sur les molécules sans mésappariement et avec mésappariement (*cf* figure 3.5), dans tous les tampons utilisés ci-dessus. La perte de l'effet non-spécifique en présence de pluronic semble indiquer que nos observations pourraient être dues principalement à une interaction entre MutS et la surface puis entre MutS et la molécule d'ADN. On ne peut cependant pas exclure que le surfactant résiduel affecte aussi la protéine MutS.

Une mesure comparative entre les signaux longueur en fonction du temps montre une différence de longueur inférieure ou égale à 0,1 µm (*cf* figure 3.7). Un allongement relatif de la molécule ne peut être dû à une boucle, car on aurait au contraire un raccourcissement. De plus la situation montrée sur la figure 3.7 correspond au maximum d'allongement observé. Par contre nous n'avons pas observé de raccourcissement de l'extension en présence de MutS, ni d'observation de signal avec MutS qui auraient pu être reliés à la formation d'une boucle.

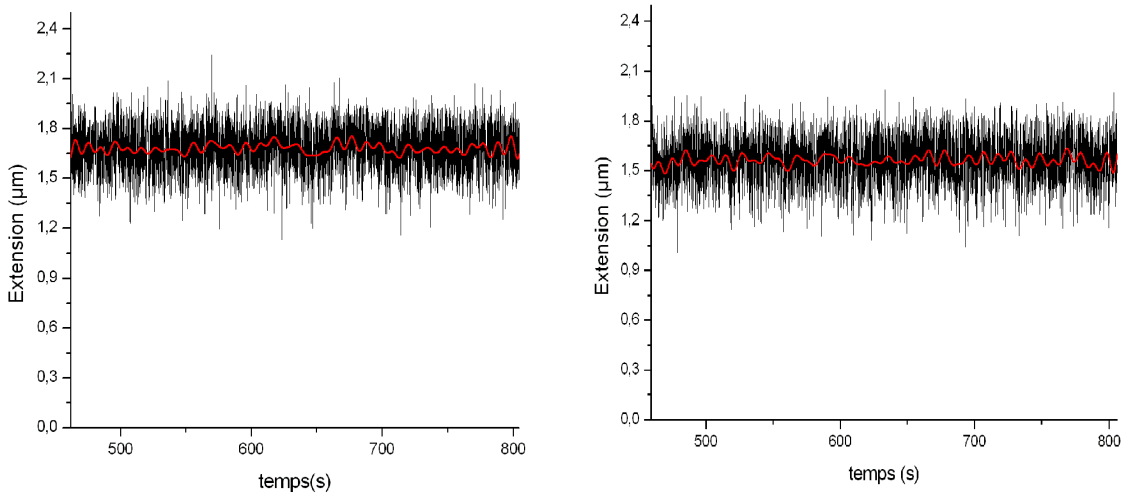

Figure 3.5 - Comparaison des courbes longueur en fonction du temps à une force constante de 0,2 pN. Le capillaire a été mis en contact avec du pluronic, puis rincé. Les deux courbes sans MutS (figure de gauche) et avec MutS (figure de droite) ont été filtrées par un filtre passe bas avec une fréquence de coupure de 0,1 Hz. On ne remarque pas de différences significatives entre les deux courbes.

Nous avons également effectué des expériences en torsion. En effet si MutS est

[3]Une étude présenté dans la partie sur le Bromure d'Ethidium montre qu'un rincage avec 200 µL permet de faire descendre la concentration à 1 % de ce qu'elle était avant le rinçage.

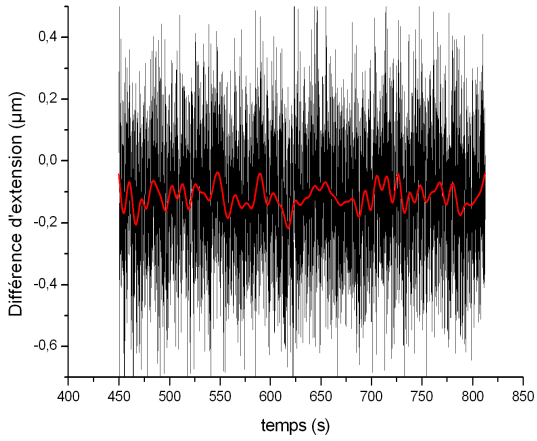

Figure 3.6 - Différences des courbes longueur en fonction du temps à une force constante de 0,2 pN. On a soustrait l'une de l'autre les courbes de la figure 3.5 : sans MutS (figure de gauche) et avec MutS (figure de droite), puis cette courbe a été filtrée par un filtre passe bas de fréquence de coupure 0,1 Hz. La différence de longueur entre les deux courbes montre ici un allongement de la molécule avec MutS qui est en moyenne de 0,1 µm, pour cette expérience.

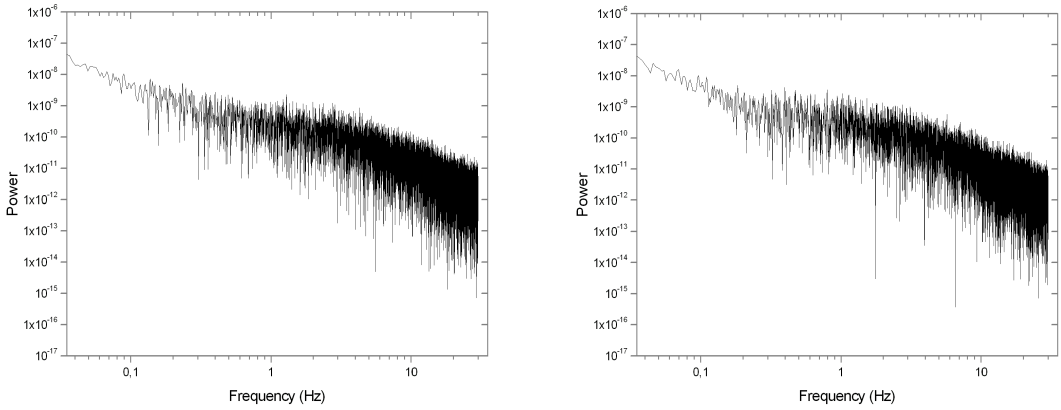

Figure 3.7 - Transformées de Fourier des courbes longueur en fonction du temps à une force constante de 0,2 pN. On a effectué les transformées de fourier des deux courbes longueurs en fonction du temps sans MutS (figure de gauche) et avec MutS (figure de droite) de la figure 3.5. On ne remarque aucune différence entre les deux spectres de puissance.

capable de former ou stabiliser des boucles, le fait de produire des plectonème en rajoutant des tours à la molécule devrait favoriser cette formation de boucles. Pourtant nous n'avons vu aucune différence de comportement de la molécule entre la présence et l'absence de MutS (*cf* figure 3.8 et 3.9).

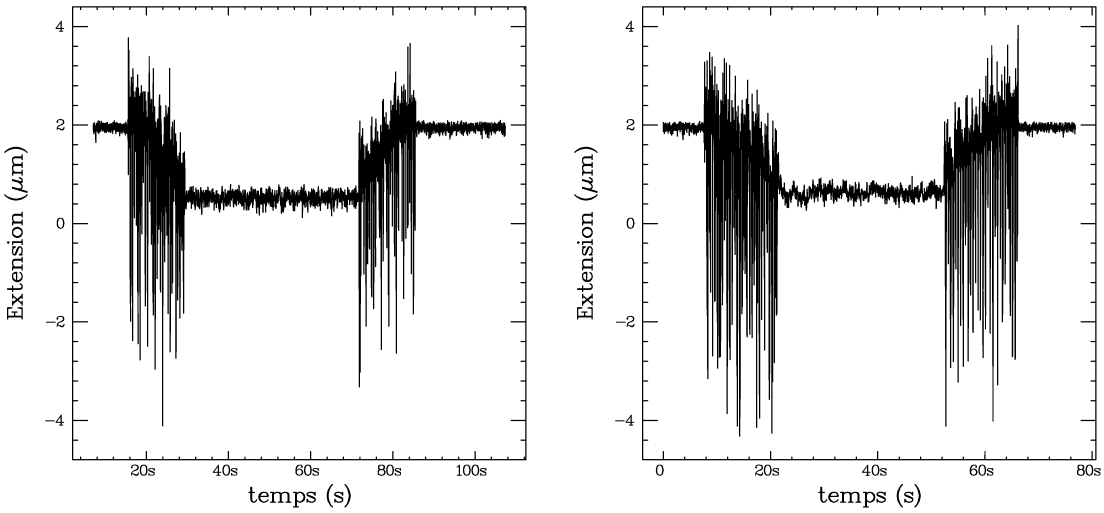

Figure 3.8 - Influence du nombre de tours sur la molécule en présence ou en l'absence de MutS. Les courbes sans MutS (figure de gauche) et avec MutS (figure de droite) ont été réalisées à une force de 0,3 pN. On rajoute 30 tours à la molécule (correspondant sur la figure aux parties de très fort bruits, à cause des vibrations du moteur de la platine de rotation des aimants). Une fois la rotation des aimants terminée la molécule atteint tout de suite son extension stable. Puis on revient à 0 tours et la molécule reprend l'extension qu'elle avait avant à 0 tour. On ne remarque pas de différences entre la présence ou l'absence de MutS à la fois dans l'extension à +30 tours mais également lorqu'on revient à 0 tours.

3.4 Effet de l'ajout de MutS sur l'élasticité de la molécule

Avec la pince magnétique il est possible d'obtenir via la mesure des fluctuations verticales, une estimation de la raideur longitudinale k_z de la molécule d'ADN (*cf* section 2.1). Ainsi une augmentation de cette valeur pourrait être associée à une éventuelle polymérisation de MutS le long de la molécule d'ADN. Toujours avec un traitement préalable de la surface au pluronic, nous n'avons pas observé de différence significative entre la présence et l'absence de MutS (figure 3.10 et tableau 3.1).

De même si on ajuste les courbes force-extension avec et sans MutS par le modèle du ver, on remarque que les paramètres ne varient pas de façon significative (dans la limite des 10% d'erreurs faites sur la mesure). Nous n'avons donc pas réussi à mettre en évidence un éventuel effet de polymérisation de MutS le long du brin, qui aurait changé les paramètres dans le modèle du ver (figure 3.11).

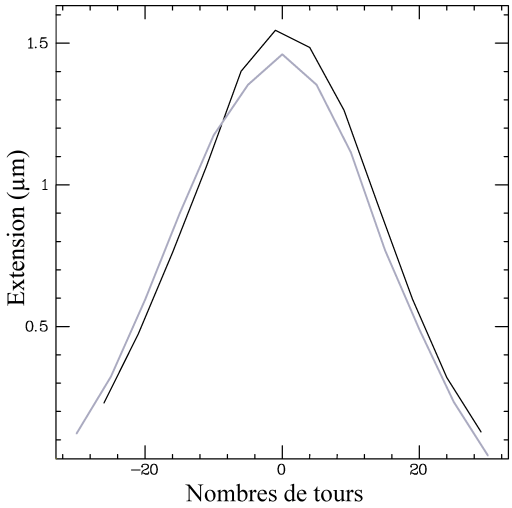

Figure 3.9 - Différences des courbes longueur en fonction de la rotation à une force constante de 0,3 pN. Le capillaire a été mis en contact avec du pluronic, puis rincé. On a superposé les courbes sans MutS (courbe grise) et avec MutS (courbe noire). On observe une différence inférieure à 0,1 µm pour 0 tour. Toutefois la réponse de la molécule (extension en fonction du nombre de tours) est similaire (hormis la faible différence de longueur) en présence ou en l'absence de MutS.

3.5 Discussion des résultats

Dans nos conditions expérimentales, sur des surfaces traitées préalablement au pluronic, nous n'avons pas observé de signatures de formation de boucles. En effet, la formation transitoire de boucles devrait s'accompagner d'une différence dynamique dans l'extension de la molécule d'ADN [85] : avec une diminution de l'extension de l'ADN en fonction du temps à une force donnée constante, ce que nous n'observons pas dans nos expériences.

Dans nos expériences sur pince magnétique, il est possible que nous ayons d'abord observé un effet artefactuel de fixation de MutS sur la surface partiellement hydrophobe du capillaire. En effet on observe en présence de MutS d une compaction de la molécule à basse force ($F < 2$ pN), de remontées par paliers, et des fluctuations de l'extensions à une valeur de force comprise entre 0,2 pN et 1 pN. Mais on ne distingue aucune différence entre présence et absence d'un mésappariement. De même, on ne distingue aucune différence entre la présence ou l'absence d'ATP avec MutS. Enfin, une passivation de surface à l'aide d'un surfactant polymérique non ionique (pluronic 68) élimine tous les effets précédents.

Avec cette passivation, on n'observe aucun effet mécanique de la présence de MutS et ce quelle que soit la force utilisée. À titre de comparaison, il a été montré sur la

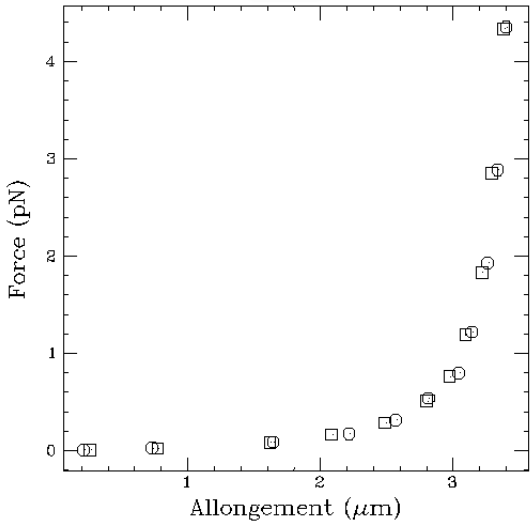

Figure 3.10 - Courbes force-extension avec et sans MutS. Le capillaire a été mis en contact avec du pluronic, puis rincé. Lorsqu'on compare les courbes force-extension, sans MutS (carrés) et avec MutS (cercles), on n'observe pas de différences significatives entre les deux courbes

F(pN)	5,9	3,7	2,1	1,4	0,90	0,51	0,30	0,17	0,086	0,033
k_z (sans MutS)	6304	4297	2191	1047	332	153	65,1	24,3	13,9	8,17
k_z (avec MutS)	6226	3513	2265	966	390	147	63,0	26,4	12,5	7,87

Tableau 3.1 - Estimation de la raideur k_z longitudinale de la molécule d'ADN pour différentes forces sur une molécule avec mésappariement ; toutes ces expériences ont été effectuées après avoir passivé la surface du capillaire de pluronic. L'erreur faite lors de la mesure du k_z est de 10%.

protéine GalR que le temps de vie de la protéine bloquant l'ADN sous forme boucles était dépendant de la force. Il a été montré pour ce système qu'à une force de 0,9 pN, l'ADN est alternativement sous forme de boucles et sous forme relâchée, et ce pour des intervalles de temps équivalents. Dans nos expériences nous sommes descendus à des forces inférieures à 0,1 pN et nous n'avons pas observé de signatures de telles formations de boucles.

Nous avons observé malgré tout dans certaines expériences une augmentation de longueur de l'ordre de $0,1$ µm dans nos expériences, cette différence de longueur pourrait être due à un changement de la configuration de la molécule. Mais surtout ce phénomène est statique, contrairement à ce qui avait été décrit par Paul Modrich lors de l'observation de la formation de boucles [4]. Cette observation de rallongement faible n'a pas été systématique ; cette différence pouvant varier entre 0 et 0,1 µm. On peut

Buffer	Sel	ATP	ADP	MutS	Effet observé
Tris-HCl pH8	NaCl 50 mM	0 mM	0 mM	100 nM	La bille va au sol à basse force et remonte par palier quand on augmente la force (*cf* figure 3.4) ; à une force donnée, l'extension fluctue (*cf* figure 3.2)
"	"	100 μM	"	"	même effets que ci-dessus
"	"	0 mM	"	1 μM	augmentation du temps de transit par palier en remonté de force
"	"	0,5 mM	"	"	effets identiques à ci-dessus
"	"	1 mM	"	"	effets identiques à ci-dessus
"	"	0 mM	1 mM	"	La bille va au sol à basse force et remonte par palier quand on augmente la force ; à une force donnée, l'extension fluctue (*cf* figure 3.4 et 3.2)
"	"	1 mM	1 mM	"	effets identiques à ci-dessus
"	KCl 50mM	0 mM	0 mM	100 nM	effets identiques à ceux observés en NaCl
"	"	100 μM	"	"	effets identiques à ceux observés en NaCl
"	NaCl 150mM	0 mM	"	"	aucun effet observé de MutS
"	"	100 μM	"	"	aucun effet observé de MutS
"	"	0,5 mM	"	1 μM	aucun effet observé de MutS
Hepes pH8	NaCl 20 mM	0 mM	"	1 μM	La bille va au sol à basse force et remonte par palier quand on augmente la force ; à une force donnée, l'extension fluctue
"	"	1 mM	"	"	effets identiques à ci-dessus

Tableau 3.2 - Expériences menées avec MutS sur une molécule sans mésappariement toutes ces expériences ont été effectuées sans pluronic. Deux tampons ont été utilisés pour ces expériences : un tampon Hepes et un tampon Tris-HCl. Le tampon Hepes est le même tampon que celui utilisé dans les expériences de microscopie électronique effectués par l'équipe de Paul Modrich [4]

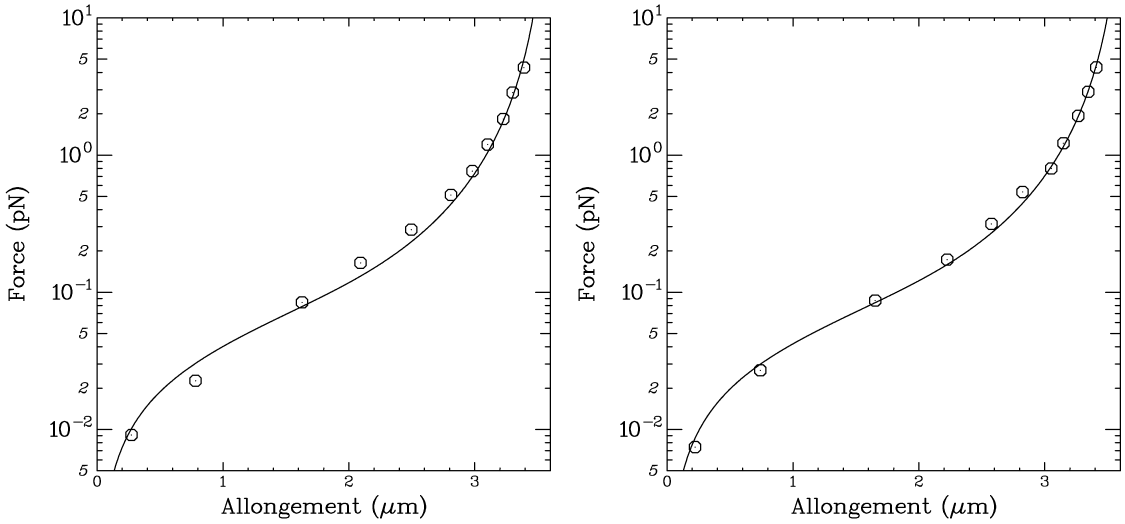

Figure 3.11 - Courbes forces extension avec et sans MutS. Le capillaire a été mis en contact avec du pluronic, puis rincé. Les deux courbes sans MutS (figure de gauche) et avec MutS (figure de droite) ont été ajustées avec le modèle du ver. Pour la courbe de droite on a une longueur de la molécule $L_0 = 3,63$ µm $\pm\, 0,02$ et une longueur de persistance $L_p = 46$ nm $\pm\, 2$. Pour la courbe de gauche on a une longueur de la molécule $L_0 = 3,67$ µm $\pm\, 0,02$ et une longueur de persistance $L_p = 44$ nm $\pm\, 2$.

aussi envisager l'hypothèse que cet allongement est dû à une rupture d'une des liaison antigène-anticorps qui fixe la molécule à la surface, la molécule restant cependant attachée à la surface du fait de la présence de ligands multiples entre la surface et la molécule.

De même nous n'avons pas obtenu de données qui puissent trancher sur la validité, ou non, du modèle selon lequel MutS se comporterait en une pince coulissante (modèle proposée par Richard Fishel [1]), qui se charge de façon itérative et va chercher un mésappariement en recouvrant l'ADN de protéines entre le mésappariement et le site GATC le plus proche. Nous n'avons pas mis en évidence, sur des capillaires passivés au pluronic de changements de propriétés mécaniques de l'ADN. Il n'est cependant pas exclu que la sensibilité de la mesure, pour la raideur longitudinale de l'ADN ou la longueur de persistance, ait été insuffisante. Pour le modèle de polymérisation, les mêmes remarques s'appliquent.

Chapitre 4

Micromanipulation d'une jonction de Holliday

« Le sage n'affirme rien qu'il ne puisse prouver. »

Proverbe latin

4.1 Expériences sur une jonction de Holliday

Ce chapitre présente des expériences de micromanipulation de jonctions de Holliday avec la pince magnétique. Nous avons montré qu'on pouvait former une jonction de Holliday par surenroulement à partir d'une construction d'ADN palindromique[1] (formation marquée par une brusque diminution de l'extension à partir d'un certain nombre de tours négatifs). Une fois la jonction de Holliday formée, si on continue à sous-enrouler, la courbe de l'extension en fonction du nombre de tours devient une droite ; cette droite est due à un échange entre les paires de bases contenues dans les « bras verticaux » de la jonction de Holliday pour former « les bras horizontaux ». On peut donc contrôler mécaniquement la quantité de brins échangés entre les bras verticaux et horizontaux sur plusieurs milliers de bases. L'extension de la molécule diminuant lorsqu'on augmente le nombre de tours (et inversement), nous sommes en présence d'un « engrenage moléculaire » qui transforme une rotation en une translation.

En outre dans ces expériences la pente de la droite de migration de la jonction est relié au pas de l'ADN ; cette pente dépend également de la force de traction. On a mesuré les pentes pour différentes forces, ce qui nous a permis, en utilisant le modèle du ver pour l'élasticité de l'ADN, d'obtenir une mesure du pas de l'ADN en solution : $3,61 \pm 0,03$ nm. Nous avons également mesuré avec cette méthode le pas de l'hélice d'ADN dans différentes conditions de solution, en variant le sel, le pH et aussi avec un intercalant de l'ADN : le Bromure d'Ethidium.

Ce travail a été publié dans la revue Physical Review Letter : PRL **96**, 188102-188106 (2006) avec des « supplementary data » disponibles sur le site EPAPS (http ://www.aip.org/pubservs/epaps.html) sous le numéro E-PRLTAO-96-063616.

[1] *i.e.* construction symétrique par rapport à son centre (un exemple de palindrome en français étant : « engage le jeu que je le gagne » symétrique par rapport au « q »)

4.2 Article : PRL 96, 188102 (2006)

PRL **96,** 188102 (2006) PHYSICAL REVIEW LETTERS week ending 12 MAY 2006

Mechanically Controlled DNA Extrusion from a Palindromic Sequence by Single Molecule Micromanipulation

Alexandre Dawid,[1] Fabien Guillemot,[1] Camille Brème,[1] Vincent Croquette,[2] and François Heslot[1,*]

[1]*Laboratoire Pierre Aigrain, Unité Mixte de Recherche 8551, Ecole Normale Supérieure, 24 Rue Lhomond, 75005 Paris, France*

[2]*Laboratoire de Physique Statistique, Unité Mixte de Recherche 8550, Ecole Normale Supérieure, 24 Rue Lhomond, 75005 Paris, France*

(Received 2 December 2005; published 10 May 2006)

A magnetic tweezers setup is used to control both the stretching force and the relative linking number ΔLk of a palindromic DNA molecule. We show here, in absence of divalent ions, that twisting negatively the molecule while stretching it at $\sim$1 pN induces the formation of a cruciform DNA structure. Furthermore, once the cruciform DNA structure is formed, the extrusion of several kilo-base pairs of palindromic DNA sequence is directly and reversibly controlled by varying ΔLk. Indeed the branch point behaves as a nanomechanical gear that links rotation with translation, a feature related to the helicity of DNA. We obtain experimentally a very good linear relationship between the extension of the molecule and ΔLk. We use then this experiment to obtain a precise measurement of the pitch of B-DNA in solution : 3.61 $\pm$ 0.03 nm/turn.

DOI: 10.1103/PhysRevLett.96.188102 PACS numbers: 87.14.Gg, 82.37.Rs , 87.15.He, 87.15.La

Cruciform DNA structures may be encountered *in vivo*, for example, at sites of inverted DNA repeats, or during homologous recombination events where they are termed "Holliday junctions" and perform strand exchange between two homologous DNA molecules [1,2]. Early models [3–5] and previous bulk experiments on plasmids [6–9] suggest that, due to the helicity of DNA, the formation of cruciform DNA and subsequent branch point migration (or strand exchange) may be controlled by mechanical torsion on a palindromic DNA sequence (i.e., on a sequence with a two-fold symmetry about its center). In the present work we use a single molecule micromanipulation technique to explore directly these properties.

We use a magnetic tweezers setup [10,11] to micromechanically control a $\sim$12 kb long palindromic DNA molecule [12]. The molecule is tethered between a glass surface and a paramagnetic bead. Multiple attachments at the extremities of the molecule ensure that the molecule is rotationally constrained. A pair of magnets, motor controlled above the sample, imposes the force and the rotation applied to the bead. Using video microscopy and image analysis of each video frame, the vertical and lateral positions of the tethered bead with respect to the surface of the sample is determined in real time. The extension of the molecule is deduced from the measurement of the average vertical position of the bead. The lateral Brownian fluctuations of the bead is analyzed to deduce, using the equipartition theorem, the vertical force exerted on the molecule [10].

Figure 1 shows an example of measurement of the extension of a palindromic DNA molecule as a function of the relative linking number ΔLk [13] for two levels of force. At low force (typically $<$0.5 pN), positive or negative values of ΔLk induce the formation of plectonemes, resulting in a symmetric reduction of the extension of the molecule around the torsionally relaxed state ΔLk $= 0$ (Fig. 1, circles). At higher forces ($\simeq$1–2 pN), the formation of plectonemes for negative values of ΔLk is prevented by the creation of denaturation bubbles [14] (Fig. 1, squares, arrow 1).

With the palindromic substrate used here, for sufficiently negative values of ΔLk (typically -50 to -400 turns, depending on the conditions, see Ref. [15]) an abrupt and irreversible shortening of the extension occurs (Fig. 1,

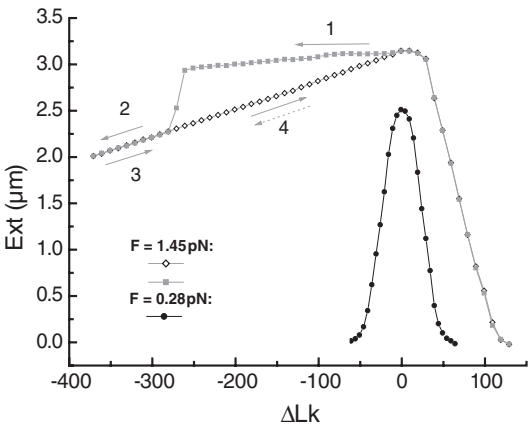

FIG. 1. DNA extrusion from of a palindromic molecule. Example of measurement of the extension (Ext) vs the relative linking number (ΔLk) of a palindromic DNA molecule, for two levels of force, 0.3 pN and 1.5 pN, respectively. The curves are obtained by averaging the extension every 10 turns for a period of 1 s to 4 min depending on the force level (arrows indicate the direction of rotations). Buffer conditions: 25 mM Tris-Acetate pH 8, 0.5 mM EDTA, 0.1% BSA, 0.01% NaN_3, $T = 27\,°C$. The slope of the curve segments 2, 3, and 4 is $\sim$3.1 nm/turn.

 © 2006 The American Physical Society

squares, $\Delta\mathrm{Lk} = -270$ turns); after which, as long as $\Delta\mathrm{Lk}$ stays negative, the system can be displaced reversibly back and forth along a well-defined slope (Fig. 1, open diamonds), showing that it is at a different equilibrium, and that the initial state before the transition was metastable.

Several arguments indicate that this transition corresponds to the formation of a cruciform DNA structure and that the slope corresponds to subsequent strand exchange (see Fig. 2): (i) The order of magnitude of the slope is in accordance with a rotationally induced strand exchange where each new turn added to the molecule produces the exchange of one turn of DNA through the branch point, varying the extension accordingly (see detailed analysis later). (ii) Once the shortening jump has occurred, the initial extension of the relaxed state is progressively recovered by decreasing $\Delta\mathrm{Lk}$ down to 0, as expected upon disappearance of the cruciform structure; also, the only way to return to the initial configuration and form again denaturation bubbles by uncoiling, is to reach the value $\Delta\mathrm{Lk} = 0$. (iii) As expected for the formation of a cruciform structure and consistent with previous experiments on plasmids [16], a lower degree of uncoiling is needed for the transition to occur if the temperature is raised (see Ref. [15]). (iv) Consistent with previous experiments [16–18], magnesium ions dramatically hinder the transition and strongly affect the kinetics of the migration [19].

In the present conditions, without magnesium ions, the strand exchange is found to occur faster than the instrumental rotational speed limit of 6 tr/sec (data not shown). Once the Holliday junction is formed, the local value of the slope $d\mathrm{Ext}/d\Delta\mathrm{Lk}$ appears (at a given force) to be constant within our instrumental resolution: no sequence-specific (hence $\Delta\mathrm{Lk}$-dependant) change of slope was detected.

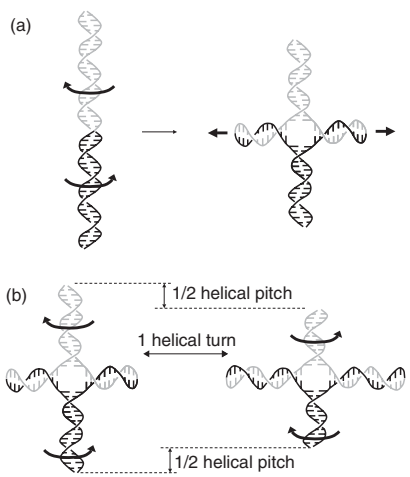

FIG. 2. Coupling between torsion and extrusion (arrows) for a palindromic DNA sequence. The gray and black double strands are related by a two-fold symmetry. (a) Cruciform DNA formation. (b) Strand exchange or branch point migration.

The cruciform DNA structure behaves like a nanomechanical gear that can be rotationally driven and that smoothly and reversibly converts linking number changes into vertical displacement. In the following, we use this remarkable feature to measure the helical pitch of DNA in solution.

The slope [slope(F)] of a migration curve depends on the vertical force F applied (Fig. 3). Because of the thermal agitation, the conformation of the molecule in space is fluctuating: in the force range studied, the molecule is not straight and the extension measured corresponds to the contour length $\mathcal{L}$ of the molecule scaled by a factor smaller than 1 (the relative extension λ): $\mathrm{Ext} = \lambda\mathcal{L}$, where λ depends on the force; the slope corresponds then to the pitch p of DNA scaled by the relative extension λ of the molecule:

$$\mathrm{slope} = d\mathrm{Ext}/d\Delta\mathrm{Lk} = \lambda d\mathcal{L}/d\Delta\mathrm{Lk} = \lambda p. \quad (1)$$

The curves obtained at different levels of force with an individual molecule form a spindle of lines that appear to converge toward a common intersection point. This intersection corresponds to the value of $\Delta\mathrm{Lk}$ for which the length of DNA in the vertical arms is zero. This point is determined by fitting each curve with a straight line while imposing a common intersection as a free parameter. Experimentally, this intersection point may not be reached for two reasons: (i) because of the labeling method for the molecules' extremities [12], there may not be an exactly equal length of DNA available for the strand exchange on each vertical arm; (ii) since the bead can freely rotate only about the direction of its paramagnetic momentum, which is imposed by the magnetic field, the anchoring position of the DNA may not be at the lowest position of the bead surface [20]; this leads to a steric hindrance between the bead itself and the capillary surface at short extensions.

In spite of the remarks above, the extrapolated intersection point gives, first, the total number of helical turns ($\mathrm{Lk}_{\mathrm{tot}}$) initially present within the molecule between the proximal biotin and digoxygenin attachments (because of the labeling method for the extremities of the molecules [12], this value may differ slightly between molecules). Secondly, it gives the exact zero extension reference which is then used here in order to improve the precision of both the extension and the force measurements.

The relative extension of DNA as a function of force $\lambda(F)$ is well described by the wormlike-chain (WLC) model [21] with only one parameter: the persistence length L_P of DNA [22]. Therefore, from the relation $\mathrm{Ext}(F) = \mathcal{L}\lambda(F)$, one can deduce the contour length $\mathcal{L}$ of a molecule by fitting its force-extension curve with the WLC model, and with $\mathcal{L}$ and L_P as free parameters. Since the migration spindle gives also the total number $\mathrm{Lk}_{\mathrm{tot}}$ of helical turns present inside the molecule, we have here all the elements to determine the helical pitch of DNA in solution $p = \mathcal{L}/\mathrm{Lk}_{\mathrm{tot}}$. Equivalently, the pitch p can also be determined directly by fitting the curve $\mathrm{slope}(F) = p\lambda(F)$ with the

PRL **96,** 188102 (2006) PHYSICAL REVIEW LETTERS week ending 12 MAY 2006

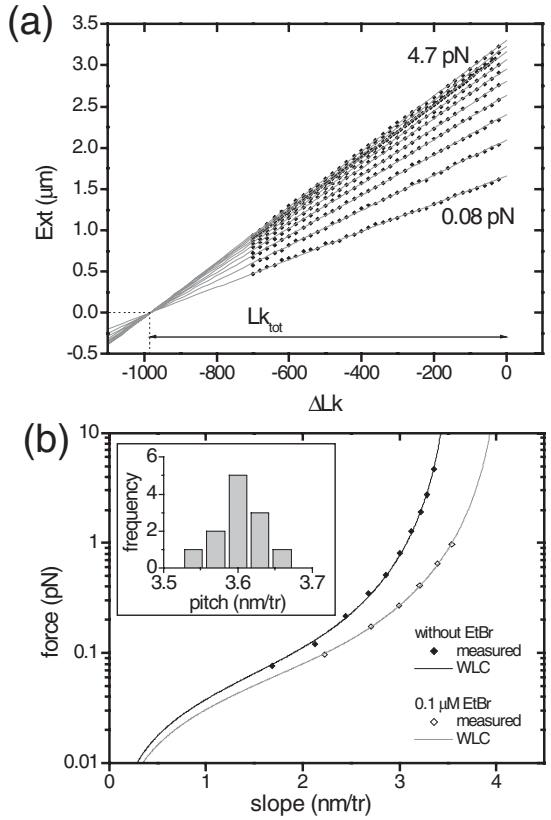

FIG. 3. Helical pitch measurement. (a) Migration curves (Ext vs ΔLk) at forces from 0.08 pN to 4.7 pN (buffer as in Fig. 1, $T = 37\,°\mathrm{C}$). Each curve is obtained by averaging together a forward and reverse extrusion. The same DNA molecule is used for all data points in this figure. Identical results are found on other molecules. gray lines: linear fits with a common intercept imposed. (b) Force vs slope (slope $= d\mathrm{Ext}/d\Delta\mathrm{Lk}$). Filled diamonds: results from the linear fits of the spindle in (a). Open diamonds: same experiment on another molecule in the presence of 0.1 μM of ethidium bromide (EtBr). Solid lines: fits using the WLC model (see text). Results: black line: $p = 3.59 \pm 0.01$ nm/turn, $L_P = 50 \pm 3$ nm; gray line: $p^{0.1\mathrm{EB}} = 4.12 \pm 0.05$ nm/turn, $L_P^{0.1\mathrm{EB}} = 52 \pm 5$ nm. Inset: pitch distribution obtained from 12 different DNA molecules in the absence of EtBr.

WLC model, and with p and L_P as free parameters. In the following we apply this second method. We use for the WLC model, the analytical approximation obtained by Bouchiat *et al.* [24] which approaches the exact solution to 0.01%.

The black solid line in Fig. 3(b) corresponds to the fit of the relation slope(F) using the data [Fig. 3(b), filled diamonds] obtained from the spindle in Fig. 3(a). We obtain for this particular experiment $p = 3.59$ nm/turn and $L_P = 50$ nm. By averaging the results of identical experiments on 12 different molecules [see inset Fig. 3(b) and Table I], we obtain $p = 3.61 \pm 0.03(SD)$ nm for the pitch of DNA in solution and $L_P = 50 \pm 2(SD)$ nm for the persistence length.

As a control that we measure the helical pitch of DNA, and to illustrate the sensitivity of our measurement, we have performed similar experiments in the presence of ethidium bromide, known to change the helicity of DNA upon intercalation [25] [Fig. 3(b), open diamonds]. Accordingly we found a significant increase of the pitch of the molecule. Also, in accordance with previous measurements [20], we found no significant variation of the persistence length (Table I).

Does the force exerted on the structure alter significantly the pitch measured? Indeed, stretching on two opposite arms of a cruciform DNA structure while imposing a fixed linking number may displace the equilibrium position of the branch point toward a lengthening of the tethered arms and also, consequently, toward their uncoiling. This effect may result in an artificial increase of the pitch measured. However, theoretical arguments and control experiments show that within our instrumental resolution this effect is insignificant (see Ref. [15]).

Finally, we have tested the effect of changing the temperature, salt, and pH conditions (Table I). In the range of conditions explored, and consistent with previous measurements [26], we found slight variations of the persistence length, but we detected no significant effect on the pitch of DNA.

It is to be noted that the value of the pitch of DNA *in solution* found in textbooks [27,28] is only indirectly inferred by taking an helical periodicity of 10.5 bp/turn [29–31] and assuming a rise of 0.34 nm/bp identical to that found in crystals [32] (even though effects of crystal packing might induce a change of the rise between the liquid environment and the crystal). On the other hand, a value of ~3.3 nm/bp for the rise has been found [33] by transient electric birefringence on small DNA fragments, but it involves a hydrodynamic model. Other measurements in liquid are, for example, the direct measurement by AFM [34] of the pitch (with low resolution), or the measurement of the average rise of DNA (contour length measurement by electron microscopy [35] on a DNA with a known number of bases); those, however, both involve the adsorption of DNA on a surface, hence possibly artifacts on the conformation of DNA. Our measurement in solution (3.61 ± 0.03 nm) (i) is significantly more precise than previous estimates, and (ii) confirms the 3.6 nm value usually assumed for the pitch of DNA in solution.

In conclusion, the present experiment is the first direct demonstration that branch migration can be controlled over a considerable molecular distance, by the relative linking number. The process in the absence of divalent ions appears to be fast (>6 turns/sec) and reversible. Such molecular configuration with a Holliday junction appears to be a prototype of a nanomechanical device that converts rotation to translation.

TABLE I. Helical pitch of DNA(p) and persistence length (L_P).

condition	p (nm) ($\pm SD$)	L_P (nm) ($\pm SD$)	number of molecules
standard[a]	3.61 ± 0.03	50 ± 2	12
std[a]+0.2 M KGlu[b]	3.59 ± 0.03	42 ± 2	3
std[a] but pH 7	3.59 ± 0.05	45 ± 3	6
std[a] but 27 °C	3.64 ± 0.06	46 ± 3	2
std[a]+0.1 μM EtBr[b]	4.12 ± 0.05	52 ± 5	3

[a]25 mM Tris-Acetate pH 8, 0.5 mM EDTA, 0.1% BSA, 0.01% NaN_3, 37 °C.
[b]KGlu: potassium glutamate, EtBr: ethidium bromide.

We thank R. Lavery and Y. Timsit for discussions, Z. Podemska for her technical help, and O. Saleh for his critical reading of the manuscript. This work has been funded by CNRS, MJENR, ACI "nano" and Universités Paris 6 and Paris 7. A. D. was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC).

*Electronic address: heslot@lpa.ens.fr

[1] N. Sigal and B. Alberts, J. Mol. Biol. **71**, 789 (1972).
[2] H. Potter and D. Dressler, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **73**, 3000 (1976).
[3] J. R. Platt, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **41**, 181 (1955).
[4] R. Holliday, Genetical Research **5**, 282 (1964).
[5] A. Gierer, Nature (London) **212**, 1480 (1966).
[6] D. M. Lilley, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **77**, 6468 (1980).
[7] N. Panayotatos and R. D. Wells, Nature (London) **289**, 466 (1981).
[8] K. Mizuuchi *et al.*, J. Mol. Biol. **156**, 229 (1982).
[9] X. P. Yang *et al.*, Biopolymers **45**, 69 (1998).
[10] T. R. Strick *et al.*, Science **271**, 1835 (1996).
[11] A. Dawid *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **101**, 11 611 (2004).
[12] The palindromic DNA molecule is obtained by head-to-head ligation of two identical 5.92 kb DNA duplexes, each prepared with the same protocol as for the "A fragment" described in Ref. [11] except that one is labeled with digoxygenin-modified nucleotides (dig) and the other with biotin-modified nucleotides (biot). The resulting DNA fragments are labeled at one extremity only (multiple ligands spanned over approximatively 1 kb), and the other extremity has a ligatable 4 bases overhang (HindIII cut). The ligation results in palindromic dimers where a fraction is tetherable (incorporating both dig and biot fragments). The DNA sequence on each side of the center of the palindrome is a cloned fragment of λ-phage DNA encompassing the region 23 130 bp (HindIII site) to 18 560 bp (KpnI site). Because of the labeling method, the exact tether length (free DNA encompassed between the bead and the surface) is not precisely known.
[13] The relative linking number ΔLk is defined as the algebraic number of turns added to the molecule, counted from the state where the molecule is linear and torsionally relaxed.
[14] T. R. Strick *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **95**, 10 579 (1998).
[15] See EPAPS Document No. E-PRLTAO-96-063616 for supplementary figures and material. For more information on EPAPS, see http://www.aip.org/pubservs/epaps.html.
[16] C. K. Singleton, J. Biol. Chem. **258**, 7661 (1983).
[17] A. J. Courey and J. C. Wang, Cell **33**, 817 (1983).
[18] I. G. Panyutin and P. Hsieh, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **91**, 2021 (1994).
[19] A. Dawid, unpublished.
[20] S. B. Smith *et al.*, Science **258**, 1122 (1992).
[21] M. Fixman and J. Kovac, J. Chem. Phys. **58**, 1564 (1973).
[22] An elastic modulus could be added as an enthalpic elastic term into the model; however, we constrained our measurements to forces below 5 pN where this enthalpic effect is negligible [23].
[23] S. B. Smith *et al.*, Science **271**, 795 (1996).
[24] C. Bouchiat *et al.*, Biophys. J. **76**, 409 (1999).
[25] J. C. Wang, J. Mol. Biol. **89**, 783 (1974).
[26] C. G. Baumann *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94**, 6185 (1997).
[27] L. Stryer *et al.*, *Biochemistry* (W. H. Freeman, New York, 2002), 5th ed.
[28] A. L. Lehninger *et al.*, *Principle of Biochemistry* (Worth Publishers, New York, 1993), 2nd ed.
[29] J. C. Wang, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **76**, 200 (1979).
[30] I. Goulet, Y. Zivanovic, and A. Prunell, Nucleic Acids Res. **15**, 2803 (1987).
[31] V. V. Rybenkov *et al.*, Nucleic Acids Res. **25**, 1412 (1997).
[32] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure* (Springer-Verlag, New York, 1984).
[33] J. G. Elias and D. Eden, Biopolymers **20**, 2369 (1981).
[34] J. X. Mou *et al.*, FEBS Lett. **371**, 279 (1995).
[35] H. J. Vollenweider *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **75**, 710 (1978).

4.3 Supplementary data

Ces «supplementary data» sont disponibles sur le site EPAPS (http ://www.aip.org/pubservs/epaps.html) sous le numéro E-PRLTAO-96-063616.

Supplementary data: Mechanically controlled DNA extrusion from a palindromic sequence by single molecule micromanipulation.

Variability for the transition

We present in this section examples of the variability observed for the formation of a Holliday junction, by using mechanical torsion on a single DNA molecule with a palindromic sequence:

Figure 1 shows the curves obtained for successive measurements on the same molecule, at a temperature of 32 °C, and a force of 1 pN. Starting from a positive or null ΔLk, ΔLk is decreased progressively until the transition occurs. The transition is observed here to vary typically within the range -200 to -400 turns for ΔLk.

Figure 2 shows the curves obtained for successive measurements on the same molecule, at a temperature of 37 °C, and a force of 1 pN. The transition range for ΔLk appears much more limited at this temperature (see also next figure). Also, with respect to the experiment at 32 °C the transition occurs here earlier, i.e. at a value of ΔLk closer to zero: the transition occurs more easily at a higher temperature.

Figure 3 shows the curves obtained for successive measurements on the same molecule, at a temperature of 37 °C, and for different forces, ranging from 0.26 pN to 2.3 pN. In this series of measurements, the presence of a possible "hotspot" for the transition appears: the transition seems to occur around the same value of ΔLk, i.e. the Holliday junction once formed is found in about the same region of the sequence.

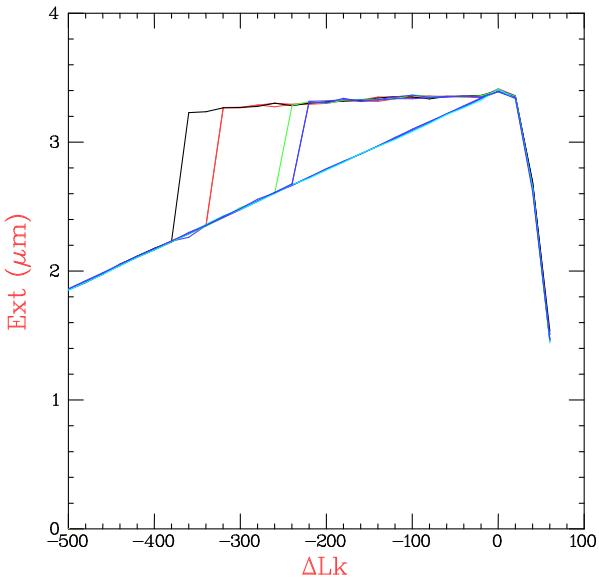

Figure 1: Experiments performed at 1 pN and a temperature of 32 °C. Data points are obtained using a time average of 2 s, and measurements are performed every 20 turns (with a speed of the motor of 6 tr/s).

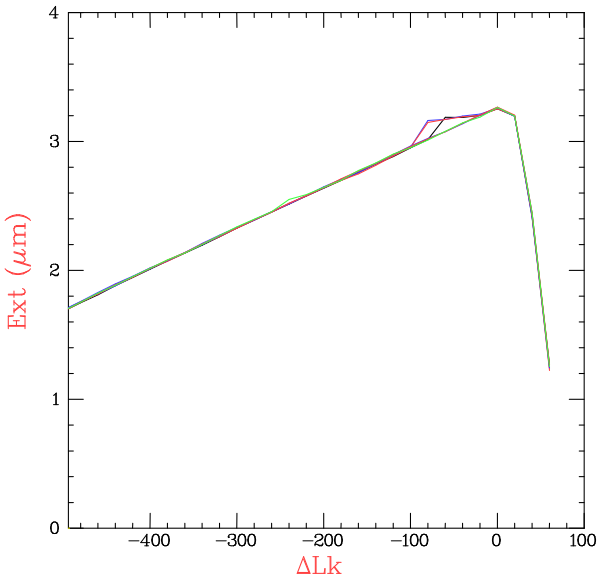

Figure 2: Experiments performed at 1 pN and at a temperature of 37 °C. Data points are obtained using a time average of 2 s, and measurements are performed every 20 turns (with a speed of the motor of 6 tr/s).

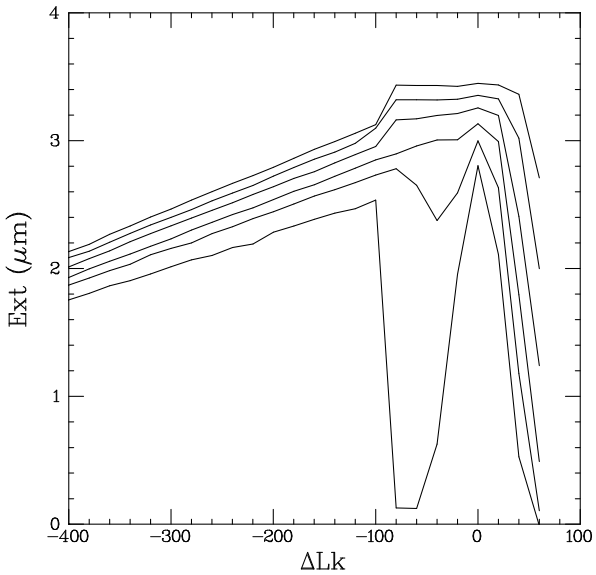

Figure 3: Experiments performed at a temperature of 37 °C and at the following forces (from the bottom curve to the top curve) : 0.26 pN, 0.43 pN, 0.63 pN, 1.0 pN, 1.5 pN, 2.3 pN. Data points are obtained using a time average of 2 s, and measurements are performed every 20 turns (with a speed of the motor of 6 tr/s).

Calibration of vertical movements of the beads

Measurement of vertical movements of the beads is performed using an image analysis system based on a calibration that uses controlled vertical displacements of the microscope objective [1]. These displacements of the objective are controlled via a capacitive sensor that has been calibrated at 0.4% precision with a Fabry-Perot interferometer (data not shown). Because we measure the movements of the beads via calibrated objective displacements, and because of the difference of optical index between the sample buffer and the immersion oil of the objective, a correction factor, corresponding to the ratio of these optical indices, must be applied to the apparent vertical displacements of the beads to deduce their real displacements. We experimentally checked that the correction factor indeed corresponds to the ratio of the optical indices (data not shown). This ratio as been measured at 0.01% precision (data not shown).

Refinement to the force and extension measurements

In magnetic tweezers experiments, there is usually a sizeable uncertainty on the zero extension reference. This reference is identified as the position of the glass surface which is obtained by letting the bead drop to the bottom of the sample; but this estimate is biased firstly by the continuous vertical Brownian fluctuations of the bead, and secondly by the steric hindrance of the bead itself at short extension (see text) which results in an unknown offset inasmuch as the bead radius (i.e. 500 nm) between the bead-surface distance measured and the true extension of the molecule. In the present configuration, the

spindle of Holliday junction migration curves allows to determine precisely the zero extension reference (corresponding to the vertical position of the intersection point), and the extension measurements have been rectified accordingly. As an important consequence, this also reduces significantly the uncertainty on the force measurement which depends on the extension through the equipartition theorem [2].

Force effect on the pitch measured

The force exerted on the structure may alter the pitch measured. Indeed, stretching on two opposite arms of a cruciform DNA structure while imposing a fixed linking number may displace the equilibrium position of the branch point toward a lengthening of the tethered arms and also, consequently, their uncoiling. Indeed, an increase $\Delta\mathcal{L}$ of the contour length $\mathcal{L}$ of the tethered arms leads to a reduction of the internal energy of the system by the value $F\Delta\mathrm{Ext}$, where $\Delta\mathrm{Ext} = \lambda\Delta\mathcal{L}$ is the corresponding extension variation; but it also leads to an increase of the torsional energy by the value $(1/2)(C/\mathcal{L})(2\pi\Delta\mathrm{Tw})^2$, where C is the torsional modulus of DNA, and $\Delta\mathrm{Tw} = -\Delta\mathcal{L}/p = -\Delta\mathrm{Ext}/(\lambda p)$ is the slight uncoiling that results from the exchange of a length $\Delta\mathcal{L}$ of single strands. Minimising the internal energy variation $\Delta E = -F\Delta\mathrm{Ext} + (1/2)(C/\mathcal{L})(2\pi\Delta\mathrm{Tw})^2$, one finds $\Delta\mathrm{Ext} = F\mathcal{L}(\lambda p)^2/(4\pi^2 C)$ and $\Delta\mathrm{Tw} = -F\mathcal{L}\lambda p/(4\pi^2 C)$. This effect may result in an artificial increase of the slopes of the migration curves by the value $\Delta\mathrm{slope} = F\lambda^2 p^3/(4\pi^2 C)$, and consequently in an overestimate of the pitch by the theoretical value of $\Delta p = \Delta\mathrm{slope}/\lambda = F\lambda p^3/(4\pi^2 C)$.

Taking $C \simeq 400$ pN nm^2 [3] and $p = 3.6$ nm/tr, and imposing $F < 5$ pN to stay in the entropic regime of elasticity [4], it results that $\lambda < 1$, and one finds theoretically $\Delta p/p < 0.004$, which is less than the experimental standard deviation on p.

Moreover, we performed the following control experiment. At $\Delta\mathrm{Lk} = 0$, the cruciform structure is completely intruded and the DNA is in a linear, not twisted state. Therefore, the force effect here above described cannot occur at $\Delta\mathrm{Lk} = 0$. We can thus estimate the force effect by comparing for each level of force the extension directly measured at $\Delta\mathrm{Lk} = 0$ to the value obtained by extrapolating the migration lines. Because the intersection point of the spindle is fixed, and because the force results in an artificial increase of the slopes of the migration curves, the extrapolated extension at $\Delta\mathrm{Lk} = 0$ may overestimate the real extension. However, within our 20 nm resolution, we did not detect experimentally any difference (data not shown). Notice also that a 20 nm uncertainty in length for ~ 1000 helical turns results in an uncertainty of only 0.02 nm/tr on the pitch, which is less than the uncertainty on p.

References

[1] C. Gosse and V. Croquette, Biophysical Journal, **82**, 3314 (2002).

[2] T.R. Strick *et al.*, Science **271** 1835 (1996)

[3] J.D. Moroz and P. Nelson, Macromolecules **31** 6333 (1998)

[4] S.B. Smith *et al.*, Science **258** 1122 (1992)

Chapitre 5

Effet du Bromure d'Ethidium sur la torsion d'une molécule d'ADN

« Des millions de gens ont vu tomber une pomme, Newton est le seul qui se soit demandé pourquoi. »
Bernard Baruch

Le bromure d'éthidium (EtBr) est un intercalant de l'ADN très utilisé en biologie. En effet le bromure d'éthidium est une molécule qui une fois intercalée dans l'ADN, est plus fluorescente en présence de lumière ultraviolette que si elle n'est pas intercalée. On s'en sert par exemple pour visualiser l'ADN dans les gels d'agarose.

Dans ce chapitre nous étudions, à l'échelle de la molécule unique, les propriétés mécaniques de l'ADN en présence de bromure d'éthidium. Ces expériences ont été effectuées en partie avec Peyman Memari durant son stage dans notre équipe.

5.1 Présentation du bromure d'éthidium

Le bromure d'éthidium est un intercalant de l'ADN, c'est-à-dire c'est une molécule qui peut s'insérer entre deux bases du double brin d'ADN. Il est connu qu'en présence de bromure d'éthidium la longueur et le pas de la molécule d'ADN changent : la longueur augmente et le pas également [128,86] (*cf* figure 5.1). Les modifications apportées aux molécules d'ADN vont dépendre du nombre de molécules de bromure d'éthidium intercalées. Il a été montré que la saturation était obtenue pour une molécule de bromure d'éthidium intercalée dans une paire de bases sur deux [86]

Des expériences ont été réalisées en molécule unique, sur l'extension mécanique de l'ADN à haute force, en présence ou non de bromure d'éthidium [25, 125]. Il a été montré que la courbe force extension changeait en fonction de la concentration en bromure d'éthidium, avec la disparition du plateau phase S à 60 pN.

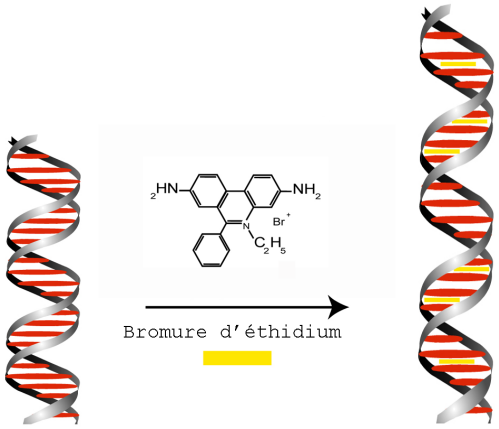

Figure 5.1 - Le bromure d'éthidium est un intercalant de l'ADN. Les molécules d'EtBr s'intercalent entre les paires de bases de l'ADN. Il en résulte une augmentation de la taille du pas ainsi qu'une augmentation de la longueur de la molécule .

5.2 Expériences en torsion

Nous avons ici étudié l'effet de l'ajout du bromure d'éthidium dans la solution sur le comportement mécanique en torsion de l'ADN double brin. À une concentration de $2,5$ µM, on observe des courbes extension en fonction du nombre de tours très différentes de celles sans bromure d'éthidium (*cf* figure 5.2). Le premier effet observé sur les courbes « en cloche » obtenues à basse force est un décalage des courbes vers les tours négatifs, et une augmentation de la longueur de la molécule. Ces observations s'interprètent par le fait que l'ajout de bromure d'éthidium induit une augmentation du pas de la molécule d'ADN, ce qui revient comme la bile ne tourne pas ajouter des tours négatifs à la molécule. Il en résulte donc un décalage vers les tours négatifs. On a également une augmentation du maximum d'extension, effet qui caractérise l'augmentation de la longueur de l'ADN, liée à l'intercalation de bromure d'éthidium.

Toujours en présence de $2,5$ µM d'EtBr, un autre type de phénomène est observé : le comportement différent en torsion de la molécule d'ADN. En effet sans bromure d'éthidium on observe trois régimes distincts (*cf* figure 5.2 à gauche) : (i) pour des forces $F < 1$ pN ou le couple exercé sur la molécule est faible, la courbe est symétrique par rapport au zéro de rotation[1]. En sur-enroulement et en sous-enroulement, on observe la formation de plectonèmes qui diminuent l'extension de la molécule. Ce sont des structures qui rappellent l'allure d'un cordon téléphonique entortillé [116]. (ii) pour des forces 1 pN $< F <$ $4,5$ pN, le comportement devient dissymétrique. Si le nombre de tours est positif, on observe toujours une diminution de l'extension due à l'apparition de plectonèmes. Si le nombre de tours est négatif, l'énergie de torsion est absorbée par l'apparition des bulles de dénaturation : des bases appariées se séparent

[1] le « zéro de rotation » correspond à la molécule tortionellement relaxée

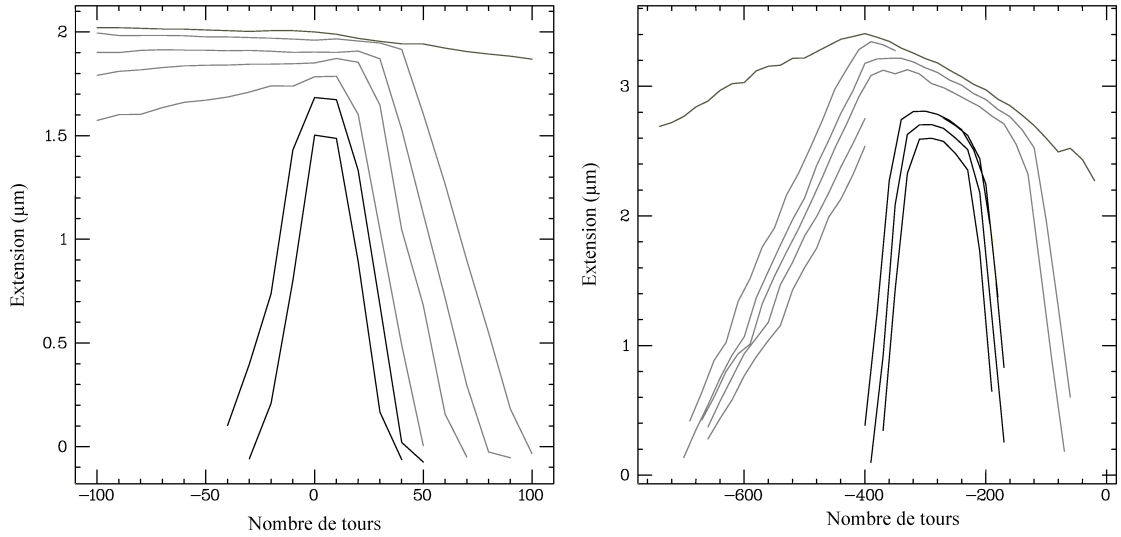

Figure 5.2 - Courbes extension en fonction du nombre de tours en l'absence et en présence de bromure d'éthidium. À gauche, courbes sans bromure d'éthidium, à droite courbe en présence de $2,5$ µM de bromure d'éthidium. Pour la courbe sans bromure d'éthidium, on retrouve les trois régimes (*cf* texte) : pour $F < 1$ pN (courbes noires) plectonème-plectonème, pour 1 pN $< F < 4,5$ pN (courbes gris clair) dénaturation-plectonème, pour $F > 4,5$ pN (courbes gris foncé) dénaturation-forme P. Pour la courbe en bromure d'éthidium, on observe également trois régimes : un à basse forces ($F < 1$ pN, courbes noires) pour lequel il y a une courbe qui semble approximativement symétrique, ce comportement est typique des plectonèmes. Un à force intermédiaire : (1 pN $< F < 4,5$ pN, courbes gris clair), pour lequel il y a encore des plectonèmes pour les tours positifs, pour les tours négatifs, on rencontre une région pour laquelle les courbes semblent convergentes vers 0. enfin une troisième région à haute force ($F > 4,5$ pN, courbes gris foncé), pour laquelle il n'y a plus de plectonème dans les tours positifs, et plus de convergence dans les tours négatifs.

pour ouvrir la double hélice [116]. (ii) pour $4,5$ pN $< F < 15$ pN, la courbe reste à une valeur quasi constante : si le nombre de tours imposés est négatif, nous avons toujours l'apparition des bulles de dénaturation. Par contre pour les tours positifs, nous avons apparition d'une forme de l'ADN dite « forme P », forme hélicale supposée avoir les bases éjectées vers l'extérieur de l'hélice et le squelette phosphaté vers l'intérieur [116].

En présence de bromure d'éthidium, on retrouve trois régimes distincts. (i) Pour une force $F < 1$ pN, on retrouve une courbe approximativement symétrique par rapport à l'abscisse $N_0 = -280$ tours, avec diminution de l'extension en sur-enroulant et en sous-enroulant par rapport à cette valeur N_0. Cela semble pouvoir être associé à la formation de plectonèmes. (ii) On rencontre pour les forces intermédiaires (1pN $< F < 4,5$ pN) un régime où les courbes semblent convergentes vers une extension nulle. Ce régime

ressemble fortement à celui décrit au chapitre 4, où lorsqu'on a formé une jonction de Holliday, les courbes convergent vers un point unique, à longueur nulle, et cela pour des tours négatifs. Cette ressemblance nous fait penser que nous avons peut-être induit ici une forme analogue à celle d'une jonction de Holliday. Pourtant pour former une jonction de Holliday, nous avons besoin d'une molécule d'ADN symétrique, ce qui n'est pas le cas ici. (iii) Pour des forces $F > 4,5$ pN, le comportement n'a pas encore été bien caractérisé dans le détail.

Pour interpréter cette analogie de comportement avec celui d'une jonction de Holliday, nous proposons le modèle suivant : lorsqu'il y a dénaturation (c'est-à-dire pour des forces 1pN $< F <$ 4,5 pN), des formes supposées de jonction, stabilisées par le bromure d'éthidium, se forment à des positions aléatoires dans la molécule, les bases n'interagissant pas au sens de Watson-crick (*cf* figure 5.3). On présente plus loin des expériences démontrant effectivement une forte attraction intrabrin de l'ADN simple brin en présence de bromure d'éthidium.

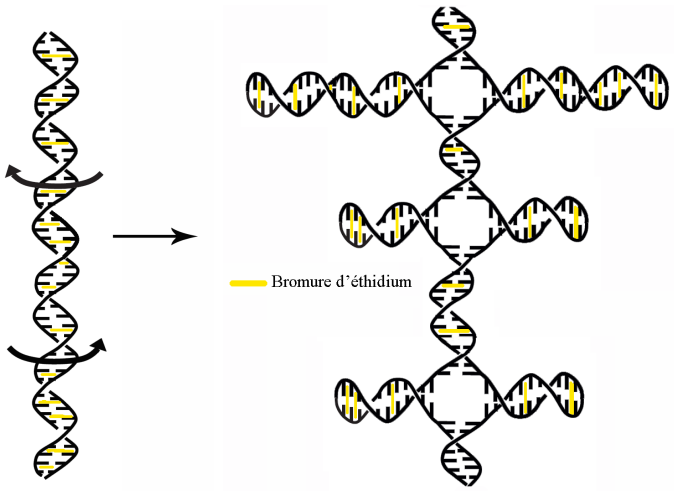

Figure 5.3 - Modèle de formation de « jonctions » en présence de bromure d'éthidium. La molécule de gauche n'est pas symétrique (non palindromique), sur la molécule de droite les bases qui interagissent sur les bras latéraux ne sont pas appariées au sens de Watson Crick. On suppose que le bromure d'éthidium induit une attraction interbrin, où il n'est pas nécessaire que les brins en regard présentent une base C en face d'une base G ou une base A en face d'une base T.

5.3 Effet de stabilisation de l'EtBr

5.3.1 Préparation de l'ADN simple brin

Afin de vérifier notre modèle d'attraction interbrin induite par le bromure d'éthidium, indépendamment de la séquence, nous avons effectué des expériences de mani-

pulation sur l'ADN simple brin. La méthode de fabrication de l'ADN simple brin est la suivante : nous avons une construction marquée sur une extrémité 3' par des ligands biotines et l'autre extrémité 3' avec des ligands digoxygénines. On réalise d'abord l'attachement des constructions d'ADN sur les billes streptavidines, qui vont se fixer à la biotine, puis nous faisons réagir une enzyme : la λ-exonucléase, qui ronge le brin d'ADN à partir d'une extrémité 5'. Cet opération est empêchée sur l'ADN du côté de la bille pour des raisons stériques. L'enzyme ne ronge donc qu'un des brins. Nous obtenons alors de l'ADN simple brin ancré sur les billes. L'extrémité 3' de cet ADN est toujours marquée avec des ligands digoxygénines, on peut donc l'ancrer sur la surface de l'échantillon recouvert d'anticorps dirigés contre la digoxygénine.

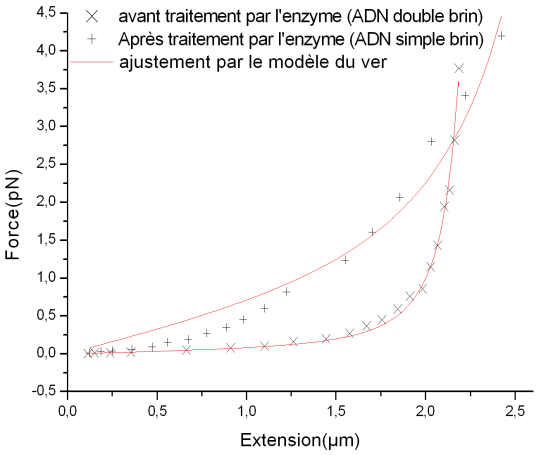

Figure 5.4 - Formation d'ADN simple brin par exonucléase. La courbe d'élasticité obtenue après l'ajout de l'enzyme est très différente de celle obtenue pour du double brin. La propriété caractéristique de l'ADN simple brin est qu'il est plus rigide aux basse force par rapport à l'ADN double brin ; par contre il peut s'allonger plus aux force élevées. Ce sont bien les caractéristiques que nous observons ici.

5.3.2 Le bromure d'éthidium stabilise les paires de bases non complémentaires

Lorqu'on introduit le bromure d'éthidium dans la solution, on observe un effet remarquable de compaction de l'ADN simple brin. Cette agrégation est très stable, pour une concentration en bromure d'éthidium de 254 µM il faut une force de l'ordre de 8 à 15 pN pour « défaire » cette compaction, ce qui est de l'ordre de grandeur de la force nécessaire pour séparer les brins de l'ADN double brin dans des conditions de tampon habituelle et sans bromure d'éthidium [19].

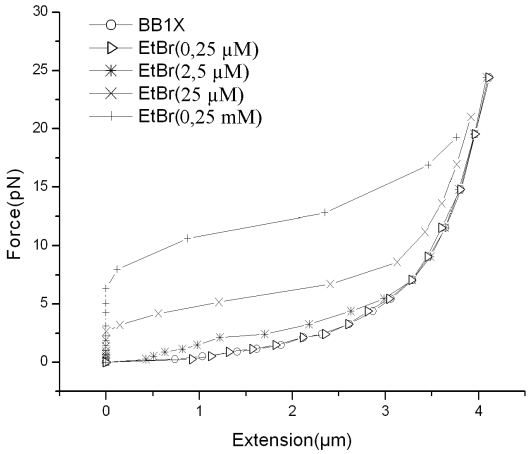

Figure 5.5 - Courbes forces extension avec un ADN simple brin en présence de bromure d'éthidium. La courbe d'élasticité obtenue après l'ajout du bromure d'éthidium sur une molécule d'ADN simple brin, montre que l'EtBr compacte la molécule.

On observe donc effectivement une forte stabilisation de l'ADN simple brin sur lui même. Cela est compatible avec notre hypothèse d'appariement interbrin en présence de bromure d'éthidium, ne nécessitant pas forcément la formation de paires du type Watson-Crick.

5.3.3 Ouverture de l'ADN en présence de bromure d'éthidium

Nous avons également utilisé la méthode précédente de préparation d'ADN simple brin, en utilisant des molécules d'ADN palindromiques. Ainsi, après action exonucléase, on se retrouve avec un simple brin symétrique par rapport son centre. Si on effectue les expériences de mesure de force en fonction de l'extension, on retrouve les caractéristiques d'une ouverture de deux brins d'ADN, On voit que dans les forces plus grande que 12 pN, il y a un saut de ~ 4 µm dans l'extension verticale de la molécule. Cet force est la force critique pour ouvrir de l'ADN double brin riche en couple A-T. L'ordre de grandeur coincide avec les résultats d'experiences d'ouverture avec la pince optique [19]. Le fait que au dessous de la force critique l'extension de la molécule n'arrive pas à zéro, est dû ici à l'existence d'un petit morceau de double brin qui reste au bout du dimère.

Si on ajoute du bromure d'éthidium, on observe que cela augmente la force nécessaire pour séparer les deux brins : pour une concentration en bromure d'éthidium de $0,25$ mM, il faut exercer une force d'environ 20 pN. Cette force est quasiment le double de celle nécessaire pour séparer les deux simples brins d'une molécule d'ADN, soit environ 13 pN. Le bromure d'éthidium semble donc stabiliser la molécule d'ADN dans sa configuration double brin apparié. Ce processus de stabilisation montré ci-dessus

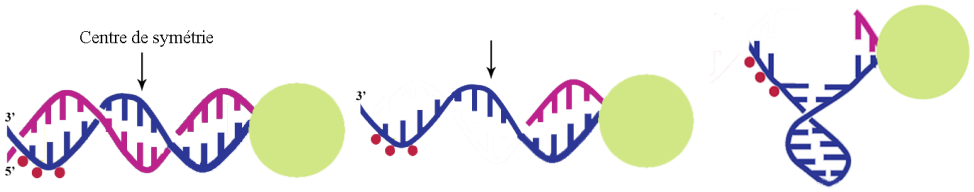

Figure 5.6 - Préparation de l'ADN simple brin à partir d'une molécule palindromique. La présence d'un centre de symétrie dans la molécule d'ADN permet l'appariement des bases du simple brin.

conduit donc à une augmentation de la force nécessaire pour séparer des brins d'ADN double brin d'environ 8 pN.

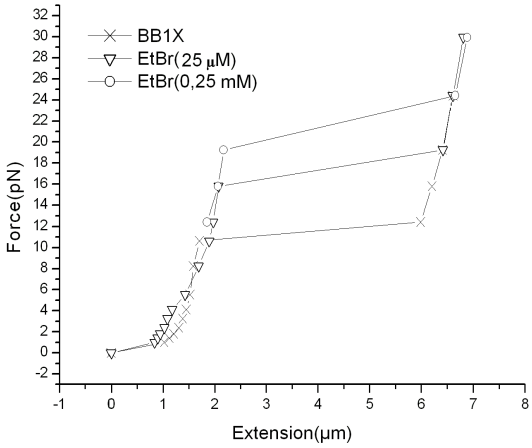

Figure 5.7 - Augmentation de la force nécessaire pour séparer des brins d'ADN double brin en présence de bromure d'éthidium. La présence de bromure d'éthidium conduit donc à une augmentation de la force nécessaire pour séparer des brins d'ADN double brin d'environ 8 pN.

5.4 Discussion des résultats

Nous avons montré dans ces expériences un effet de stabilisation des paires de bases dû au bromure d'éthidium. Le bromure d'éthidium induit des modifications dans les propriétés de la double hélice d'ADN : les courbes extension en fonction du nombre de tours sont modifiées, avec l'apparition d'une zone de courbes convergentes pour des forces comprises entre 1 pN et $4,5$ pN, pour des tours négatifs par rapport au

maximum d'extension de la molécule. Ce type de courbes rappelle celles observées avec une jonction de Holliday (*cf* chapitre 4).

Des expériences avec des molécules d'ADN simple brin ont montré que le bromure d'éthidium compactait la molécule, et qu'il fallait des forces de l'ordre de 8 à 10 pN pour retrouver de l'ADN simple brin. Cette force est de l'ordre de grandeur de celle de la séparation d'un ADN double brin [19]. De plus lorsqu'on sépare un double brin en présence de bromure d'éthidium, on observe une augmentation de la force nécessaire à la séparation : il faut une force de près de $20 - 22$ pN pour une concentration en bromure d'éthidium de $0,25$mM, soit une augmentation d'environ 8 pN par rapport à la situation sans bromure d'éthidium.

De façon remarquable, le bromure d'éthidium augmente donc l'interaction entre les deux brins d'ADN. De plus lorsque des bulles de dénaturation se forme, il semblerait favoriser la formation de « pseudo jonction » de Holliday (*cf* figure 5.3), du fait d'une interaction interbrin indépendante de la séquence.

Conclusion

« L'espérance est la plus grande de nos folies. »

Alfred de Vigny

Au cours de cette thèse nous avons utilisé des techniques de micromanipulation de molécules d'ADN pour chercher à déterminer quel est le mécanisme d'action de MutS, protéine qui initie le processus de réparation des erreurs d'appariement de l'ADN. Quatre modèles sont proposés dans la littérature pour décrire le mode d'action qu'aurait MutS pour que la réparation parvienne à utiliser le signal de discrimination du brin à réparer (qui est une séquence GATC hémiméthylée sur le brin matrice chez *Escherichia coli*) : un mécanisme où MutS formerait des boucles en hydrolysant de l'ATP ; un mécanisme où MutS se transformerait au contact d'un mésappariement en une pince coulissante qui se chargerait de façon itérative sur le brin d'ADN et qui coulisserait ; un mécanisme de recherche dans l'espace où MutS se chargerait sur un mésappariement puis rechercherait dans l'espace le signal discrimination ; enfin un mécanisme de polymérisation en « treadmilling » c'est-à-dire en « tapis roulant » où le mésappariement servirait de point de nucléation à une polymérisation de MutS dont la tête de chaîne polymériserait plus rapidement qu'en queue, on aurait donc un petit amas de MutS qui avancerait le long de l'ADN comme un tapis roulant.

Pour essayer de déterminer lequel de ces modèles pourrait être celui de l'action de MutS nous avons étudié sur pince magnétique l'ajout de MutS dans une solution contenant soit des molécules sans mésappariement afin de caractériser l'activité non-spécifique de MutS, soit des molécules avec mésappariement afin de déterminer le mode d'action spécifique de MutS. Nous avons été confrontés à un problème de « compaction » non spécifique de l'ADN, induite par la protéine MutSn dans des conditions de salinité (NaCl) de 50 mM. À faible force ($\lesssim 0,2$ pN), la distance bille surface devient nulle en présence de MutS. Il n'est pas exclu que cet effet soit dû à une adsorption non spécifique ADN-surface et non pas ADN-ADN induit par MutS. Cet effet est « non-spécifique », car identique en présence ou non de mésappariement dans la molécule d'ADN. Cet effet de compaction/adsoption non spécifique n'est pas observé si les expériences sont réalisées à une concentration en NaCl de 150 mM.

Si on procède à un traitement préalable de la surface de l'échantillon avec un surfactant non-ionique : pluronic, puis à un rinçage, les effets de compaction/adsoption non spécifiques, à 50 mM en NaCl disparaissent.

Malgré tout nos efforts, et dans toutes les conditions expérimentales testées, nous n'avons pas observé d'action mécanique spécifique de MutS, c'est-à-dire une action liée à la présence d'un mésappariement. Si on fait l'hypothèse que la compaction non spécifique est un artefact d'adsorption de surface (effet supprimé par le traitement au pluronic), on a alors aucune action mécanique observée, et ceci exclue alors la formation de boucle. Parmi les modèles qui ne font pas intervenir de boucles, dans l'ADN, il n'est cependant pas possible de déterminer ici, lequel est le modèle pertinent.

Nous avons également montré au cours de cette thèse qu'il était possible d'extruder une jonction de Holliday en sous enroulant une molécule d'ADN portant une séquence palindromique. La migration de la jonction peut alors être contrôlée mécaniquement. Une mesure du pas de l'ADN peut-être obtenu avec une telle étude et vérifie que le pas de l'ADN B en solution est de $3,61 \pm 0,03$ nm/tr. On peut également à l'aide de ces manipulations mesurer des modifications de la valeur du pas induite par un intercalant : le bromure d'éthidium.

Enfin l'étude de l'influence du bromure d'éthidium sur une molécule d'ADN a montré une remarquable stabilisation de la configuration où les bases sont appariées en présence de cet intercalant. Il a été montré que la force nécessaire à la séparation de deux brins complémentaires d'ADN était quasiment doublée en présence de bromure d'éthidium. De plus la molécule d'ADN a son comportement modifié en torsion en présence de cet intercalant : une zone de convergence équivalente à celle trouvée pour les jonctions de Holliday laisse supposer la formation de « pseudo jonction » de Holliday qui se forment grâce à la présence du bromure d'éthidium qui permet un appariement non spécifique de deux brins d'ADN en regard l'un de l'autre. Une telle hypothèse est confortée par le fait que le bromure d'éthidium induit une forte compaction de l'ADN simple brin, et donc une attraction intrabrin ne nécessitant pas une séquence particulière.

Annexe A

L'ADN et la production d'erreurs d'appariements

« On fait la science avec des faits, comme on fait une maison avec des pierres : mais une accumulation de faits n'est pas plus une science qu'un tas de pierres n'est une maison. »
Henri Poincaré

A.1 L'ADN

A.1.1 Un polymère

L'acide désoxyribonucléique (l'ADN) est un polymère de nucléotides. Les nucléotides sont des molécules formées de trois parties : la première partie est une base azotée dont il existe quatres types pour l'ADN : l'adenine (A), la cytosine (C), la guanine (G) et la thymine (T) ; la deuxième partie est un pentose (un sucre à cinq carbones) : le désoxyribose ; enfin la troisième partie est un groupement phosphate [84] (cf figure A.1).

C'est l'enchaînement de ces nucléotides reliés de façon covalente qui forment le polymère. Des groupements phosphates forment un pont entre le groupe 5'-OH d'un nucléotide et le groupe 3'-OH d'un autre nucléotide. On obtient une chaîne polynucléotidique composée d'un squelette (structure alternant pentoses et phosphates), porteur de base azotées à intervalles réguliers. Cette chaîne est appelée ADN simple brin [84] (cf figure A.1).

A.1.2 Structure de ce polymère

L'ADN est une molécule formée de deux brins d'ADN simple brin complémentaires qui forment une double hélice droite. Entre les deux brins de la double hélice les bases interagissent à l'aide de liaisons hydrogènes de façon spécifique pour former uniquement des paires A-T et G-C (avec deux liaisons pour A-T et trois pour G-C). De plus ces

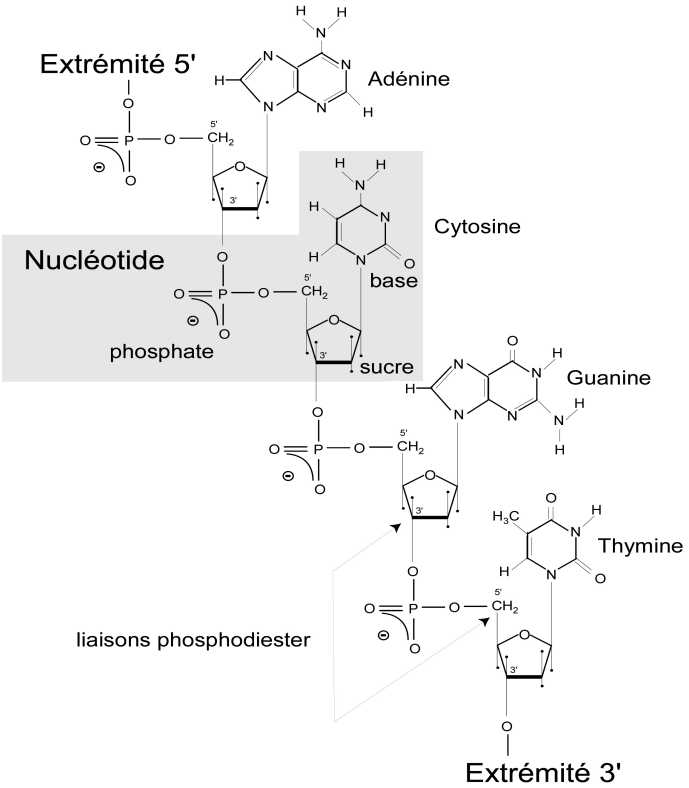

Figure A.1 - Structure d'un ADN simple brin constitué des quatres nucléotides. On remarquera l'orientation que possède un brin d'ADN, car une extrémité porte un groupement 5'-phosphate et l'autre un groupement 3'-hydroxyle.

deux brins sont appariés de façon anti-symétrique (c'est à dire tête bêche par rapport au squelette) (cf figure A.2).

Concernant la géométrie, cet ADN dit « ADN-B » a un diamètre d'environ 2 nm, un écart entre base d'environ 3,4 Å et on compte 10,5 paires de bases par tour d'hélice .

Il existe d'autres types de géométrie pour l'ADN, avec par exemple, « l'ADN-Z » qui a la même structure que l'« ADN-B » mais qui est une double hélice gauche [84] ; ou « l'ADN-A » rencontré dans les milieux dépourvus d'eau, est une double hélice droite, mais l'écart entre deux bases est de 2,3 Å et le nombre de bases par tours est de 11 [84].

A.1.3 Propriétés mécaniques de l'ADN

Courbes force-extension et modèle du ver

Une longue molécule d'ADN en solution n'est pas un bâtonnet rigide mais une pelote aléatoire constamment soumise à l'agitation thermique. Lorsqu'on observe une

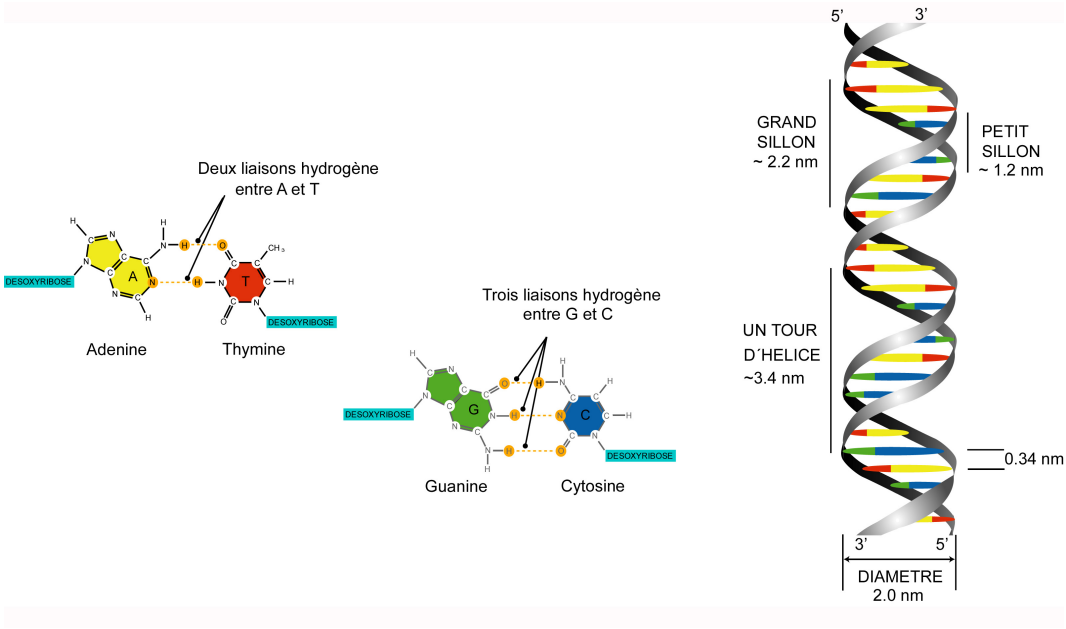

Figure A.2 - Structure de la double hélice d'ADN. Les deux brins sont complémentaires et anti-parallèles. L'adénine est représentée en jaune, la thymine en rouge, la cytosine en bleu et la guanine en vert. Les bases s'apparient au moyen de liaisons hydrogène : deux pour le couple adénine-thymine et trois pour le couple cytosine-guanine.

courbe force en fonction de l'extension pour une molécule d'ADN, on observe deux régimes pour des force inférieures à 10 pN : à faible force ($F < 0,1$ pN), l'extension augmente avec la force, on « débobine » la pelote que constitue la molécule d'ADN ; pour des forces plus élevées, la force augmente violemment pour une faible variation de la longueur de l'ADN, Ce régime intervient lorsque toute la pelote a été « débobinée », On étire alors la molécule d'ADN qui est très rigide de part la structure en double hélice.

Le modèle du ver permet de modéliser la relation entre la force appliquée à une molécule, l'extension correspondante et la longueur de persistance. Il consiste à considérer la molécule d'ADN comme un fil continu possédant de la courbure. L'énergie de la molécule est alors la somme de l'énergie de courbure et de l'énergie élastique due à la force de traction.

La rigidité locale de la molécule d'ADN est caractérisée par un paramètre appelé longueur de persistance L_p. Cette longueur représente la distance au delà de laquelle l'orientation d'ue extrémité d'un segment de longueur L_p de la molécule sera indépendante de l'orientation de l'autre extrémité de ce segment.

Il a été montré en 1994 [112] que le diagramme force-extension d'une molécule d'ADN double brin est bien décrit par ce modèle pour des forces inférieures à quelques dizaines de picoNewton. L'ordre de grandeur de L_p est de 50 nM. Une formule analy-

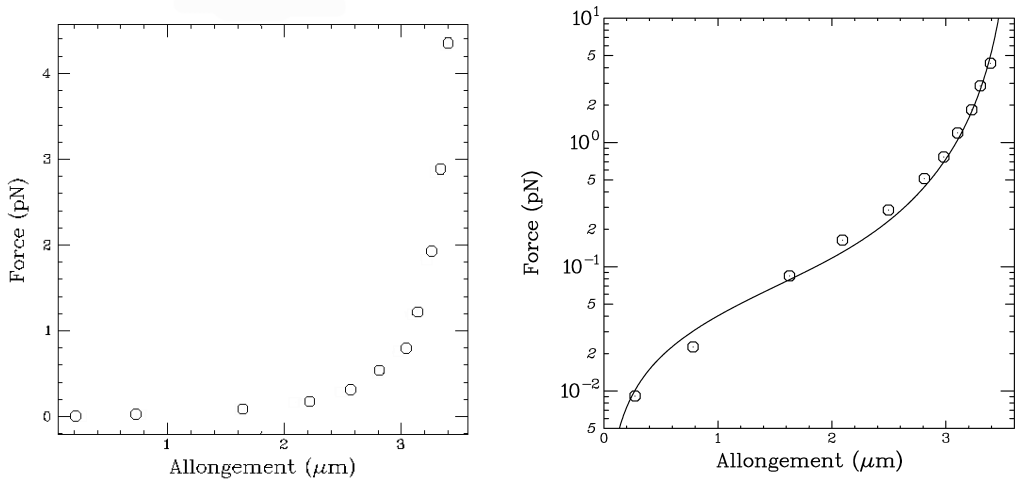

Figure A.3 - Extension d'une molécule d'ADN. Les deux courbes montrent l'allongement d'une molécule d'ADN en fonction de la force, avec différentes échelles. La courbe de droite a été ajustées avec le modèle du ver : longueur de la molécule $L_0 = 3,67$ µm $\pm\, 0,02$ et longueur de persistance $L_p = 44$ nm $\pm\, 2$.

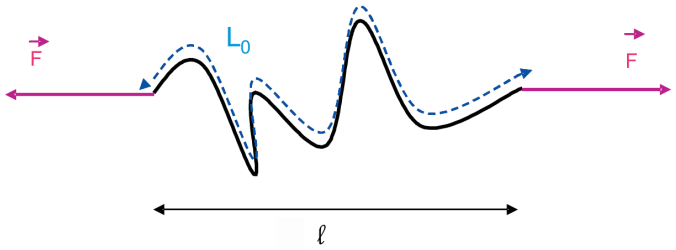

Figure A.4 - Modélisation de la molécule d'ADN. L'extension de la molécule ℓ dépend des forces auxquelles la molécule est soumise alors que sa longueur de contour L_0 est une donnée invariente.

tique approchée a été proposée [3] :

$$F = \frac{k_B T}{L_p}\left[\frac{1}{4(1-\ell/L_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{\ell}{L_0} + \sum_{i=2}^{7} \alpha_i \left(\frac{\ell}{L_0}\right)^i\right]$$

avec $\alpha_2 = -0.5164228$, $\alpha_3 = -2.737418$, $\alpha_4 = 16.07497$, $\alpha_5 = -38.87607$, $\alpha_6 = 39.49944$ et $\alpha_7 = -14.17718$ [3]. Ce modèle décrit très bien le comportement élastique de l'ADN double brin, mais il rend moins bien compte de l'élasticité du simple brin d'ADN.

Comportement en torsion

Lorsqu'on soumet une molécule d'ADN à une torsion, on observe les courbes de la figure A.5 . On remarque trois régimes distincts : (i) pour des forces $F < 1$ pN ou le couple exercé sur la molécule est faible, la courbe est symétrique par rapport au zéro de rotation (nombre de tours imposé nul). En sur-enroulement et en sous-enroulement, on observe la formation de plectonèmes qui diminuent l'extension de la molécule. Ce sont des structures en forme de tresses qui rappellent l'allure d'un cordon téléphonique entortillé [116]. (ii) pour des forces 1 pN $< F < 4,5$ pN, le comportement devient dissymétrique. Si le nombre de tours est positif, on observe toujours une diminution de l'extension due à l'apparition de plectonèmes. Si le nombre de tours est négatif, l'énergie de torsion est absorbée par l'apparition des bulles de dénaturation : les bases appariées se séparent pour ouvrir la double hélice [116]. (ii) pour $F > 4,5$ pN, la courbe reste à une valeur constante. Si le nombre de tours est négatif, nous avons toujours l'apparition des bulles de dénaturation. Par contre pour les tours positifs, nous avons apparition d'une forme de l'ADN dite « forme P », forme supposée avoir les bases éjectées vers l'extérieur et le squelette phosphaté vers l'intérieur [116].

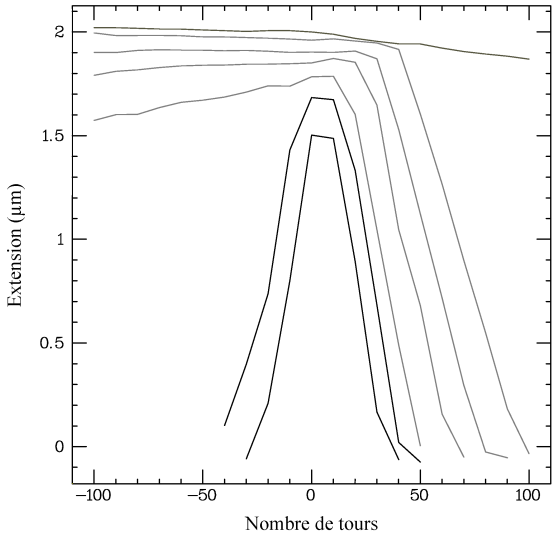

Figure A.5 - Courbes extension en fonction du nombre de tours. On retrouve les trois régimes (*cf* texte) : pour $F < 1$ pN (courbes noires) plectonème-plectonème, pour 1 pN $< F < 4,5$ pN (courbes gris clair) dénaturation-plectonème, pour $F > 4,5$ pN (courbes gris foncé) dénaturation-forme P.

A.2 La réplication de l'ADN

L'enchaînement des bases de l'ADN code notamment à la synthèse des protéines : un triplet de bases code pour un acide aminé. Ainsi l'enchaînement des acides aminés

de la protéine est déterminé par l'enchaînement des bases de l'ADN. [84]

Pour transmettre l'information génétique lors de la division cellulaire, l'ADN dans la cellule est répliqué : il s'agit d'un processus qui, à partir d'un ADN double brin père forme deux ADN double brin fils.

A.2.1 Le processus de réplication

La réplication est semi-conservative, c'est à dire que chaque simple brin de la molécule d'ADN double brin initiale sert de matrice pour former un nouveau brin. Elle est globalement bidirectionnelle, c'est à dire qu'à partir d'une origine donnée, elle se fait dans les deux directions. Par contre la synthèse du nouveau brin se fait toujours dans la direction 5' vers 3', il y a donc une des deux directions de synthèse qui va se faire de manière discontinue (cf figure A.6). Un des nouveaux brins est donc synthétisé en petits morceaux (appelés fragment d'Okazaki) qui font de l'ordre de 1000 à 2000 nucléotides de long chez les bactéries et 150 à 200 nucléotides chez les eucaryotes). L'autre direction de synthèse se fait de façon continue [84].

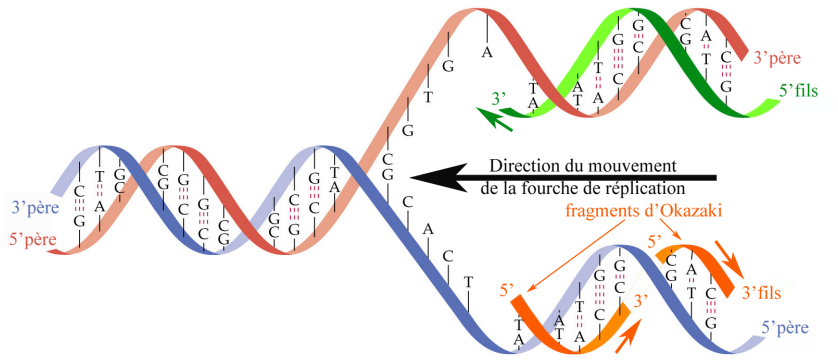

Figure A.6 - Schéma de principe d'une fourche de réplication. Les anciens brins sont représentés en rouge et bleu, les nouveaux brins en vert et orange. Les flèches vertes et oranges indiquent le sens de synthèse : du 5' vers le 3'. Un brin est synthétisé de manière continue (le vert) et un de manière discontinue dans la direction opposée à la direction de la fourche de réplication (le orange) en petits morceaux (dits fragments d'Okazaki).

A.2.2 Les polymérases : des protéines presque parfaites

La synthèse d'ADN se fait à l'aide de polymérases[1], qui sont des protéines guidées par la matrice ADN du brin à répliquer. La réaction de polymérisation va insérer le nucléotide complémentaire du brin matrice. Pour que la réaction de polymérisation

[1] chez *Escherichia coli* il existe trois polymérases, la réplication est assuré principalement par l'ADN polymérase III [84].

démarre, il y a besoin d'un « primer » : il s'agit d'un segment de nouveau brin (complémentaire du brin matrice) avec un groupe 3'-OH sur lequel la réaction peut démarrer. Ce « primer » est souvent un oligonucléotide d'ARN [84].

Ces protéines commettent quelques erreurs de recopie de la matrice, en moyenne elles insèrent environ tous les 10^4 à 10^5 nucléotides, un nucléotide qui n'est pas complémentaire de celui du brin marice [76]. Les polymérases ont souvent une activité appelée exonucléase 3' vers 5' qui permet d'enlever certains mauvais nucléotides ajoutés : c'est un mécanisme de correction. Une fois les nucléotides enlevés par l'activité exonucléase, la polymérase reprend la synthèse. Ce phénomène participe par un facteur 100 à 1000 à maintenir un faible taux d'erreur [42].

De façon globale la réplication se produit avec en moyenne une erreur pour 10^6 à 10^8 bases ajoutées. Or la fidélité de réplication chez la bactérie *Escherichia coli* (bactérie modèle beaucoup étudiée par les biologistes) est de une erreur pour 10^9 à 10^{10} bases. Cela suggère l'existence d'un autre système qui permet de diminuer les erreurs résiduelles de réplication dues aux polymérases [42].

A.2.3 Les erreurs d'appariements lors de la réplication

Les polymérases peuvent donc lors de la synthèse de brins produire des erreurs d'appariement que nous appellerons mésappariements. Différents types de mésappariements sont possibles. Il a été observé une hiérarchie dans la stabilité de ceux-ci, avec dans un ordre décroissant : GT>GG>GA>CT>AA=TT>AC=CC. LA stabilité est aussi modulable selon l'environnement de séquence [96].

L'insertion d'un mauvais nucléotide n'est qu'une des possibilités d'erreurs pouvant apparaître durant la réplication (figure A.7-A). D'autres erreurs peuvent être dues à des erreurs d'alignement du « primer » ou du brin matrice [75, 43]. Une première possibilité, appelée glissement (figure A.7-B) peut intervenir lorqu'il existe une séquence de nucléotides répétés : un décalage de séquence se produit qui est stabilisé par des appariements corrects autour. La polymérisation qui continue va produire : une boucle de délétion, si la (ou les) base non appariée est sur le brin à répliquer, ou une boucle d'insertion, si la (ou les) base est sur le brin nouvellement répliqué [75, 43].

Un autre type d'erreur est appelé erreur d'appariement puis réalignement (figure A.7-C) : une mauvaise base est incorporée, puis il se produit un glissement qui permet à cette base de s'apparier correctement avec la base suivante complémentaire. Cela produit une boucle de délétion [75, 43].

Une troisième possibilité, la dislocation (figure A.7-D), est la formation d'abord d'une boucle d'insertion ou de délétion par glissement, les bases suivantes sont incorporées correctement, puis un nouveau glissement se produit et créé une erreur d'appariement [75, 43].

On appellera homoduplexe un double brin d'ADN dont toutes les bases sont correctement appariées, et hétéroduplexe un double brin d'ADN qui possède soit au moins un mésappariement soit au moins une boucle d'insertion/délétion.

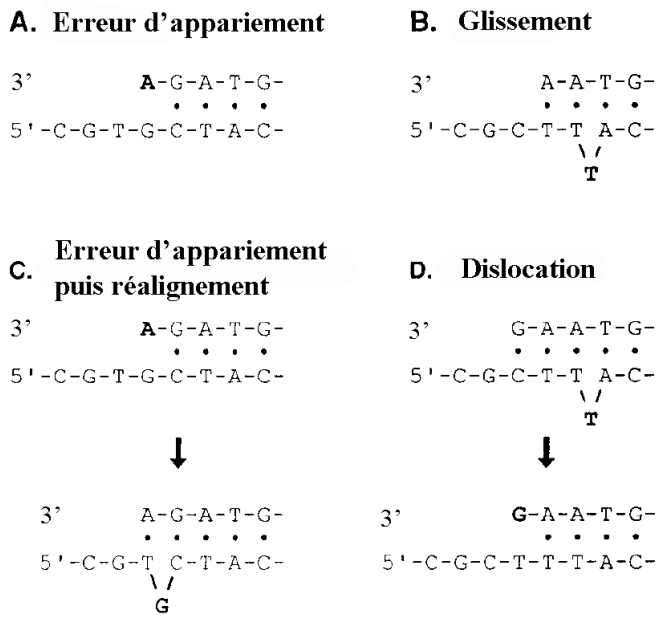

Figure A.7 - Exemples d'erreurs pouvant intervenir durant la réplication. Le brin matrice se trouve en bas de chaque figure. Les points représentent les appariements corrects.

A.2.4 Lésions d'ADN dues à la réplication

Lors du processus de réplication des lésions simple brin ou des cassures doubles brins sont susceptibles de se produire.

En effet, la polymérase peut rencontrer une base modifiée par agression chimique, ou encore par des UV. Cela peut entraîner une dissociation du réplisome[2]. Comme la réplication de *Escherichia coli* est discontinue [78], la polymérisation reprend mais la partie du brin comprise entre l'arrêt et le redémarrage de la réplication va rester sous forme simple brin. La taille moyenne de cette partie simple brin est comprise entre 100 et 800 nucléotides [78].

Dans un autre cas, si la molécule possède, avant la réplication, une cassure simple brin, la fourche de réplication est détruite lors du passage par cette lésion, ce qui entraîne la production d'une molécule à laquelle il manque un fragment sur les deux brins à la fois (figure A.8) [78].

Ces lésions sont létales pour la cellule si elles ne sont pas réparées [43]. C'est un des rôle de la recombinaison homologue de réparer ce type de lésion.

[2]c'est-à-dire de l'ensemble des protéines qui entrent en jeu dans la réplication

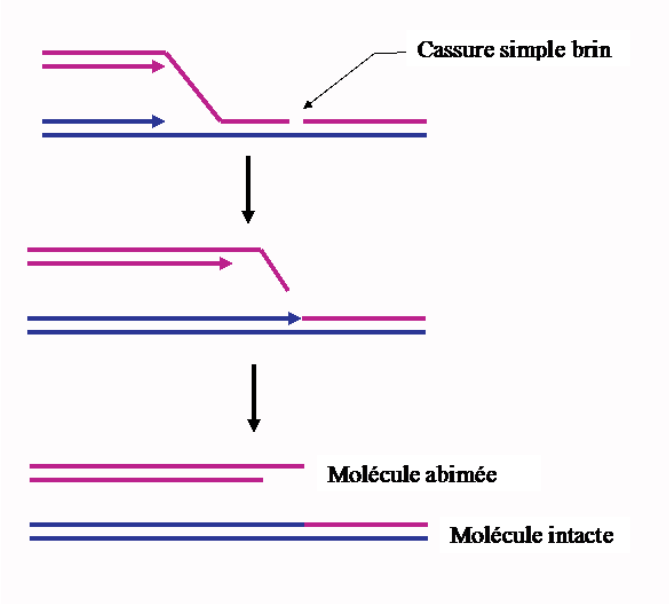

Figure A.8 - Représentation schématique de la production d'une lésion double brin lors de la réplication. La présence d'une lésion simple brin détruit la fourche de réplication, ce qui produit une cassure double brin. .

A.3 La recombinaison

A.3.1 La recombinaison et les jonctions de Holliday

La recombinaison homologue est un mécanisme d'échange d'information génétique entre deux molécules d'ADN portant des séquences homologues, c'est-à-dire similaires, mais pas nécessairement identiques. après une phase d'initiation faisant intervenir la protéine RecA, cet échange s'appuie ensuite sur une structure d'ADN particulière : la jonction de Holliday (cf figure A.9). Il s'agit d'une structure d'ADN en croix proposée pour la première fois par Robin Holliday [58]. La croix est formée par les quatre brins des deux molécules : les simples brins d'une molécule d'ADN double brin sont appariés avec les simples brins d'une deuxième molécule d'ADN double brin. Les bases situées de part et d'autre de la jonction peuvent s'échanger, on dit que la jonction de Holliday « migre ». On a donc, par ce processus, échange de brins entre les deux molécules d'ADN : il y a recombinaison.

Cette recombinaison a au moins deux fonctions chez les bactéries. Elle permet de générer de la diversité autrement que par des mutations ponctuelles. Ce processus permet un brassage efficace des séquences pour générer une nouvelle information génétique avantageuse pour l'organisme. Il permet également de réparer de nombreux types de dommages causés à l'ADN, comme les cassures doubles brins ou les « cross-links » double brins[3] [84].

[3]Liaison covalente entre les deux simple brins dune molécule d'ADN, qui empêche leur séparation

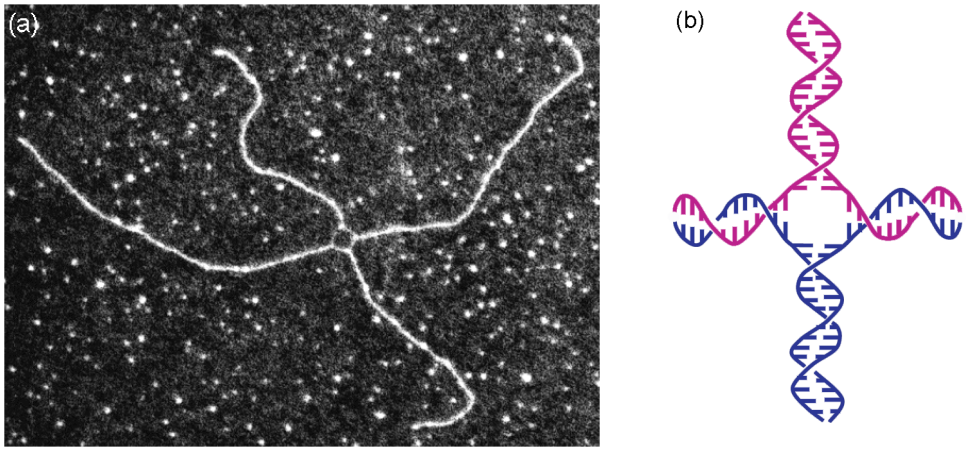

Figure A.9 - Structure d'une jonction de Holliday. (a) Image d'une jonction de Holliday obtenue par microscopie électronique (tirée de [32]) (b) Schéma illustrant une jonction de Holliday, entre deux brins d'ADN qui s'échangent des simples brins.

A.3.2 Réparation par recombinaison

La recombinaison permet une réparation d'un brin d'ADN endommagé dont l'information sur la séquence n'est pas disponible sur le brin complémentaire du brin endommagé. Le type de lésion peut être par exemple une cassure double brin, un « cross-link » double brin, ou une lésion simple brin produite pendant la réplication.

Pour illustrer ce système, nous présentons sur la figure A.10 la réparation d'une cassure double brin. Pour la bactérie *Escherichia coli*, ce processus requiert la protéine RecA qui initie la recombinaison. Cette protéine se fixe sur les simples brins et les stabilisent, elle favorise ainsi l'échange de simple brin entre le brin non endommagé complémentaire et le brin à réparer.

Ce système permet également de réparer une séquence d'ADN dégradée, par exemple en la comparant à une séquence identique mais intacte.

Chez *E. coli*, la protéine RecA permet d'initier l'invasion de l'ADN double brin, par une extrémité 3' d'ADN simple brin. Ce mécanisme permet de conduire à l'échange de brins entre un brin endommagé et le brin homologue non endommagé. Ainsi la lésion peut être réparée en utilisant comme matrice la séquence d'un ADN non endommagé [78, 30].

A.3.3 Production d'erreurs lors de la migration des jonctions de Holliday

Le mécanisme de recombinaison permet donc de réparer certaines lésions produites lors de la réplication. Ce mécanisme peut également produire des erreurs d'apparie-

résultant par exemple d'une agression chimique ou photo-chimique.

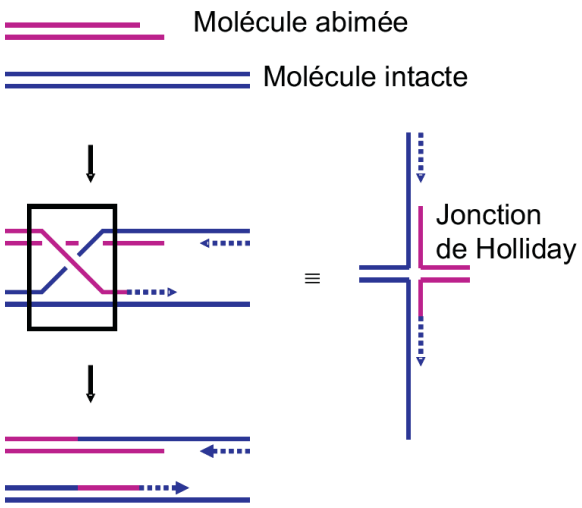

Figure A.10 - Modèle de réparation d'un brin d'ADN avec une jonction de Holliday comme un intermédiaire possible de la réparation. La molécule d'ADN abîmée se recombine avec une molécule intacte homologue en échangeant certaines de leur séquences. Elles adoptent une structure en croix (la jonction de Holliday). Les pointillés signifient que le brin manquant est synthétisé à partir du brin intact.

ments lors de la recombinaison entre des zones de séquence non exactement identiques.

En effet au cours de la migration de la jonction de Holliday, des mésappariements peuvent survenir là où les deux brins d'ADN diffèrent (figure A.11) ; la migration induite chez *E. coli* par le complexe RuvAB [30] peut en effet se produire même si les doubles brins formés ne sont pas exactement complémentaires.

Lors de l'introduction du modèle d'ADN cruciforme par R. Holliday, celui-ci avait supposé l'existence d'un système permettant de limiter un trop grand nombre de mésappariements [58]. Une des protéines qui régule ce mécanisme de migration de la jonction en limitant le nombre de mésappariements est effectivement la protéine MutS [133].

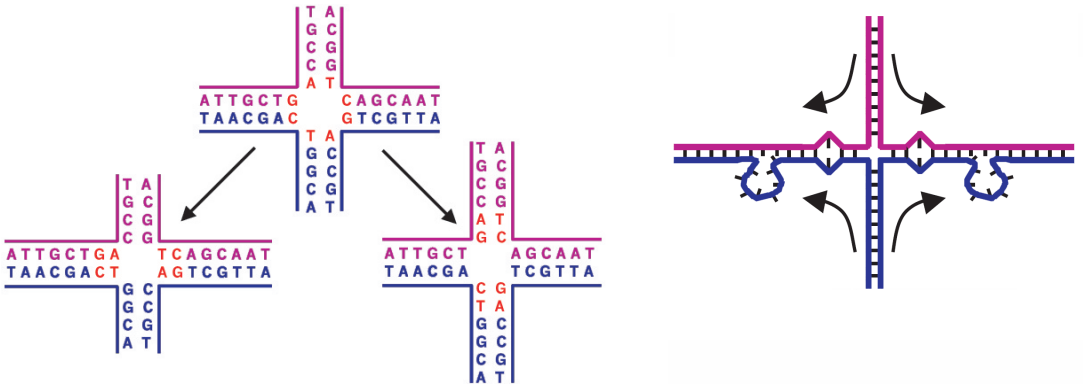

Figure A.11 - À gauche : recombinaison de deux molécules de séquences identiques par migration du centre de la jonction : les bases notée en rouge peuvent passer progressivement soit dans les bras horizontaux, soit dans les bras verticaux. À droite : recombinaison entre des molécules d'ADN présentant des hétérologies de séquences, ce qui entraîne la formation de mésappariements ou de boucles d'insertion.

Annexe B

Protocoles expérimentaux

« Chaque science, chaque étude, a son jargon inintelligible, qui semble n'être inventé que pour en défendre les approches. »

Voltaire

B.1 Constructions d'ADN

B.1.1 Schéma de préparation des ADN intervenant dans les constructions

On utilise un ADN plasmidique, possédant deux sites uniques de digestion (respectivement A et B, où le site A est cohésif, éventuellement palindromique). On procède à une digestion de restriction, pour couper le plasmide en B. On passe ensuite à une opération en deux temps, qui fait intervenir la polymérase de T4. La première étape consiste à faire incuber pendant un temps limité, la polymérase de T4 sans nucléotides, avec l'ADN (qui est linéarisé). Dans de telles conditions, la polymérase a une action exonucléase sur les extrémités 3'. On ajoute ensuite des nucléotides, dont une fraction est marquée avec un ligand. On utilise ainsi pour ce marquage soit du dig-dUTP, soit du biotine-dUTP, mélangés à du dATP, dCTP, dGTP et dTTP. Le ratio de concentration (dUTP-ligand) à (dTTP) est de 1/10. Après purification, on obtient un ADN dont les extrémités sont marquées avec des ligands multiples, et on s'arrange (temps limité de la phase T4-exonucléase) pour que les zones ainsi marquées de l'ADN n'aient pas atteint le site A. On procède ensuite à une digestion au site A, ce qui conduit à deux fragments, avec chaqu'un une extrémité cohésive (typiquement palindromique), l'autre extrémité étant marquées avec le ligand choisi. On passe enfin à une étape où on fixe aux extrémités cohésives, une paire d'oligonucléotides, de séquence choisie. La paire d'oligonucléotides est conçue pour présenter (i) à un bout, une extrémité palindromique cohésive, (compatible pour une ligation sur les extrémités « A » des fragments d'ADN qui viennent d'être préparés), et (ii) à l'autre bout une extrémité cohésive non-palindromique choisie. La paire d'oligonucléotide peut également servir à introduire un mésappariement (entre les deux séquences oligonucléotides). Une opé-

ration de ligation en présence d'un très grand excès de paires d'oligonucléotides par rapport aux fragments d'ADN (ratio 100/1), conduit essentiellement à « coiffer » les fragments avec une paire d'oligonucléotides. On peut s'arranger de plus (via le choix de séquence) pour que la jonction oligonucléotide-fragment d'ADN après ligation, soit non-redigérable par l'enzyme qui a conduit à la coupure « A ». Enfin, une opération de purification sur gel, permet d'obtenir in-fine un seul des types de fragments (6.5 kb de long ici), et débarrassé des oligonucléotides.

L'ADN en fin de préparation posséde un marquage multiple (digoxygénine ou biotine) à une extrémité, et une paire d'oligonucléotides de séquence choisie fixée à l'autre extrémité. Du coté oligonucléotides, l'extrémité du segment est cohésive (typiquement 4 bases sortantes), et non-palindromique, de sorte que cette extrémité ne peut pas s'assembler sur elle-même lors d'une ligation. Elle pourra par contre s'assembler par ligation avec un autre type de segment, (préparé par un protocole similaire mais avec des ligands de type différents), et possédant une extrémité (non-palindromique) complémentaire.

Une construction moléculaire est constituée ensuite de l'assemblage par ligation de ces deux types de segments d'ADN, l'un marqué biotine, l'autre marqué digoxygénine. Un mésappariement unique a été introduit (ou non) via une des paires d'oligonucléotides. Si de plus on a choisi la séquence des oligonucléotides comme indiqué précédemment, on peut enfin procéder à une digestion (restriction A), qui éliminera les éventuelles constructions parasites résultant d'assemblage de fragments qui n'auraient pas été « coiffés » d'oligonucléotides lors des étapes antérieures.

B.1.2 Séquence des oligonucléotides

On a utilisé pour la digestion « A » sur le plasmide, l'enzyme HindIII, de sorte que l'extrémité cohésive des fragments est constituée de 4 bases sortantes en 5', de séquence AGCT. Les paires $1+2$ et $3+4$ sont conçues pour se fixer sur ce type d'extrémité. La paire $1+2$ contient (ou ne contient pas) un mésappariement G/T unique. La paire $1+2$ est fixée sur un fragment « X » marqué digoxygénine, et la paire $3+4$ est fixée sur un fragment « Y » marqué biotine. Enfin (voir schéma d'assemblage ci-dessous) les paires $1+2$ et $3+4$ sont conçues pour s'assembler l'une sur l'autre.

```
Oligo 1 : AGCTCAATCTCAAGTGTCTCCAATCTCCGTCC
Oligo 2 : GGAGATTGGAGACGCTTGAGATTG
Oligo 3 : AGCTCGACACAAATCAGACAGACGGAC
Oligo 4 : GTCTGTCTGATTTGTGTCG

1+2                                          3+4

AGCT|
    CAATCTCAAGTGTCTCCAATCTCC GTCC                GTCTGTCTGATTTGTGTCG
    GTTAGAGTTCGCAGAGGTTAGAGG                 CAGGCAGACAGACTAAACACAGC
----^                                                             TCGA
```

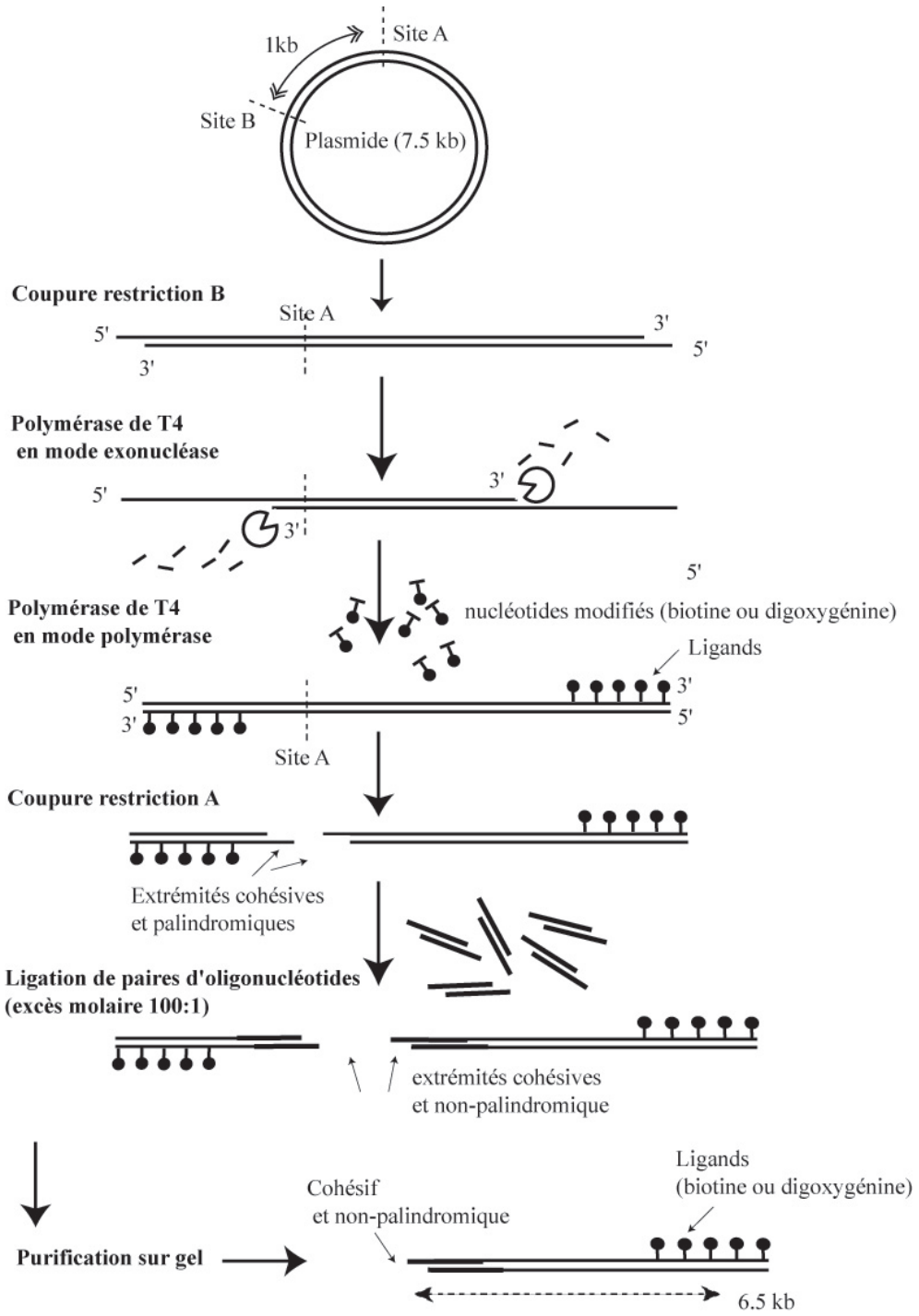

Figure B.1 - Schéma de principe du protocole utilisé pour les fragments d'ADN.

On peut donc obtenir au final une construction « X-Y », avec marquage digoxygénine à une extrémité, et biotine à l'autre. La construction finale présente un mésappa-

riement unique en son centre, si a choisi la paire $1 + 2$ avec mésappariement.

B.1.3 Protocole

L'ADN plasmidique utilisé est un dérivé du vecteur pBluescript KS(+) de Stratagene, digéré par HindIII et KpnI, et dans lequel un fragment KpnI-HindIII (4,6 kb) du phage Lambda a été inséré. Ce plasmide (don de D. Bensimon) a une taille de 7.5 kb. Pour une préparation de fragment, on digère (50 °C, 1 heure) 3 microgramme du plasmide, par l'enzyme BsaI (NEB). Puis on déphosphoryle les extrémités (Shrimp alkaline Phosphatase), et on inactive la phosphatase (65 °C, 15 minutes). Pour l'étape suivante, on complémente la solution à 50 mM NaCl (concentration finale), et on procède à une incubation de 10 minutes à 37 °C, avec 0.6 microlitres de polymérase de T4 (Fermentas). On rajoute ensuite les nucléotides : 60 μM dNTP final, avec 12 μM DIG-dUTP (ou Biot-dUTP). Après une incubation d'une heure (37 °C), on purifie l'ADN (Wizard SV gel and PCR, Promega), puis on le digère par HindIII (37 °C, 1 heure) , suivi de l'inactivation de HindIII (65 °C, 20 minutes). La paire d'oligonucléotide (voir précédent) est ajoutée dans un rapport molaire de 100 :1 par rapport aux fragments d'ADN digérés HindIII, on procède à une ligation (T4 ligase, NEB, 20 °C 4 heures), suivi de l'inactivation de la ligase (65 °C, 20 min). La préparation est mise sur un gel de 1%, et le fragment souhaité est excisé sur gel, puis purifié (Wizard SV gel and PCR, Promega) Deux fragments (l'un marqué digoxygénine, et l'autre marqué biotine sont ensuite assemblés via la ligase de T4 (12 heures 16 °C), suivi de l'inactivation de la ligase (65 °C 20 minutes). On peut ensuite procéder à une digestion par HindIII (37 °C, 1 heure) pour éliminer d'éventuels assemblages parasites (sans oligonucléotides, voir plus haut), suivi de l'inactivation thermique de HindIII (65 °C 20 minutes). La préparation est stockée au congélateur. Pour son utilisation, elle est diluée puis incubée avec des billes (dyna myone), qui sont recouvertes de biotine et sont paramagnétiques. Le mélange ADN-billes est ensuite injecté dans un capillaire en verre (section rectangulaire) qui est disposé sous microscope (montage de piège magnétique). La surface du capillaire a été au préalable traitée (dépôt de couche mince de polystyrène (via mélange polystyrène-toluène, puis séchage), suivi de l'adsorption sur la surface hydrophobe résultante, d' anticorps dirigés contre la digoxygénine (12 heures 37 °C).

B.2 Efficacité de rinçage d'un capillaire

Nous avons cherché durant cette thèse à déterminer quelle était l'efficacité de rinçage d'un capillaire lorsqu'on injecte 200 µL d'une solution. Pour cela on a utilisé le bromure d'éthidium.

On utilise une construction d'ADN dans un buffer ne contenant pas de bromure d'éthidium : 25 mM Tris Acetate pH 8, 0,5 mM EDTA, 10 $g \cdot L^{-1}$ de BSA, NaN_3 1×. Dans ce cas on mesure la longueur maximale et on fixe le zéro du nombre de tour lorsqu'on est à ce maximum. Puis on fait une échelle de longueur du maximum en fonction de la concentration en bromure d'éthidium.

On vérifie alors que deux rinçages successifs avec une même solution donnent les mêmes valeurs d'extension maximale et de décalage en rotation. Une introduction de 200 µL est donc suffisante pour introduire une solution dans les concentrations voulues dans le capillaire.

Il se pose alors la question du rinçage : a-t-on bien le nouveau milieu voulu ? Cela permettrait d'éviter de remettre un nouveau capillaire en place, ce qui est long (au mons 3 heures pour avoir un événement en place et être prêt à injecter le milieu voulu). Afin de tester l'efficacité de rinçage, on a donc utilisé le protocole suivant : On fait une échelle de longueur du maximum d'extension en fonction de la concentration en bromure d'éthidium introduite (*cf* figure B.2). Puis on introduit une solution à $12,7$ µM, on mesure l'extension du maximum : $5,50$ µm, puis on rince avec 200 µL d'une solution sans bromure d'éthidium. On trouve alors une longueur du maximum qui est inférieure à $4,1$ pm soit une concentration en bromure d'éthidium inférieure à $0,1$ µM. On a donc divisé la concentration au moins d'un facteur 100.

Cela permet donc d'affirmer qu'une introduction de 200 µL d'une solution permet d'avoir la concentration voulue dans le capillaire. De plus un rinçage de 200 µL d'une solution afin de changer le milieu, permet de faire descendre les concentrations d'un facteur 100.

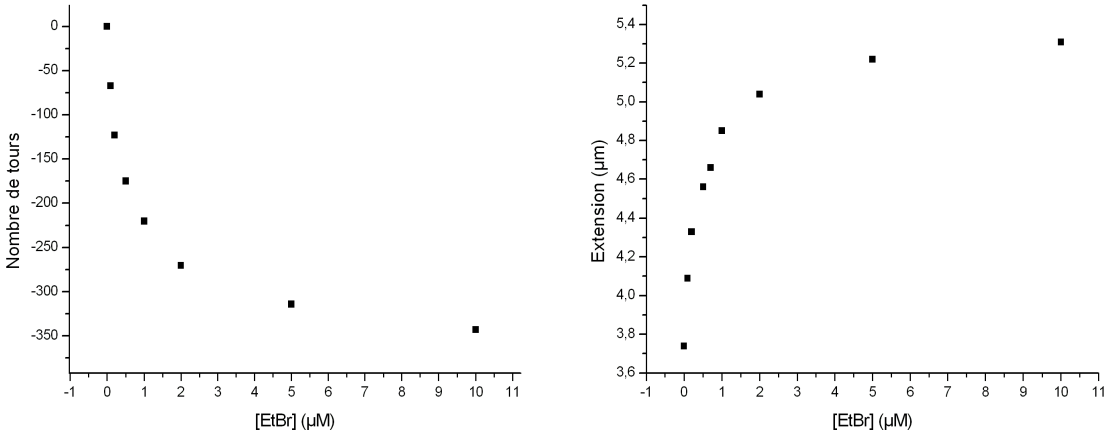

Figure B.2 - Exemple de variation de la longueur de la molécule d'ADN et du décalage en rotation par rapport à la concentration en bromure d'éthidium.

B.3 Gels d'électrophorèse

B.3.1 Principe de l'électrophorèse

L'électrophorèse est une technique de séparation qui utilise la charge électrique des molécules. Celles-ci vont migrer à des vitesses différentes (en fonction de leur charge et de leur conformation) lorsqu'elles sont placées dans un champ électrique.

L'ADN est une macromolécule polyanionique uniformément chargée lorsqu'elle est hydratée. De ce fait sous l'effet d'un champ électrique, des molécules d'ADN de différentes tailles peuvent migrer dans un gel et être séparées.

La séparation va donc être fonction :

- du choix de la nature du gel choisi pour l'électrophorèse : gel d'agarose (pour séparer des fragments dont les tailles sont comprises entre 0,5 et 20 kb) ou polyacrylamide (utilisé pour la séparation des petits fragments c'est-à-dire de moins de 1000 paires de bases) ;
- du diamètre des pores du gel utilisé (dépendant de la concentration du gel) ; les petites molécules ne « voient » pas les mailles du gel, tandis que celles qui sont plus grandes sont retardées du fait de leur interaction avec le gel.

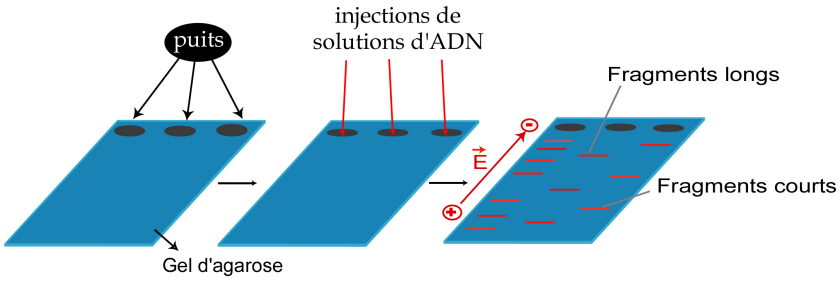

Figure B.3 - Schéma de l'électrophorèse horizontale sur gel d'agarose. Lors de la préparation du gel, des puits sont formées, dans lesquels sont injectés l'ADN à analyser. Un champ électrique est appliqué et provoque la migration des fragments à travers le gel (les fragments courts migrant plus rapidement que les fragments longs).

B.3.2 Visualisation

La visualisation de l'ADN peut se faire par coloration avec du bromure d'éthidium (EtBr) qui s'intercale entre les paires de bases. La molécule est fluorescente lorsqu'elle est éclairée par des UV courts (200-300nm), une fois intercalé dans l'ADN le bromure d'éthidium a une fluorescence plus importante que si il n'est pas intercalé. Cela permet de visualiser l'ADN.

La détermination de la taille d'un fragment se fait alors par comparaison avec la migration d'un témoin approprié contenant des fragments de tailles connues.

B.3.3 L'électrophorèse en champ pulsé

L'électrophorèse en champ pulsé est une technique utilisée pour séparer des fragments de taille supérieure à 20 kb.

Cela consiste à changer l'orientation et/ou la polarité du champ électrique alternativement au cours du temps. A chaque modification du champ, la molécule d'ADN

doit se réorienter parallèlement au nouveau champ, le temps nécessaire à la réorientation étant proportionnel à la longueur de la molécule. Lorsque le champ est rétabli dans son sens initial, la molécule doit une nouvelle fois se réorienter ce qui provoque un retardement de la migration proportionnel à la taille de la molécule. Le support de migration est un gel d'agarose à 1% et la taille des fragments séparés est de l'ordre de 50 kb à quelques mégabases.

Bibliographie

« Apprenez qu'un livre ne donne jamais ce qu'on en peut attendre. Il ne saurait donner une réponse à vos attentes. Il doit vous hérisser de points d'interrogation. »

Jean Cocteau

[1] Acharya S., Foster P. L., Brooks P., and Fishel R., The coordinated functions of the *E. coli* MutS and MutL proteins in mismatch repair. *Molecular Cell*, **12**(1), 233–246 (2003).

[2] Alani E., The Saccharomyces cerevisiae Msh2 and Msh6 proteins form a complex that specifically binds to duplex oligonucleotides containing mismatched DNA base pairs. *Molecular And Cellular Biology*, **16**(10), 5604–5615 (1996).

[3] Allemand J., Stricks T., Block S., Croquette V., Buchiat C., and Wang M., Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extention measurements. *Biophysical journal*, **76**, 409–413 (1999).

[4] Allen D. J., Makhov A., Grilley M., Taylor J., Thresher R., Modrich P., and Griffith J. D., MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism. *Embo Journal*, **16**(14), 4467–4476 (1997).

[5] Antony E. and Hingorani M. M., Asymmetric ATP binding and hydrolysis activity of the Thermus aquaticus MutS dimer is key to modulation of its interactions with mismatched DNA. *Biochemistry*, **43**(41), 13115–13128 (2004).

[6] Ashkin A., Acceleration and trapping of particules by radiation pressure. *Physical Review Letter*, **24**, 156–159 (1970).

[7] Au K. G., Welsh K., and Modrich P., Initiation of Methyl-Directed Mismatch Repair. *Journal of Biological Chemistry*, **267**(17), 12142–12148 (1992).

[8] Baitinger C., Burdett V., and Modrich P., Hydrolytically deficient MutS E694A is defective in the MutL dependent activation of MutH and in the mismatch dependent assembly of the MutS center dot MutL center dot heteroduplex complex. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(49), 49505–49511 (2003).

[9] Ban C., Junop M., and Yang W., Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis : A switch in DNA mismatch repair. *Cell*, **97**(1), 85–97 (1999).

[10] Ban C. and Yang W., Crystal Structure and ATPase Activity of MutL : Implications for DNA Repair and Mutagenesis. *Cell*, **95**, 541–552 (1998).

[11] Ban C. and Yang W., Structural basis for MutH activation in *E. coli* mismatch repair and relationship of MutH with endonucleases. *EMBO Journal*, **17**(5), 1526–1534 (1998).

[12] Biswas I., Ban C., Fleming K. G., Qin J., Lary J. W., Yphantis D. A., Yang W., and Hsieh P., Oligomerization of a MutS mismatch repair protein from Thermus aquaticus. *Journal of Biological Chemistry*, **274**(33), 23673–23678 (1999).

[13] Bjornson K. P., Allen D. J., and Modrich P., Modulation of MutS ATP hydrolysis by DNA cofactors. *Biochemistry*, **39**(11), 3176–3183 (2000).

[14] Bjornson K. P., Blackwell L. J., Sage H., Baitinger C., Allen D., and Modrich P., Assembly and molecular activities of the MutS tetramer. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(36), 34667–34673 (2003).

[15] Bjornson K. P. and Modrich P., Differential and simultaneous adenosine di- and triphosphate binding by MutS. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(20), 18557–18562 (2003).

[16] Blackwell L. J., Bjornson K. P., Allen D. J., and Modrich P., Distinct MutS DNA-binding modes that are differentially modulated by ATP binding and hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(36), 34339–34347 (2001).

[17] Blackwell L. J., Bjornson K. P., and Modrich P., DNA-dependent activation of the hMutSα ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, **273**(48), 32049–32054 (1998).

[18] Blackwell L. J., Martik D., Bjornson K. P., Bjornson E. S., and Modrich P., Nucleotide-promoted release of hMutSα from heteroduplex DNA is consistent with an ATP-dependent translocation Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, **273**(48), 32055–32062 (1998).

[19] Bockelmann U., Thomen P., Essavaz-Roulet B., Viasnoff V., and Heslot F., Unzipping DNA with optical tweezers : High Sequence Sensitivity and Force Flips. *Biophysical Journal*, **82**, 1537–1553 (2002).

[20] Brown J., Brown T., and Fox K. R., Affinity of mismatch-binding protein MutS for heteroduplexes containing different mismatches. *Biochemical Journal*, **354**, 627–633 (2001).

[21] Buermeyer A. B., Deschenes S. M., Baker S. M., and Liskay R. M., Mammalian DNA mismatch repair. *Annual Review of Genetics*, **33**, 533–564 (1999).

[22] Bustamente C., Macosko J. C., and Wuite G. J., Grabbing the Cat by the Tail : Manipulating mlecules one by one. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, **1**, 130–136 (2000).

[23] Calmann M. A., Nowosielska A., and Marinus M. G., The MutS C terminus is essential for mismatch repair activity in vivo. *Journal of Bacteriology*, **187**(18), 6577–6579 (2005).

[24] Calmann M. A., Nowosielska A., and Marinus M. G., Separation of mutation avoidance and antirecombination functions in an *Escherichia coli* MutS mutant. *Nucleic Acids Research*, **33**(4), 1193–1200 (2005).

[25] Cluzel P., Lebrun A., Heller C., Lavery R., Viovy J., Chatenay D., and Caron F., DNA : an extensible molecule. *Science*, **271**, 792–794 (1996).

[26] Colliex C. *Que sais-je ? la microscopie électronique.* Presses Universitaires de France (1998).

[27] Cooper D. L., Lahue R. S., and Modrich P., Methyl-Directed Mismatch Repair Is Bidirectional. *Journal of Biological Chemistry*, **268**(16), 11823–11829 (1993).

[28] Cox E. C., Bacterial Mutator Genes And The Control Of Spontaneous Mutation. *Annual Reviex of Genetics*, **10**, 135–156 (1976).

[29] Crick F., The double helix, a personnal view. *Nature*, **248**, 766–769 (1974).

[30] Dawid A., Recombinaison génétique à l'échelle de la molécule unique : micromécanique de jonctions de Holliday et activité du complexe RuvAB. *Thèse de l'Université Paris 6*, (2005).

[31] Dohet C., Wagner R., and Radman M., Repair of Defined Single Base-Pair Mismatches in *Escherichia coli. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **82**(2), 503–505 (1985).

[32] Dressler D. and Potter H., Molecular Mechanisms in Genetic-Recombination. *Annual Review of Biochemistry*, **51**, 727–761 (1982).

[33] Dubochet J., Ducommun M., Zollinger M., and Kellenberger E., A new preparation method for dark-field electron microscopy of biomacromolecules. *Journal of Ultrastructure Research*, **35**, 147–167 (1971).

[34] Essavaz-Roulet B., Bockelmann U., and Heslot F., Mechanical separation of the complementary strands of DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 11935–11940 (1997).

[35] Fabisiewicz A. and Worth L., *Escherichia coli* MutS,L modulate RuvAB-dependent branch migration between diverged DNA. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(12), 9413–9420 (2001).

[36] Fang W. H. and Modrich P., Human Strand-Specific Mismatch Repair Occurs by a Bidirectional Mechanism Similar to That of the Bacterial Reaction. *Journal of Biological Chemistry*, **268**(16), 11838–11844 (1993).

[37] Fishel R. and Kolodner R., Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer. *Current Opinion in Genetics and Development*, **5**, 382–395 (1995).

[38] Fishel R. and Wilson T., MutS homologs in mammalian cells. *Current Opinion in Structural Biology*, **7**, 105–113 (1997).

[39] Florin E. L., Moy V. T., and Gaub H. E., Adhesion force between individual ligand-receptor pairs. *Science*, **264**, 415–417 (1994).

[40] Fourrier L., Brooks P., and Malinge J. M., Binding discrimination of MutS to a set of lesions and compound lesions (base damage and mismatch) reveals its potential role as a cisplatin-damaged DNA sensing protein. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(23), 21267–21275 (2003).

[41] Fram R. J., Cusick P. S., Wilson J. M., and Marinus M. G., Mismatch Repair of *cis*-Diamminedichloroplatinum(II)-lnduced DNA Damage. *Molecular Pharmacology*, **28**(1), 51–55 (1985).

[42] Friedberg E. C., Walker G. C., and Siede W. *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press (1995).

[43] Friedberg E. C., Walker G. C., Siede W., Wood R. D., Schultz R. A., and Ellenberger T. *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press, second edition (2005).

[44] Glickman B. W. and Radman M., *Escherichia coli* mutator mutants deficient in methylation-instructed DNA mismatch correction. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, **77**, 1063–1067 (1980).

[45] Gradia S., Acharya S., and Fishel R., The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch. *Cell*, **91**(7), 995–1005 (1997).

[46] Gradia S., Acharya S., and Fishel R., The role of mismatched nucleotides in activating the hMSH2-hMSH6 Molecular Switch. *Journal of Biological Chemistry*, **275**(6), 3922–3930 (2000).

[47] Gradia S., Subramanian D., Wilson T., Acharya S., Makhov A., Griffith J., and Fishel R., hMSH2-hMSH6 forms a hydrolysis-independent sliding clamp on mismatched DNA. *Molecular Cell*, **3**(2), 255–261 (1999).

[48] Griffith J., Bleyman M., Rauch C. A., Kitchin P. A., and Englund P. T., Visualization of the bent helix in kinetoplast DNA by electron microscopy. *Cell*, **46**, 717–724 (1986).

[49] Grilley M., DNA and DNA-protein intermediates of methyl-directed mismatch correction in *Escherichia coli. PhD thesis, Duke University*, (1992).

[50] Grilley M., Griffith J., and Modrich P., Bidirectional Excision in Methyl-Directed Mismatch Repair. *Journal of Biological Chemistry*, **268**(16), 11830–11837 (1993).

[51] Grilley M., Welsh K. M., Su S. S., and Modrich P., Isolation and Characterization of the *Escherichia coli* MutL Gene-Product. *Journal of Biological Chemistry*, **264**(2), 1000–1004 (1989).

[52] Guarne A., Ramon-Maiques S., Wolff E. M., Ghirlando R., Hu X. J., Miller J. H., and Yang W., Structure of the MutL C-terminal domain : a model of intact MutL and its roles in mismatch repair. *Embo Journal*, **23**(21), 4134–4145 (2004).

[53] Haber L. T. and Walker G. C., Altering the Conserved Nucleotide Binding Motif in the *Salmonella-Typhimurium* MutS Mismatch Repair Protein Affects

Both Its ATPase and Mismatch Binding Activities. *EMBO Journal*, **10**(9), 2707–2715 (1991).

[54] Hall M. C. and Matson S. W., The *Escherichia coli* MutL protein physically interacts with MutH and stimulates the MutH-associated endonuclease activity. *Journal of Biological Chemistry*, **274**(3), 1306–1312 (1999).

[55] Hall M. C., Wang H., Erie D. A., and Kunkel T. A., High affinity cooperative DNA binding by the yeast MLH1-Pms1 heterodimer. *Journal of Molecular Biology*, **312**(4), 637–647 (2001).

[56] Harfe B. D. and Jinks-Robertson S., DNA mismatch repair and genetic instability. *Annual Review of Genetics*, **34**, 359–399 (2000).

[57] Herman G. E. and Modrich P. J., *Escherichia* textitcoli K-12 clones that overproduce *dam* methylase are hypermutable. *Journal of Bacteriology*, **145**, 644–646 (1981).

[58] Holliday R., A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetical Research*, **5**, 282–304 (1964).

[59] Hopfner K.-P. and Tainer J. A., DNA Mismatch Repair : The Hands of a Genome Guardian. *Structure*, **8**, R237–R241 (2000).

[60] Hsieh P., Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. *Mutation Research-DNA Repair*, **486**(2), 71–87 (2001).

[61] Iyer R. R., Pluciennik A., Vickers B., and Modrich P. L., DNA Mismatch Repair : Functions and Mechanisms. *Chemical Reviews*, **106**(2), 305–323 (2005).

[62] Iype L. E., Wood E. A., Inman R. B., and Cox M. M., Ruva and Ruvb Proteins Facilitate the Bypass of Heterologous DNA Insertions During RecA Protein-Mediated DNA Strand Exchange. *Journal of Biological Chemistry*, **269**(40), 24967–24978 (1994).

[63] Jiang J. J., Bai L., Surtees J. A., Gemici Z., Wang M. D., and Alani E., Detection of high-affinity and sliding clamp modes for MSH2-MSH6 by single-molecule unzipping force analysis. *Molecular Cell*, **20**(5), 771–781 (2005).

[64] Jiricny J., Eukaryotic mismatch repair : an update. *Mutation Research-DNA Repair*, **409**(3), 107–121 (1998).

[65] Jiricny J., Replication errors : cha(lle)nging the genome. *Embo Journal*, **17**(22), 6427–6436 (1998).

[66] Jiricny J., Mismatch repair : The praying hands of fidelity. *Current Biology*, **10**(21), R788–R790 (2000).

[67] Jiricny J., Su S. S., Wood S. G., and Modrich P., Mismatch-Containing Oligonucleotide Duplexes Bound by the *Escherichia coli* MutS-Encoded Protein. *Nucleic Acids Research*, **16**(16), 7843–7853 (1988).

[68] Joanicot M. and Revet B., DNA conformational studies from electron microscopy. I. Excluded volume effect and structure dimensionality. *Biopolymers*, **26**, 315–326 (1987).

[69] Jones M., Wagner R., and Radman M., Repair of a Mismatch Is Influenced by the Base Composition of the Surrounding Nucleotide-Sequence. *Genetics*, **115**(4), 605–610 (1987).

[70] Joshi A. and Rao B. J., ATP hydrolysis induces expansion of MutS contacts on heteroduplex : A case for MutS treadmilling ? *Biochemistry*, **41**(11), 3654–3666 (2002).

[71] Junop M. S., Obmolova G., Rausch K., Hsieh P., and Yang W., Composite active site of an ABC ATPase : MutS uses ATP to verify mismatch recognition and authorize DNA repair. *Molecular Cell*, **7**(1), 1–12 (2001).

[72] Karran P. and Marinus M., Mismatch correction at O^6-methylguanine residues in *E. coli* DNA. *Nature*, **296**, 868–869 (1982).

[73] Kolodner R., Biochemisry and genetics of eucaryotic mismatch repair. *Genes and Development*, **10**, 1433–1442 (1996).

[74] Kolodner R. and Marsischky G. T., Eucaryotic DNA mismatch repair. *Current Opinion in Genetics and Development*, **9**(1), 89–96 (1999).

[75] Kunkel T. A., DNA-Replication Fidelity. *Journal of Biological Chemistry*, **267**(26), 18251–18254 (1992).

[76] Kunkel T. A. and Bebenek R., DNA replication fidelity. *Annual Review of Biochemistry*, **69**, 497–529 (2000).

[77] Kunkel T. A. and Erie D. A., DNA mismatch repair. *Annual Review of Biochemistry*, **74**, 681–710 (2005).

[78] Kuzminov A., Recombinational Repair of DNA Damage in *Escherichia coli* and Bacteriophage λ. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, **63**(4), 751–813 (1999).

[79] Lahue R. S., Au K. G., and Modrich P., DNA Mismatch correction in a defined system. *Science*, **245**, 160–164 (1989).

[80] Lamers M. H., Gerogijevic D., Lebbink J. H., Winterwerp H. H. K., Agianian B., de Wind N., and Sixma T. K., ATP increases the affinity between MutS ATPase domains - Implications for ATP hydrolysis and conformational changes. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(42), 43879–43885 (2004).

[81] Lamers M. H., Perrakis A., Enzlin J. H., Winterwerp H. H. K., de Wind N., and Sixma T. K., The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a $G \cdot T$ mismatch. *Nature*, **407**(6805), 711–717 (2000).

[82] Lamers M. H., Winterwerp H. H. K., and Sixma T. K., The alternating ATPase domains of MutS control DNA mismatch repair. *Embo Journal*, **22**(3), 746–756 (2003).

[83] Längle-Rouault F., Maenhaut M. G., and Radman M., GATC sequences, DNA nicks and the MutH function in *Escherichia coli*. *EMBO Journal*, **6**, 1121–1127 (1987).

[84] Lehninger A. L., Nelson D. L., and Cox M. M. *Principle of Biochemistry*. Worth Publishers, New York, second edition (1993).

[85] Lia G., Bensimon D., Croquette V., J.-F. A., Dunlap D., Lewis D. E. A., Adhyal S., and Finzi L., Supercoiling and denaturation in GaI repressor/heat unstable nucleoid protein protein (HU)-mediated DNA loping. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, **100**(20), 11373–11377 (2003).

[86] Liu J. F. and Wang J. C., Degree of unwinding of DNA Helix by Ethidium .2. Studies by electron-microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, **395**(4), 405–412 (1975).

[87] Lu A. L., Clark S., and Modrich P., Methyl-Directed Repair of DNA Base-Pair Mismatches Invitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, **80**(15), 4639–4643 (1983).

[88] Marinus M. G. and Morris N. R., Biological function for 6-methylamidine residues in the DNA of *Escherichia coli*. *Journa of Molecular Biology*, **85**, 309–322 (1974).

[89] Marinus M. G., Poteete A., and Arraj J. A., Correlation of DNA adenine methylase activity with spontaneous mutability in *Escherichia coli* K-12. *Gene*, **28**, 123–125 (1984).

[90] Marsischky G. T. and Kolodner R. D., Biochemical characterization of the interaction between the Saccharomyces cerevisiae MSH2-MSH6 complex and mispaired bases in DNA. *Journal of Biological Chemistry*, **274**(38), 26668–26682 (1999).

[91] Marti T. M., Kunz C., and Fleck O., DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *Journal of Cellular Physiology*, **191**(1), 28–41 (2002).

[92] Martik D., Baitinger C., and Modrich P., Differential specificities and simultaneous occupancy of human MutSα nucleotide binding sites. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(27), 28402–28410 (2004).

[93] Matic I., Radman M., and Rayssiguier C., Structure of recombinants from conjugational crosses between *Escherichia coli* donor and mismatch-repair deficient *Salmonella-typhimurium* recipients. *Genetics*, **136**(1), 17 (1994).

[94] McCulloch S. D., Gu L., and Li G. M., Bi-directional Processing of DNA loops by Mismatch Repair-dependant and -independant Pathway in Human Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**(6), 3391–3896 (2003).

[95] Mendillo M. L., Mazur D. J., and D. K. R., Analysis of the interaction between the *Saccharomyces cervisiae* MSH2-MSH6 and MLH1-PMS1 complexes with DNA using a reversible DNA end-blocking system. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**(23), 22245–22257 (2005).

[96] Modrich P., DNA Mismatch Correction. *Annual Review of Biochemistry*, **56**, 435–466 (1987).

[97] Modrich P. and Lahue R., Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annual Review of Biochemistry*, **65**, 101–133 (1996).

[98] Nag N., Krishnamoorthy G., and Rao B. J., A single mismatch in the DNA induces enhanced aggregation of MutS. *Febs Journal*, **272**(24), 6228–6243 (2005).

[99] Natrajan G., Lamers M. H., Enzlin J. H., Winterwerp H. H. K., Perrakis A., and Sixma T. K., Structures of *Escherichia coli* DNA mismatch repair enzyme MutS in complex with different mismatches : a common recognition mode for diverse substrates. *Nucleic Acids Research*, **31**(16), 4814–4821 (2003).

[100] Neuman K. C. and Block S. M., Optical trapping. *Review of Scientific Instruments*, **75**(9), 2787–2809 (2004).

[101] Obmolova G., Ban C., Hsieh P., and Yang W., Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature*, **407**(6805), 703–710 (2000).

[102] Parker B. O. and Marinus M. G., Repair of DNA Heteroduplexes Containing Small Heterologous Sequences in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**(5), 1730–1734 (1992).

[103] Patel D. J., Shapiro L., Kozlowski S. A., Gaffney B. L., and A. J. R., Structural Studies Of The O^6Meg.C Interaction In The D(C-G-C-G-A-A-T-T-C-O^6Meg-C-G) Duplex. *Biochemistry*, **25**(5), 1027–1036 (1986).

[104] Patel D. J., Shapiro L., Kozlowski S. A., Gaffney B. L., and A. J. R., Structural Studies Of The O^6Meg.T Interaction In The D(C-G-T-G-A-A-T-T-C-O^6Meg-C-G) Duplex. *Biochemistry*, **25**(5), 1036–1042 (1986).

[105] Petit M. A., Dimpfl J., Radman M., and Echols H., Control of Large Chromosomal Duplications in *Escherichia coli* by the Mismatch Repair System. *Genetics*, **129**(2), 327–332 (1991).

[106] Pukkila P. J., Peterson J., Herman G., Modrich P., and Meselson M., Effects of High Levels of DNA Adenine Methylation on methyl-directed mismatch repair in *Escherichia coli*. *Genetics*, **104**, 571–582 (1983).

[107] Rasmussen L. J. and Samson L., The *Escherichia coli* MutS DNA mismatch binding protein specifically binds O^6-methylguanine DNA lesions. *Carcinogenesis*, **17**(9), 2085–2088 (1996).

[108] Rayssiguier C., Thaler D. S., and Radman M., The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature*, **342**, 396 (1989).

[109] Schofield M. J. and Hsieh P., DNA mismatch repair : Molecular mechanisms and biological function. *Annual Review of Microbiology*, **57**, 579–608 (2003).

[110] Schofield M. J., Nayak S., Scott T. H., Du C. W., and Hsieh P., Interaction of *Escherichia coli* MutS and MutL at a DNA mismatch. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(30), 28291–28299 (2001).

[111] Selmane T., Schofield M. J., Nayak S., Du C. W., and Hsieh P., Formation of a DNA mismatch repair complex mediated by ATP. *Journal of Molecular Biology*, **334**(5), 949–965 (2003).

[112] Siggia E., Smith S., Bustanmente C., and Marko J., Entropic elasticity of λ-phage DNA. *Science*, **265**, 1594–1600 (1994).

[113] Smith S., Bhalotra S., Brody A., Brown B., Boyda E., and Prentiss M., Inexpensive optical tweezers for undergraduate laboratories. *American Journal of Physics*, **67**(1), 26–35 (1999).

[114] Spampinato C. and Modrich P., The MutL ATPase is required for mismatch repair. *Journal of Biological Chemistry*, **275**(13), 9863–9869 (2000).

[115] Stanislawska-Sachadyn A. and Sachadyn P., MutS as a tool for mutation detection. *Acta Biochimica Polonica*, **52**(3), 575–583 (2005).

[116] Strick T. R., Allemand J. F., Bensimon D., Bensimon A., and Croquette V., The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science*, **271**(5257), 1835–1837 (1996).

[117] Studamire B., Quach T., and Alani E., *Saccharomyces cerevisiae* Msh2p and Msh6p ATPase Activities Are Both Required during Mismatch Repair. *Molecular And Cellular Biology*, **18**(12), 7590–7601 (1998).

[118] Su S. S., Lahue R. S., Au K. G., and Modrich P., Mispair Specificity of Methyl-Directed DNA Mismatch Correction Invitro. *Journal of Biological Chemistry*, **263**(14), 6829–6835 (1988).

[119] Su S.-S. and Modrich P., *Escherichia coli* mutS-encoded protein binds to mismatched DNA base pairs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **83**, 5057–5061 (1986).

[120] Svoboda K. and Block S., Biological applications of optical forces. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **23**, 247–285 (1994).

[121] Takamatsu S., Kato R., and Kuramitsu S., Mismatch DNA recognition protein from an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus* HB8. *Nucleic Acids Research*, **24**(4), 640–647 (1996).

[122] Theveny B., Coulaud D., Le Bret M., Revet B., In Olson W. K., Sarma M. H., Sarma R. H., and Sundaralinjam M. S. *Structure and Expression, vol. 3 : DNA Bending and Curvature*. Adenine Press (1988).

[123] Thomen P., Transcription par une ARN Polymérase : mesures de forces à l'échelle de la molécule unique. *Thèse de l'Université Paris 6*, (2002).

[124] Timsit Y., Convergent evolution of MutS and topoisomerase II for clamping DNA crossovers and stacked Holliday junctions. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, **19**(2), 215–218 (2001).

[125] Vladescu I. D., McCauley M. J., Rouzina I., and Williams M. C., Mapping the Phase Diagram of Single DNA Molecule Force-Induced Melting in the Presence of Ethidium. *Physical Review Letters*, **95**, 158102 (2005).

[126] Wagner R. and Meselson M., Repair Tracts in Mismatched DNA Heteroduplexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **73**(11), 4135–4139 (1976).

[127] Wang H., Yang Y., Schofield M. J., Du C. W., Fridman Y., Lee S. D., Larson E. D., Drummond J. T., Alani E., Hsieh P., and Erie D. A., DNA bending and unbending by MutS govern mismatch recognition and specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**(25), 14822–14827 (2003).

[128] Wang J. C., Degree of unwinding of DNA Helix by Ethidium .1. Titration of twisted PM2 DNA-molecules in alkaline Cesium-Chloride density gradient. *Journal of Molecular Biology*, **89**(4), 783–801 (1974).

[129] Welsh K. M., Lu A. L., Clark S., and Modrich P., Isolation and Characterization of the *Escherichia coli* MutH Gene-Product. *Journal of Biological Chemistry*, **262**(32), 15624–15629 (1987).

[130] Whitehouse A., Deeble J., Parmar R., Taylor G. R., Markham A. F., and Meredith D. M., Analysis of the Mismatch and Insertion/Deletion Binding Properties of *Thermus thermophilus*, HB8, MutS. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, **233**, 834–837 (1997).

[131] Wildenberg J. and Meselson M., Mismatch Repair in Heteroduplex DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **72**(6), 2202–2206 (1975).

[132] Worth L., Bader T., Yang J., and Clark S., Role of MutS ATPase activity in MutS,L-dependent block of in vitro strand transfer. *Journal of Biological Chemistry*, **273**(36), 23176–23182 (1998).

[133] Worth L., Clark S., Radman M., and Modrich P., Mismatch Repair Proteins MutS and MutL Inhibit RecA-Catalyzed Strand Transfer between Diverged DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**(8), 3238–3241 (1994).

[134] Wu S., Culligan K., Lamers M., and Hays J., Dissimilar mispair-recognition spectra of *Arabidopsis* DNA-mismatch-repair proteins MSH2-MSH6 (MutSα) and MSH2-MSH7 (MutSγ). *Nucleic Acids Research*, **31**, 6027–6034 (2003).

[135] Wu T. H. and Marinus M. G., Dominant-Negative Mutator Mutation in the MutS Gene of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **176**(17), 5393–5400 (1994).

[136] Yamaguchi M., Dao V., and Modrich P., MutS and MutL activate DNA helicase II in a mismatch-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*, **273**(15), 9197–9201 (1998).

[137] Yang W., Junop M. S., Ban C., Obmolova G., and Hsieh P., DNA mismatch repair : From structure to mechanism. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **65**, 225–232 (2000).

[138] Yang Y., Sass L. E., Du C. W., Hsieh P., and Erie D. A., Determination of protein-DNA binding constants and specificities from statistical analyses of single molecules : MutS-DNA interactions. *Nucleic Acids Research*, **33**(13), 4322–4334 (2005).

Résumé

Par micromanipulation et mesure de force sur molécule unique, avec un piège magnétique, ce travail a porté en partie sur l'étude du système de réparation « à longue distance » de l'ADN. Cette réparation fait intervenir pour son initiation les protéines MutS, MutL, et MutH et utilise un mécanisme non identifié précisément, qui lui permet d'agir à distance, entre un site de mésappariement de l'ADN (dû par exemple à une erreur de réplication), et un site proximal distant (hémi-méthylation de séquence GATC), ce qui permet de diriger la réparation sur le brin néosynthétisé. Certains modèles de l'action de la protéine MutS font intervenir une boucle dans l'ADN. Nous avons cherché à mettre en évidence une telle action sur un ADN double brin, contenant (ou ne contenant pas) un mésappariement. Nous n'avons pas mis en évidence de formation de boucle par MutS, qui soit spécifiquement liée à la présence d'un mésappariement. Ce résultat négatif semble donc exclure ce modèle de boucle spécifique. Dans une deuxième partie, nous avons effectué des expériences de micromanipulation sur une jonction de Holliday (ADN en forme de croix, intermédiaire de recombinaison). Nous avons montré directement qu'il est possible d'extruder une jonction de Holliday, en sous-enroulant mécaniquement une molécule d'ADN comportant une séquence palindromique, et avons aussi déduit de ces expériences une mesure du pas de l'hélice de l'ADN. Dans une dernière partie, nous avons étudié l'influence du bromure d'éthidium sur l'ADN. Nous avons montré que la présence de cet agent intercalant peut induire une attraction non-spécifique, intra- ou inter- simple brins d'ADN.

Abstract

Using single molecule micromanipulation and force measurement on DNA with a magnetic tweezer setup, this work has been devoted in part to a study of the " long patch " repair system of DNA. This repair involves the MutS, MutH and MutL proteins, and uses an as yet unidentified mechanism in order to act at a distance, between a site of mismatch (due for example to a replication error), and a proximal GATC hemi-methylation site, so that the repair is directed toward the newly synthesized strand. Some models of this action at a distance, involve the presence of a DNA loop, induced by the action of MutS on a mismatch. We have tried to explore this possibility, by studying the mechanical behavior of a long double stranded DNA, containing (or not containing) a mismatch. We have not detected any specific loop formation in DNA, i.e. only induced when a mismatch is present. This negative result seems to exclude specific loop formation induced by MutS. In a second part, we have studied the mechanical behavior of a Holliday junction (a cross-shaped DNA, involved as an intermediate during recombination). We have shown directly that it is possible to extrude a Holliday junction, by mechanically undercoiling a palindromic DNA. We have deduced the pitch of the DNA double helix from the behavior of the Holliday junction. In a last part, we have studied the influence of Ethidium Bromide, on DNA. We have shown that this intercalating agent is able to induce a non-specific attraction either intra-strand or inter-strand, in single-stranded DNA.