



HAL
open science

La recombinaison homologue sur molécule unique d'ADN: mesures de torsion et de couple.

Aurélie Dupont

► **To cite this version:**

Aurélie Dupont. La recombinaison homologue sur molécule unique d'ADN: mesures de torsion et de couple.. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2008. Français. NNT : . tel-00346315

HAL Id: tel-00346315

<https://theses.hal.science/tel-00346315>

Submitted on 11 Dec 2008

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.

INSTITUT CURIE
LABORATOIRE PHYSICO-CHIMIE CURIE

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PARIS VII-DIDEROT

École doctorale : Constituants élémentaires -systèmes complexes

spécialité : Interfaces Physique-Biologie

présentée par :

Aurélie DUPONT

Sujet de la thèse :

**La recombinaison homologue sur molécule unique
d'ADN : mesures de torsion et de couple.**

Thèse dirigée par Jean-Louis VIOVY

Soutenue le 10 novembre 2008 devant le jury composé de :

M. Jacques PROST	Président du jury
M. Loïc AUVRAY	Rapporteur
M. Daniel RIVELINE	Rapporteur
Mme Sylvie HENON	Examineur
M. François HESLOT	Examineur
M. Masayuki TAKAHASHI	Examineur
M. Jean-Louis VIOVY	Directeur de thèse
M. Giovanni CAPPELLO	Co-directeur de thèse
M. Rob PHILLIPS	Membre invité

Remerciements

Voici certainement les quelques pages du manuscrit de thèse les plus difficiles à écrire : les remerciements. Car après ces trois années et quelques de thèse qui se sont merveilleusement bien passées, j'ai évidemment énormément de gens à remercier, la difficulté étant d'en oublier le moins possible et de trouver les mots justes pour rendre compte du ou des services rendus.

Je commencerai par remercier Jean-François Joanny de m'avoir accueillie au sein du laboratoire Physico-Chimie Curie. Après ces quelques années passées ici, j'ai vraiment l'impression d'avoir bénéficié d'un environnement privilégié pour effectuer une thèse. L'appartenance à l'Institut Curie y est certainement pour quelque chose dans l'aspect matériel, mais il y a aussi ici une formidable ambiance qui nous permet d'échanger avec tout le monde (thésards, post-docs et permanents) et de ne pas rester bloqué tout seul avec ses problèmes expérimentaux ou métaphysiques. Je tiens donc à remercier tous ceux avec qui j'ai pu discuter à un moment ou à un autre, certainement à la cafétéria ou à un pot.

Je remercie Jacques Prost d'avoir accepté de présider mon jury et je m'entraîne activement pour la partie de ping-pong promise. Je remercie Loïc Auvray et Daniel Riveline d'avoir accepté la lourde tâche de rapporteur. Daniel a également été mon tuteur de thèse, et malgré la distance (New York - Paris) nous avons pu avoir des discussions scientifiques très intéressantes, je le remercie de l'intérêt qu'il a porté à mon travail. Je remercie Sylvie Hénon d'avoir accepté de représenter l'université au détriment d'un week-end familial. Je remercie également François Heslot, le spécialiste molécule unique du jury. Merci à Rob Philips d'avoir quitté les vagues basques le temps d'une soutenance. Un remerciement particulier à Masayuki Takahashi, notre collaborateur biologique, avec qui il est toujours très agréable de discuter. De manière générale, je remercie le jury pour leurs questions toutes pertinentes, avec une mention spéciale pour Vincent Croquette à qui aucun détail de pinces magnétiques n'échappe. Toutes ces questions nous permettront, j'espère, d'avancer et d'améliorer encore cette expérience et son interprétation.

Tout a commencé par une histoire de kinésine avec laquelle Giovanni m'a convaincue de venir effectuer mon stage de DEA au laboratoire avec lui. Travailler avec Giovanni évite toute forme d'ennui ou de monotonie, j'ai de plus beaucoup appris scientifiquement grâce à lui, et c'est pourquoi je lui adresse un grand merci. Ce travail a été dirigé, à l'échelon supérieur, par Jean-Louis avec qui il a été également, humainement et scientifiquement, très agréable de travailler.

Je souhaiterais maintenant remercier particulièrement les personnes avec qui j'ai travaillé : Clémentine Symonds pour mes premiers pas au labo en DEA, Pierre

Desbiolles avec qui j'ai collaboré au début de ma thèse. Je remercie Hideyuki d'avoir tenu bon et monté la manip qu'il imaginait ; je remercie Paolo pour toute son aide de geek en C++ et ses leçons d'italien ; j'ai également apprécié ma collaboration, même si ça été bref, avec Manu et Laurent et les remercie tous les deux pour leur aide concernant la microfabrication ; je n'oublie pas Sabri Karra, stagiaire de M1, qui m'a bien aidée. Et comme cette thèse a été essentiellement expérimentale, tout aurait été bien plus compliqué sans l'aide de l'atelier en particulier Benoît Lemaire et Michel Petit, et de Jean-Hugues Codarbox pour l'électronique.

Passons maintenant à tous ceux qui ont rendu ces années très agréables et m'ont soutenue par tous les temps. Je commence par mon ex-co-bureau, Pipouze, avec qui j'ai été très proche (1 mètre environ) pendant trois ans, toujours de bonne humeur, c'était un plaisir. Ensuite bien sûr viennent les Viovettes : Anne, ma jumelle d'anniversaire, Virginie, le pep's incarné, Sandrine, juste en face, Laure, à dix heures et Raf', la survivante des temps passés. Dans l'équipe Viovy, on a aussi toute la mafia Italienne : Giulia (merci pour tout!), Stefano, Francesca, Paolo et dernièrement Simone. Je n'oublie pas tous les autres : Pierre et Ludovic, la dream team des pinces magnétiques ; Christophe, notre gastronome ; Guillaume C., Anaïs, Reza, Sanae, Youba (nouveau co-bureau), F.-D. et bien sûr les anciens : Max, Bertrand, Sarah, Yuliya, Debjani et Lucie.

Tout ce monde-là ne représente que le rez-de-chaussée du bâtiment mais j'ai également passé de très bons moments avec les gens des étages supérieurs. Je remercie donc chaleureusement tout le team bataille corse : maître-PY et ses disciples, Jonathan et Guillaume. Je dois par la même occasion remercier, ou plutôt m'excuser auprès de tous ceux qui ont subi ces parties de batailles corses parfois très bruyantes.

Cette thèse n'aurait pas non plus pu être menée à bien sans toutes ces pauses goûter à la cafet' partagées dans la joie et la bonne humeur avec (suivant les jours) Laetitia, Simon, Thomas R., Andrew et précédemment Hadia, Marie, Léa, Nico, Boris ou Martial. Mais avant le goûter, et à raison d'une fois par semaine, il y avait aussi le déjeuner, au pouvoir hautement anti-stressant, avec le club de la bouffe de l'angoisse : Alix, Guillaume F., Noëlle et Cécile (et Lisette si elle avait fait sa thèse à Paris) ; merci pour votre soutien partial et sans faille. Tout ceci a été rendu possible grâce aux nombreux restaurants et boulangeries du quartier ; pour cela, c'est une chance de faire sa thèse dans le Vème !

Finalement il a bien fallu éliminer toutes ces calories absorbées dans la journée et je remercie donc mes collègues volleyeuses et rugbeuses d'avoir sué avec moi. Je n'oublie pas non plus la promo IPB04, et notamment : Marion, Myriam, Elise, Fabien, Adrien et Benoît.

Pour finir, il est évident que je n'en serais pas là aujourd'hui sans le soutien constant de ma famille dont je remercie toutes les générations sans exception avec une mention spéciale à mes parents et à mon frère. Je garde le meilleur pour la fin, merci Thomas, pour tout.

Table des matières

Introduction	7
I État des connaissances	11
A La recombinaison homologue	11
1 - Présentation	11
2 - La famille des recombinases	11
3 - Mécanisme moléculaire	13
3.1 Préparation du site de la cassure	15
3.2 Le filament nucléoprotéique	15
3.3 Conformation de l'ADN dans le filament nucléoprotéique	18
3.4 Recherche d'homologie	19
3.5 Échange de brin	21
4 - Fonction ATPase	22
5 - Limite des connaissances	23
B Études en molécule unique	25
1 - Un moteur moléculaire : la kinésine	25
1.1 Présentation	26
1.2 Expériences et résultats en molécule unique.	27
2 - Physique de l'ADN en molécule unique	30
2.1 Introduction	30
2.2 Modélisation	31
2.3 Au-delà du régime entropique	34
3 - Revue des techniques de molécule unique utilisées sur le système RecA/Rad51.	34
3.1 Appliquer mesurer une force avec des pinces optiques	34
3.2 Force et torsion avec des pinces magnétiques	36
3.3 Expériences avec RecA/Rad51 en pinces magnétiques	37
3.4 Techniques de visualisation/microscopie	39
3.5 Limites	41
3.6 Mesurer une torsion et un couple	43

Table des matières

II	Étude de la recherche d'homologie	45
A	Étirement de l'ADN	45
	1 - Préparation de l'ADN	46
	2 - Préparation des surfaces streptavidine	48
	3 - Observations	49
B	Préparation des filaments nucléoprotéiques	50
	1 - Préparation de l'ADN simple-brin	50
	2 - Formation du filament nucléoprotéique	50
	3 - Marquage des filaments	51
	3.1 Marquage par bille	51
	3.2 Marquage par nanocristaux	51
C	Observations	53
	1 - Mouvement des filaments	53
	2 - Observations <i>a posteriori</i>	54
D	Interprétation	56
E	Éloigner l'ADN de la surface	57
	1 - Principe	57
	2 - Mise en oeuvre du réseau de billes	58
	2.1 Motif modèle	58
	2.2 Résultats	59
	3 - Essai d'étirement de l'ADN	60
F	Conclusions	60
III	Les pinces magnétiques sensibles au couple	63
A	Le dispositif expérimental	63
	1 - Principe	63
	2 - Description de l'expérience	65
	2.1 Construction d'ADN	65
	2.2 Chambre d'observation	65
	2.3 Observer la rotation	65
	2.4 Le montage expérimental	66
	2.5 Analyse du film	66
	2.6 Mesure de la position angulaire en fonction du temps	68
	2.7 Avantages	69
B	Caractérisation du montage	70
	1 - Mesure du champ magnétique créé par la pointe	70
	2 - Caractérisation à l'aide d'une bille magnétique	71
	2.1 Mesure de la force magnétique	71
	2.2 Observation des fluctuations angulaires	72
	2.3 Mesure du couple	73
	2.4 Caractérisation du champ magnétique horizontal	74

2.5	Mesure du coefficient de friction visqueuse	75
3 -	Difficultés rencontrées, améliorations en vue	76
3.1	Mouvement de rotation non simple	76
3.2	Couple et force	77
3.3	Améliorations effectuées	78
3.4	Développements en cours	81
IV	Résultats expérimentaux	83
A	Polymérisation	83
1 -	Réalisation de l'expérience	83
1.1	Alignement de la pointe magnétique	83
1.2	Recherche de molécule d'ADN intacte	84
2 -	Initiation à haute concentration	86
2.1	Preuve de principe	86
3 -	Etude à haute résolution de l'activité de hRAD51	89
3.1	Observation de pauses régulières	89
3.2	Analyse globale : pairwise et transformée de Fourier	90
3.3	Caractérisation des pas	92
3.4	Interprétation	93
3.5	Analyse des fluctuations - stochasticité	94
3.6	Stochasticité de la polymérisation	96
3.7	Conclusions	97
B	Dépolymérisation	97
1 -	Caractérisation des pas	99
1.1	Taille des pas	99
1.2	Proportion de pas multiples	99
2 -	Stochasticité de la dépolymérisation	99
3 -	Conclusions	100
C	Mesures de couple	100
1 -	Mesure du couple visqueux à vitesse maximale	101
1.1	Vitesse maximale de rotation	101
1.2	Calcul du couple visqueux	101
1.3	Discussion	102
1.4	Difficultés	102
2 -	Mesure du couple d'arrêt	103
2.1	Principe	103
2.2	Résultats	104
2.3	Observation détaillée des paliers	105
2.4	Conclusions	106
3 -	Modélisation	107
3.1	Description du modèle	107
3.2	Intégration numérique et résultat	110

Table des matières

3.3	Ajout du couple critique de formation de plectonèmes	112
3.4	Résultat avec plectonèmes	112
4 -	Potentiel chimique au couple d'arrêt	113
D	Expériences tentées	114
1 -	Polymérisation avec des analogues non-hydrolysables de l'ATP.	114
1.1	En présence d'ATPgamma-S	115
1.2	En présence d'AMP-PNP	115
1.3	Perspectives	116
2 -	Échange de brins	116
2.1	Déroulement de l'expérience	117
2.2	Résultat-Difficultés	118
2.3	Perspectives	119
3 -	Polymérisation de RecA	119
E	Conclusions	120
Conclusion générale et perspectives		123
Annexes		125
A Recettes des solutions tampons		125
B Protocoles de préparation de l'ADN		127
A	Protocole pour l'ADN marqué doublement biotine	127
1 -	Protocole pour les PCR	127
2 -	Séquence des amorces et programmes des PCR	128
3 -	Digestion	130
4 -	Ligation	130
B	Préparation de l'ADN biotine-digoxygénine	131
C	Construction de 3,5kb	131
1 -	Préparation par PCR	132
2 -	Séquences des amorces et programme de la PCR	132
D	Préparation des filaments nucléoprotéiques	133
1 -	Préparation de l'ADN simple-brin	133
2 -	Polymérisation de RecA	133
3 -	Tampons	134
C Protocoles de préparation des billes		135
A	Préparation des billes anti-digoxygénine	135
1 -	Activation des billes magnétiques	135
2 -	Couplage à l'anti-digoxygénine	135
3 -	Lavage-Blocage	135
4 -	Tampons	136

B	Protocole de conjugaison bille streptavidine-ADN biotine	136
D	Protocoles de préparation des surfaces	137
A	Préparation des lamelles streptavidine et accrochage de l'ADN biotinilé	137
1 -	Silanisation	137
2 -	Préparation de la caséine biotinilée	137
3 -	Accrochage de l'ADN biotinilé	138
4 -	Tampons	138
B	Préparation des lamelles antidigoxigénine	138
1 -	Silanisation	138
2 -	Préparation de la chambre et dépôt d'antidigoxigénine	138
E	Programme d'intégration numérique	141
	Bibliographie	146

Introduction

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés aux détails moléculaires de la recombinaison homologue dans le but de comprendre le mécanisme physico-chimique responsable de sa grande efficacité. Nous abordons cette question en termes de dynamique et de thermodynamique.

La recombinaison homologue est un processus biologique crucial puisqu'il est le garant de l'intégrité du génome. En effet, la recombinaison homologue est le principal mécanisme de réparation de la plus sérieuse lésion de l'ADN : la cassure double-brin. Ce type de cassure se produit tous les jours dans nos cellules, en particulier lors de la réplication de l'ADN ou sous l'effet de rayonnements ionisants. En allant chercher la copie intacte de la séquence dans le génome, elle permet de réparer efficacement et fidèlement cette lésion double-brin, et ce même si une partie de la séquence a été perdue ! Par ailleurs, il est important de réparer l'ADN sans erreur afin de permettre à la cellule et à l'organisme de survivre. En effet, une cellule qui n'est pas capable de réparer efficacement son ADN peut soit déclencher l'apoptose (mort cellulaire), soit éventuellement dégénérer en tumeur.

Les protéines qui tiennent le rôle principal dans ce processus de recombinaison sont appelées « recombinases ». Elles sont présentes dans toutes les espèces, il s'agit de la protéine RecA chez la bactérie *Escherichia Coli* et de Rad51 chez les eucaryotes. A cause de son rôle crucial, la recombinaison homologue a été largement étudiée par des expériences de biochimie et de biologie moléculaire essentiellement. Ces résultats ont permis d'identifier et de décrire les trois étapes principales de son mécanisme :

1. La recombinase polymérise sur l'ADN lésé en formant le filament nucléoprotéique ou filament présynaptique
2. Ce filament, constitué de l'ADN à réparer et de la protéine, est alors capable de chercher et de s'aligner avec la séquence homologue, c'est-à-dire identique, présente dans la cellule.
3. Finalement, les brins d'ADN homologues sont échangés résultant dans la formation de deux molécules d'ADN hybrides comprenant chacune un brin intact et un brin à réparer.

Introduction

Là se finit le travail de la recombinaise, puisque la cellule fait alors appel à la machinerie de synthèse de l'ADN (ADN polymérase en particulier), puis aux protéines capables de résoudre le noeud d'ADN résultant (topoisomérases).

La complexité de cette réaction enzymatique vient tout d'abord du nombre de partenaires mis en jeu. Il faut compter au minimum : le fragment d'ADN simple-brin, l'ADN double-brin homologue, mais aussi l'ensemble des recombinaises qui doivent polymériser et l'ATP, qui fournit l'énergie nécessaire à la réaction. De plus, la réaction dépend évidemment de la séquence des fragments d'ADN. Et finalement, la topologie du système ne peut pas être négligée. En effet, l'ADN double-brin et le filament nucléoprotéique ont une structure hélicoïdale et doivent s'entrelacer pendant la recherche d'homologie et l'échange de brin. Ce processus est donc des plus complexes.

Si les techniques classiques d'enzymologie nous permettent d'en comprendre le cadre général, elles touchent à leurs limites quant à la compréhension de ce mécanisme dans les moindres détails. A partir de clichés de microscopie électronique, on sait que la recombinaise forme sur l'ADN une hélice droite, de pas environ 10nm. Si cette technique ne permet pas de visualiser la conformation de l'ADN à l'intérieur du filament, elle nous montre par voie indirecte que l'ADN dans le filament nucléoprotéique est partiellement déroulé et étiré par rapport à sa structure cristallographique.

En résumé, la recombinaise effectue plusieurs tâches : elle déroule et étire l'ADN pour permettre l'appariement des trois brins, elle facilite la recherche d'homologie et induit l'échange de brins de manière directionnelle et irréversible. De plus, on sait que l'ensemble des trois étapes évoquées plus haut peut être réalisé avec seulement l'énergie d'une molécule d'ATP par protéine. Un certain nombre de questions se posent : A quel moment est utilisée cette énergie ? Quels sont les mécanismes physico-chimiques qui permettent à ce processus d'être si efficace ? D'autre part, ces protéines effectuent un travail mécanique en déformant l'ADN, est-il possible de les décrire en termes de moteurs moléculaires et d'en déterminer le rendement à chaque étape ?

Notre objectif est de répondre à ces questions grâce à la manipulation directe d'une molécule unique d'ADN lors de l'activité des recombinaises. En mesurant les forces et les couples exercés sur l'ADN, ainsi que son élongation et son état de torsion, il semble possible d'établir le panorama énergétique de la recombinaison homologue.

Dans cette thèse, on reviendra tout d'abord sur l'état des connaissances en ce qui concerne la recombinaison homologue (**chapitre 1.A**). Puis on introduira le concept de moteur moléculaire, on présentera des éléments de la physique d'une molécule d'ADN et on passera en revue les techniques de molécule unique utilisées sur le système recA/Rad51 (**chapitre 1.B**). Ensuite, on décrira ce qui a constitué la première moitié de ma thèse, c'est-à-dire les expériences de peignage d'ADN où

l'on a essayé de visualiser la recherche d'homologie (**chapitre 2**). En parallèle, nous avons développé un nouveau dispositif expérimental de pinces magnétiques sensibles au couple permettant de manipuler une molécule unique d'ADN et de mesurer son état de torsion. Dans le **chapitre 3**, on décrira ce nouveau dispositif expérimental ainsi que les expériences ayant permis de le caractériser. Le **chapitre 4** expose les principaux résultats obtenus à l'aide de ce nouveau montage dans le cadre de la recombinaison homologue. Nous en proposons une modélisation et une interprétation, qui est discutée dans le contexte de l'état actuel des connaissances sur le sujet.

Chapitre I

État des connaissances

A La recombinaison homologue

Dans cette partie je décrirai le processus de recombinaison homologue à l'aide des expériences les plus significatives ayant aidé à la comprendre. Je présenterai tout d'abord la protéine recombinase, qui tient le rôle principal dans ce processus, puis je reviendrai sur chaque étape du mécanisme moléculaire de la réparation. Nous verrons ainsi les principales questions qui restent ouvertes.

1 Présentation

La recombinaison homologue est un processus biologique essentiel qui implique l'appariement et l'échange de matériel génétique entre deux molécules d'ADN homologues. Son importance est fondamentale pour la préservation de l'intégrité du génome, pour la production de diversité génétique et pour la ségrégation correcte des chromosomes. C'est le mécanisme principal de réparation des cassures double-brin de l'ADN. Celles-ci peuvent se produire spontanément dans la cellule : lors de la réplication d'une molécule d'ADN endommagée ou comme chez *Escherichia Coli* lors du processus de conjugaison qui permet à deux bactéries d'échanger du matériel génétique. Elles peuvent également être induites sous l'action de facteurs environnementaux tels que des rayonnements ionisants ou des agents chimiques mutagènes. Une cellule qui n'est pas capable de réparer efficacement et sans erreur son ADN peut donc subir quotidiennement des dommages irréversibles. Chez l'homme par exemple, ces dommages peuvent être à l'origine de cellules anormales pouvant dégénérer en tumeur.

2 La famille des recombinases

La première protéine qui a été découverte est RecA de l'organisme bactérien *Escherichia Coli* dans les années 1960 [2]. Elle a tout d'abord été remarquée pour les

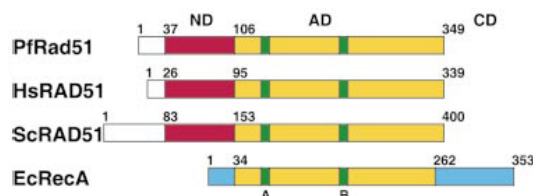


FIGURE I.1 – **Domaines homologues et modèle d'évolution pour la famille des recombinases.** Organisation des séquences pour quatre protéines de la famille des recombinases issues de *P. furiosus* (archéobactérie), *Homo sapiens*, *Saccharomyces cerevisiae* (eucaryote), *Escherichia Coli* (eubactérie). Les régions homologues pour le domaine N-terminal des Rad51 (ND) sont en rouge. Les régions homologues pour le domaine ATPase de RecA et des Rad51 (AD) sont en jaunes. Les motifs Walker A et B sont en vert et les régions non-homologues sont représentées en blanc ou bleu. Schéma tiré de [1].

effets importants de mutations du gène *recA* sur la recombinaison liée à la conjugaison. Il a ensuite été montré qu'elle joue un rôle essentiel dans la recombinaison homologue. La protéine eucaryote, Rad51, a été découverte par analyses génétiques de mutants de *Saccharomyces cerevisiae* déficients en recombinaison homologue et en réparation des cassures double-brin de l'ADN [3]. Enfin, plus récemment des protéines homologues aux deux premières ont été identifiées chez de nombreuses archéobactéries.

La présence de recombinase chez des bactériophages (UvsX), des eubactéries (RecA), des archéobactéries (RadA) et des eucaryotes (Rad51) confirme que le mécanisme d'appariement d'ADN homologue et d'échange de brin est conservé chez tous les êtres vivants. En nous focalisant sur quelques protéines modèles, nous allons nous intéresser aux liens d'homologie de cette famille de protéines.

Les protéines recombinases de cette famille RecA/Rad51 sont composées d'environ 350 acides aminés en moyenne. Elles ont donc une taille similaire : le poids moléculaire de RecA est de 37,8 kDa et celui de la Rad51 humaine (notée hRad51) est de 36,9kDa. Elles sont composées de deux domaines : le domaine ATPase et un domaine de liaison à l'ADN. Toutes ces protéines partagent un domaine homologue, dit « RecA », d'environ 200 acides aminés responsable de l'activité ATPase, en jaune sur la figure I.1. Ce domaine n'est pas responsable à lui seul de l'activité de recombinaison. Par ailleurs, on le retrouve chez d'autres protéines telles certaines hélicases et la F1-ATPase. Les protéines eucaryotes et archéobactériennes partagent en outre un domaine de liaison à l'ADN en région N-terminale, en rouge sur la figure I.1. Tandis que le domaine de liaison à l'ADN de RecA est situé en région C-terminale. Ceci indique que ces deux domaines ont des histoires évolutives indépendantes chez RecA et chez Rad51. Il est intéressant de remarquer que toutes ces protéines forment un filament hélicoïdal sur l'ADN, indispensable à leur fonction. Il peut donc s'agir, en ce qui concerne ce domaine de liaison à l'ADN, d'une évolution convergente vers une

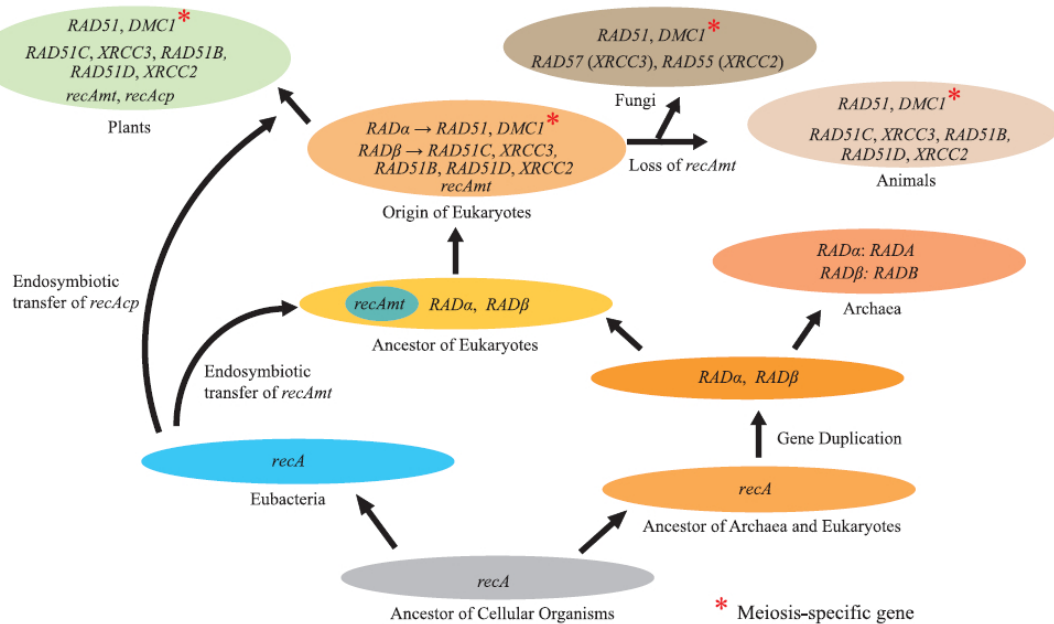


FIGURE I.2 – **Modèle pour l’histoire évolutive de la famille génétique recA/-RAD51.** Modèle proposé par Lin et collaborateurs en 2006 [4].

même structure, le filament nucléoprotéique, et une même fonction, la recombinaison homologue.

On peut voir figure I.2, un modèle d’évolution élaboré à partir d’analyse phylogénétique [4]. D’après le travail de Lin et collaborateurs, on peut diviser la famille recA/RAD51 en trois sous-familles : (i) *RADα*, avec des fonctions très conservées ; (ii) *RADβ*, avec des fonctions relativement divergentes ; et (iii) *recA*, présente chez les eubactéries et les organites des plantes (mitochondrie et chloroplastes). Les sous-familles *RADα* et *RADβ* sont présentes chez des archéobactéries et des eucaryotes, suggérant qu’une duplication a eu lieu avant la bifurcation archéobactéries/eucaryotes. Chez les eucaryotes, les gènes *RADα* et *RADβ* ont connu plusieurs duplications, tandis que chez les archéobactéries ils sont restés des gènes en copie unique. Une hypothèse d’endosymbiose à partir de cyanobactéries et de protéobactéries est proposée pour expliquer la présence de gènes types *recA* chez les eucaryotes, et les plantes en particulier.

3 Mécanisme moléculaire

Nous allons décrire ici le mécanisme moléculaire communément admis pour la recombinaison homologue (figure I.3). Comme évoqué précédemment, celui-ci peut être décomposé en trois étapes pour la recombinaison proprement dite : la formation du filament nucléoprotéique, la recherche d’homologie et l’échange de brins.

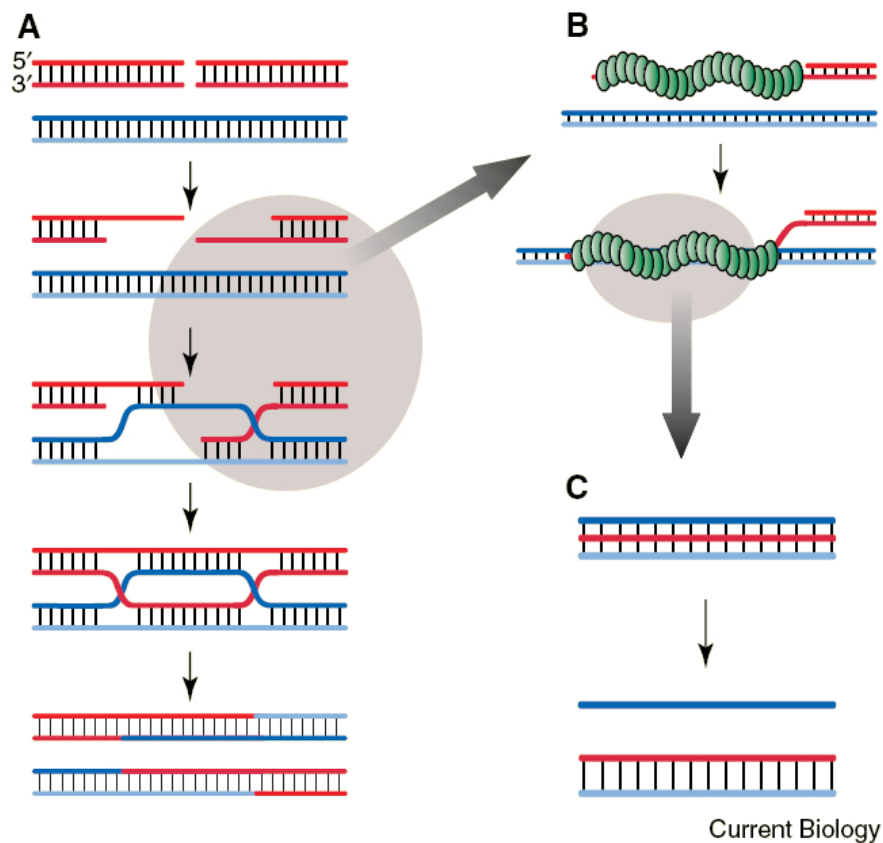


FIGURE I.3 – **Mécanisme de la recombinaison homologue.** **A.** Schéma modélisant la réparation des cassures double-brin de l'ADN par recombinaison homologue, illustrée au niveau de l'ADN. Les molécules duplex d'ADN sont indiquées par des échelles dont les barreaux représentent les paires de base. Des extrémités 3' simple-brin sont générées sur lesquelles les recombinases forment un filament hélicoïdal. L'ellipse grise représente la partie du processus montrée plus en détails en B. **B.** Un filament nucléoprotéique formé sur l'ADN simple-brin peut reconnaître la séquence homologue sur l'ADN double-brin intact résultant en l'appariement de ces deux molécules d'ADN. **C.** L'échange de brin a lieu dans le contexte du filament [5].

S'ajoutent à cela une étape préliminaire de préparation du substrat et une étape finale de résolution de la structure complexe d'ADN obtenue.

3.1 Préparation du site de la cassure

Tout commence donc par une cassure double-brin de la molécule d'ADN qui est sectionnée comme montré figure I.3. Il peut même y avoir perte de matériel génétique si la cassure recouvre plusieurs bases d'ADN. Dans ce cas, on comprend bien qu'il est crucial de recourir à la séquence homologue intacte présente dans la cellule pour réparer sans erreur cette perte d'information. Dans un premier temps le site de la cassure est transformé par une action coordonnée d'hélicases, qui ouvrent la double-hélice, et de nucléases qui détruisent un brin d'ADN, résultant en la formation d'extrémités simple-brin.

Chez *Escherichia Coli*, c'est l'enzyme RecBCD qui effectue cette étape préliminaire. RecBCD est une enzyme composée de nucléases et d'hélicases, qui lie l'extrémité double-brin créée par la cassure. Elle commence par dérouler l'ADN tout en le dégradant. Cette activité se poursuit jusqu'à une séquence spécifique (appelée site χ) qui a pour effet de modifier l'activité de la protéine. Au final, la protéine RecBCD produit des extrémités 3' ¹ simple-brin qui se terminent par cette séquence spécifique. Pendant son travail, RecBCD peut aider RecA à lier l'extrémité simple-brin. Une autre protéine joue un rôle important à ce stade : c'est la « single-strand binding protein » (protéine SSB). Elle protège l'ADN simple-brin (ADNsb) créé de l'action d'autres nucléases et empêche la formation de structures secondaires

Il semble que ce soit le complexe Mre11 qui joue le rôle du complexe RecBCD chez les eucaryotes [6]. Tout comme RecBCD, ce complexe, composé de Mre11, Rad50 et NBS1, a une grande affinité pour les extrémités d'ADN et possède une activité nucléase. Par contre, le recrutement de Rad51 nécessite au moins une protéine supplémentaire : Rad52. D'autres paralogues de Rad51 peuvent également jouer un rôle qui reste pour l'instant mal connu.

3.2 Le filament nucléoprotéique

La première étape à proprement parler de la recombinaison homologue est la formation du filament nucléoprotéique ou filament présynaptique. C'est lui qui sera l'élément actif dans la suite du processus.

La structure, très semblable, des filaments nucléoprotéiques formés par RecA et Rad51 a été observée par microscopie électronique (figures I.4(a) et I.4(b)). Ces expériences ont montré que les monomères s'assemblent en une hélice droite avec environ

1. Un brin d'ADN est une molécule polaire, on note 5' l'extrémité phosphate et 3' l'extrémité OH.

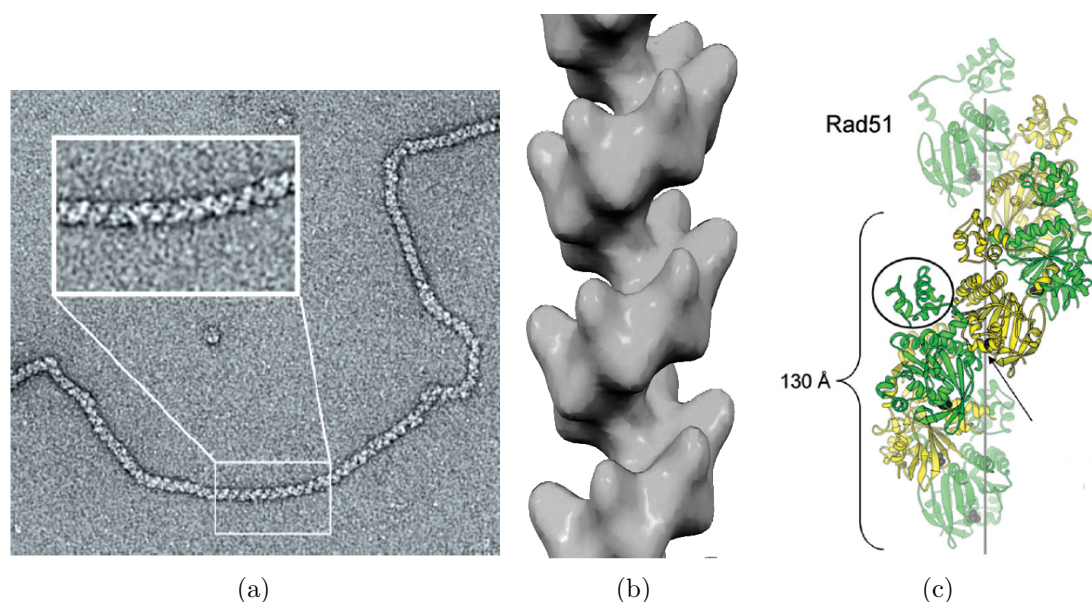


FIGURE I.4 – Filaments de hRAD51 : structure cristallographique et microscopie électronique. (a) Image de microscopie électronique de hRad51 sur ADNdb [10]. (b) Reconstitution de surface à partir de filaments formés par hRAD51 sur de l'ADN simple-brin en présence d' AlF_4^- , adapté de Yu *et al.*, 2001 [11]. Le filament obtenu a un pas hélicoïdal de 99Å et compte 6.39 sous-unités par tour. (c) Structure cristallographique de filaments hRAD51 publiée par Conway *et al.* en 2004 [12]. Le filament a un pas hélical de 130Å et est composé de deux monomères cristallographiquement indépendants (en jaune et en vert) qui alternent pour former un filament de symétrie exactement trois mais approximativement six. Un sulfate (sphères noires) mime la liaison du phosphate dans le site ATPase, enfoui directement à l'interface entre deux monomères (flèche). Un des domaines N-terminaux est encerclé.

six protéines pour un tour d'hélice. Lors de la formation du filament, une molécule d'ATP, ou un analogue, est incorporée par protéine. Le pas de l'hélice dépend du cofacteur utilisé : ATP ou ADP principalement. En présence d'ATP, on obtient un filament étendu dont le pas d'hélice est d'environ 10nm. Par contre, lorsque le filament est formé en présence d'ADP ou de certains analogues de l'ATP, on obtient un filament « écroulé » de pas environ 8nm. D'autre part, on compte environ trois bases d'ADN pour un monomère de RecA. Concernant Rad51, la stœchiométrie n'est pas claire. Différentes valeurs ont été observées allant de 2,5 à 5 nucléotides par protéine suivant les conditions expérimentales [7, 8, 9]. La question reste ouverte, ces différentes valeurs pouvant être vraies et refléter ainsi une certaine souplesse dans le filament formé par Rad51.

Structure Des études de cristallographie ont permis de résoudre la structure de RecA, de ScRad51 (*Saccharomyces cerevisiae* Rad51) et de RadA (protéine des archéobactéries). Ces protéines forment des filaments hélicoïdaux dans le cristal en

A. La recombinaison homologue

	RecA	hRAD51
Poids moléculaire (kDa)	37.8	36.9
Préférence de liaison à l'ADN	ADNsb \gg ADNdb	ADNsb = ADNdb
Stœchiométrie	1 monomère : 3 nts	1 monomère : 3 nts
Echange de brin	2-10pb.s ⁻¹ , >6kb	lent, 1-2kb
Polarité du transfert	5' vers 3'	3' vers 5'
Stimulé par	SSB	RPA, RAD52
Assemblage sur ADNsb		
<i>Conditions :</i>	(-) NTP (+) ATP γ S	(-) NTP (+) ATP γ S
$k_{association}(M^{-1}s^{-1})$	2.10 ² 10 ⁴	9.10 ⁴ 4.10 ⁴
$k_{dissociation}(s^{-1})$	8.10 ⁻³ n.d.	10 ⁻² 7.10 ⁻³
Activité ATPase (k_{cat})		
sur ADNsb	30 min ⁻¹	0.2 min ⁻¹
sur ADNdb	21 min ⁻¹	0.1 min ⁻¹

FIGURE I.5 – **Tableau de comparaison des propriétés de RecA et hRAD51** Adapté de [13] et [14]

l'absence d'ADN. En 2004, Conway et collaborateurs [12] ont obtenu un cristal de filaments de ScRad51 étendu et non pas écroulé comme celui obtenu précédemment pour RecA (voir figure I.4(c)). De plus, leurs résultats montrent une symétrie du filament exactement de trois et non de six, suggérant que les interfaces protéine-protéine diffèrent alternativement. Ils en déduisent que l'unité fonctionnelle de Rad51 serait un dimère. Toutefois, étant donnée la variété de filaments vus dans des études de microscopie électronique, et les variations concernant la stœchiométrie nucléotides/-recombinase, il est clair que ces filaments montrent une flexibilité structurale.

Caractéristiques biochimiques de la polymérisation Même si structurellement les filaments obtenus par polymérisation de RecA et de Rad51 sont très proches, il existe des différences biochimiques lorsqu'on les assemble *in vitro*.

Tout d'abord RecA a une affinité bien supérieure pour l'ADN simple-brin que pour le double-brin, et celle-ci est fortement dépendante de la présence de cofacteurs (ATP ou analogue, voir figure I.5). Le filament peut s'étendre sur plus de 1000 pb (paires de bases) de manière majoritairement unidirectionnelle, de 5' vers 3'. Ces données sont cohérentes avec la fonction connue *in vivo* de RecA. On a vu que le filament nucléoprotéique se forme sur l'ADN simple-brin généré au site de la cassure. De plus la polymérisation est fortement coopérative, favorisant ainsi la couverture complète d'une molécule d'ADN, en cas d'excès d'ADN par rapport à la protéine. Ceci favorise la formation d'un nombre restreint de filaments présynaptiques fonctionnels contre une assemblée de filaments trop courts pour avoir une activité de recombinaison.

En ce qui concerne la protéine eucaryote, les choses sont différentes. Tout d'abord, elle a, *in vitro*, une affinité similaire pour l'ADN simple et double-brin. Cette affinité dépend très peu de la présence de cofacteur (voir figure I.5). Modesti et collaborateurs ont observé des sites multiples d'initiation de polymérisation sur une molécule unique d'ADN [15]. Ce cas de figure est assez rare pour RecA. Il en résulte qu'*in vitro*, les filaments formés par Rad51 sont discontinus et laissent une partie d'ADN nu, alors que RecA forme un filament unique couvrant la totalité de la molécule d'ADN disponible. Nous verrons plus loin dans ce chapitre (section 4) que cela est fortement couplé à l'hydrolyse de l'ATP.

3.3 Conformation de l'ADN dans le filament nucléoprotéique

Dans les études précédemment citées, résolution de structure cristallographique ou reconstruction à partir de clichés de microscopie électronique, on visualise les protéines et non l'ADN (quand il est présent). Il est plus délicat d'obtenir des informations sur la conformation de l'ADN dans le filament nucléoprotéique. On sait tout de même, via des mesures indirectes, que l'ADN doit y être étiré et déroulé.

En mesurant la longueur de filaments en microscopie électronique et en la comparant à la longueur théorique de l'ADN duplex nu, il a été mesuré, pour RecA [16] et pour Rad51 [17], que l'ADN est étiré d'environ 50% supplémentaire par rapport à sa conformation canonique (double-hélice B). L'espacement axial entre paires de bases est d'environ 5,1 Å dans le filament contre 3,4 Å pour l'ADN nu. Ces mesures montrent qu'un tour d'hélice de protéine couvre 18,6 paires de bases d'ADN, mais ne donne aucune information sur l'hélicité de l'ADN.

En 1981, Stasiak et collaborateurs [18] ont utilisé une méthode topologique afin de déterminer la torsion de l'ADN dans le cas de filaments formés par RecA en ATP puis stabilisés en ATP γ S. A partir de clichés de microscopie électronique où des moléculaires circulaires d'ADN sont partiellement couvertes par RecA, on mesure la taille des parties « ADN nu » et « ADN dans le filament ». Les filaments sont formés sur différentes populations de molécules dont chacune a un nombre d'enlacement (« linking number ») moyen différent. Par une extrapolation de la courbe pourcentage de couverture de RecA sur l'ADN en fonction du nombre d'enlacement, ce dernier est déduit pour un ADN couvert à 100%. Le résultat final est que l'ADN suit l'hélice de protéine, il y a donc environ 19 paires de bases par tour d'hélice d'ADN contre 10,5 pour l'ADN nu.

L'intuition nous suggère que l'étirement et le déroulement partiel de la double-hélice d'ADN devrait créer une structure plus ouverte laissant de la place pour un troisième brin, favorisant ainsi la recherche d'homologie. Afin d'aller au-delà de ces expériences statiques, le principal objet de cette thèse est d'obtenir des informations dynamiques et précises, sur la conformation des différents brins d'ADN dans le filament. En particulier, quelle est la torsion induite par une seule protéine lors de

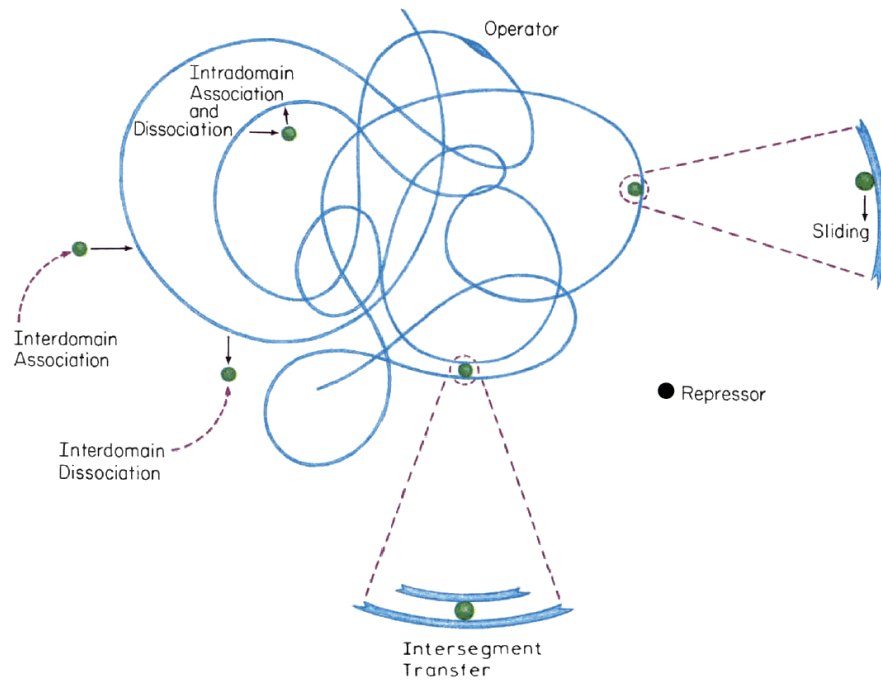


FIGURE I.6 – **Modèles de recherche de site spécifique sur l'ADN** Une protéine cherchant sa cible spécifique sur une molécule d'ADN peut soit « glisser », soit « sauter » à l'intérieur d'un domaine, soit diffuser entre différents domaines soit passer d'un segment à l'autre par contact. Adapté de [19]

la polymérisation ?

3.4 Recherche d'homologie

Une fois le filament nucléoprotéique correctement assemblé, celui-ci est capable de chercher et trouver la séquence homologue dans le génome. Ce peut être la chromatide sœur si la cassure a eu lieu après la réplication de l'ADN, ou le chromosome homologue dans le cas des organismes diploïdes.

Le problème de la recherche d'homologie se rapproche du problème plus général des protéines cherchant une séquence spécifique sur l'ADN, à la différence majeure qu'un filament unique doit trouver la séquence homologue. Dans le cas des protéines, celles-ci sont en général produites en grande quantité et il suffit qu'une seule trouve sa cible. Il a été montré pour plusieurs protéines liant l'ADN que leur taux d'association avec la séquence cible est cent fois plus rapide que celui calculé à partir de l'équation de diffusion 3D modifiée par Smoluchowski [19]. Il faut donc envisager d'autres stratégies de recherche de cible (voir figure I.6). On peut penser à des déplacements en trois dimensions : passage d'un domaine à un autre, saut à l'intérieur d'un domaine. On peut également imaginer la diffusion ou le glissement de la pro-

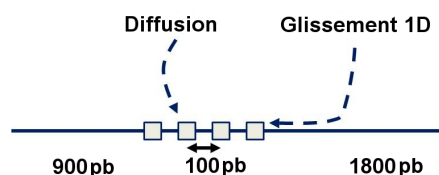


FIGURE I.7 – **Schéma de principe de l'expérience réalisée par Adzuma et collaborateurs.** Sur une molécule d'ADN d'environ 3000pb, quatre séquences identiques, de 40pb, sont régulièrement disposées, séparées entre elles par 100pb.

téine le long de l'ADN (mouvement 1D), ou le passage direct d'un segment d'ADN à un autre par contact. On peut aussi envisager un mélange de ces stratégies. En effet, des modèles plus récents [20] suggèrent un couplage entre une diffusion 3D et un effet « d'antenne » dû à un glissement 1D sur de courtes distances. Expérimentalement, il n'y a encore que peu de résultats sur le sujet.

En ce qui concerne la recherche d'homologie, c'est toujours l'interrogation. En 1998, K.Adzuma [21] exclue le glissement 1D du filament nucléoprotéique sur plus de 100 paires de bases. L'expérience réalisée est la suivante : un ADN contient quatre cibles homologues réparties régulièrement (figure I.7). Si le mécanisme prédominant est le glissement 1D, alors les deux cibles extérieures devraient lier davantage de filaments présynaptiques. Or, rien de tel n'est observé, la conclusion est donc qu'il n'y a pas de glissement du complexe RecA-ADNsb² sur des distances supérieures à l'écart entre les cibles, soit 100pb. Cela étant, l'expérience est réalisée en solution où d'autres mécanismes tels que montrés figure I.6 peuvent exister et dominer.

D'autre part, plusieurs équipes ont montré l'effet paradoxal de l'ajout d'ADN hétérologue mélangé à l'ADN homologue pour la recherche d'homologie. En 1985, Honigberg et collaborateurs [22] montrent qu'en ajoutant un très large excès d'ADN hétérologue, provoquant la formation de coagrégats ADN-filaments, on peut accélérer la recherche d'homologie par deux ordres de grandeurs. Un an plus tard Gonda et Radding [23] montrent que cet effet est également observé si l'ADN et les filaments nucléoprotéiques sont agrégés par d'autres moyens comme l'ajout de polyamines. Le modèle proposé est donc que la recherche d'homologie est accélérée par la condensation de l'ADN et des filaments dans un réseau, ceci est envisageable dans un noyau de cellule eucaryote via d'autres facteurs.

On peut estimer la taille minimale d'une séquence aléatoire pour que celle-ci soit unique dans le génome humain. La probabilité de produire aléatoirement une séquence particulière de N paires de bases est 4^N . Sachant que le génome humain comprend environ 3 milliards de paires de bases, et supposant qu'il est construit aléatoirement, on peut estimer qu'une séquence de N paires de bases est unique si $4^N = 3.10^9$. On obtient une séquence de 16 nucléotides.

2. ADNsb : ADN simple-brin

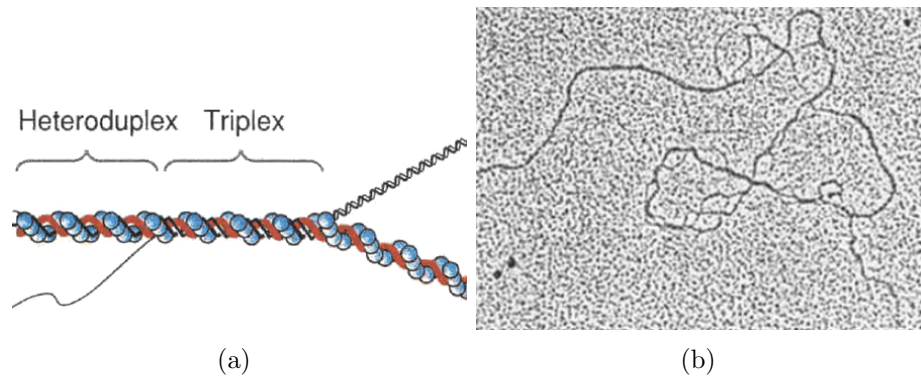


FIGURE I.8 – **L'échange de brins** (a) Représentation schématique de la synapse, de la droite vers la gauche : l'ADN duplexe homologue et le filament nucléoprotéique sur l'ADN simple-brin, la région triplex où les trois brins d'ADN sont dans le filament protéique, finalement après l'échange, l'ADN simple-brin déplacé et l'hétéroduplex. Adapté de [24]. (b) Vues en microscopies électroniques d'intermédiaires réactionnels de l'échange de brin publiées par Jain *et al.* en 1995 [25]. On peut voir des régions triple-brin ainsi que des boucles d'ADN simple-brin déplacé.

Un filament nucléoprotéique peut s'étendre sur plus de 1000 bases, or on vient de voir qu'il suffit de 16 bases, en théorie, pour reconnaître une séquence dans le génome humain. On peut donc imaginer une parallélisation de la recherche d'homologie avec un long filament impliqué dans de nombreuses synapses courtes (quelques dizaines de bases) avec des molécules d'ADN différentes. Cette hypothèse serait compatible avec les observations effectuées sur agrégats mentionnées ci-dessus.

3.5 Échange de brin

Une fois les deux séquences homologues alignées, les brins homologues peuvent être échangés lors de la synapse. Notons qu'il existe trois sites de liaison pour l'ADN dans le filament formé par RecA [26]. On décrit d'abord l'invasion du filament pré-synaptique dans la molécule double-brin d'ADN homologue, formant un triplex d'ADN. L'échange de brin a alors lieu rapidement sur environ 1kb (1000 bases) résultant en un nouvel ADN dit hétéroduplex formé par le simple brin initial et le complémentaire venant du double-brin homologue (figure I.8(a)).

En présence d'ATP ou d'ATP γ S, l'hétéroduplex est favorisé vis-à-vis du duplex initial résultant en un échange rapide des brins. La forme triplex n'est observée que lorsque l'échange de brin est bloqué par une zone hétérologue ou par des contraintes topologiques. On peut alors observer des « boucles D » (voir figure I.8(b)), c'est-à-dire des zones où l'ADN déplacé hors du filament forme des boucles. La forme triplex serait donc uniquement un produit transitoire jusqu'à ce que le brin déplacé puisse être libéré [25].

L'échange de brin par RecA, en présence d'ATP, est majoritairement unidirec-

tionnel de 5' vers 3' par rapport au premier brin lié par RecA [27, 28, 29]. Par contre, en ce qui concerne la protéine eucaryote, il existe toujours une discussion sur la polarité de l'échange de brin. De nombreux articles montrent que l'échange se déroule dans le sens opposé à RecA, de 3' vers 5' [30, 31], alors que d'autres montrent la même polarité [32] ou aucune polarité préférentielle [33, 34]. Il faut noter également que l'échange de brin est plus difficile à réaliser pour Rad51 *in vitro* que pour RecA. Il nécessite un dosage précis en recombinaise et est stimulé par la présence de RP-A, protéine équivalente à la SSB procaryote stabilisant le simple-brin.

4 Fonction ATPase

Les recombinaises de la famille RecA/Rad51 sont des ATPases, mais le rôle de cette activité dans la fonction de ces protéines est mal connu. L'hydrolyse de l'ATP provoque un changement conformationnel [11, 35] qui serait responsable des deux formes de filament observées : la forme étendue en ATP et la forme écroulée en ADP (ou ATP γ S pour Rad51). Elle modifierait également l'affinité de la recombinaise pour l'ADN simple-brin ou double-brin [36] et serait liée à la dépolymérisation. Le besoin en énergie apparaît à différentes étapes du processus entraînant de la confusion sur la compréhension du rôle de l'hydrolyse de l'ATP.

Comme on l'a vu page 12, le domaine ATPase de ces protéines est la seule partie homologue de cette famille de protéine. Néanmoins, l'activité ATPase varie beaucoup de RecA à son homologue eucaryote Rad51. On donne dans la figure I.5, les taux d'hydrolyse de l'ATP (k_{cat} ³) pour ces deux protéines. On remarque que Rad51 hydrolyse nettement moins fréquemment l'ATP que RecA, leur k_{cat} diffère par 2 ordres de grandeur. On verra dans la suite que l'on peut relier cette différence d'activité ATPase aux différences observées dans les fonctions accomplies par RecA et Rad51. D'autre part, il faut noter que ce taux d'hydrolyse dépend du substrat présent : ADNsb ou ADNdb. L'activité ATPase des recombinaises est ADN-dépendante, elle est quasi-nulle en l'absence totale d'ADN [37].

RecA et Rad51 peuvent réaliser les trois étapes de la recombinaison (polymérisation, hybridation et échange de brin) sans hydrolyser l'ATP [38, 39]. Il suffit de lier l'ATP ou un analogue non-hydrolysable (ATP γ S, AlF_4^- , etc). Cette question a été récemment étudiée en utilisant des mutants de RecA [40] et de Rad51 [41] capables de lier l'ATP mais incapables de l'hydrolyser. D'autre part, l'hydrolyse de l'ATP est couplée à la dissociation des monomères de RecA, rendant la polymérisation et l'échange de brin unidirectionnels. Il est intéressant de remarquer que la directionnalité de ces étapes est encore une question ouverte pour Rad51 (voir section 3.5), ce qui paraît alors logique quand on sait que cette protéine hydrolyse très peu l'ATP.

Néanmoins, l'hydrolyse de l'ATP a lieu uniformément le long du filament formé par RecA [42], et la partie responsable de la dissociation des monomères est négligeable. On peut alors s'interroger sur le rôle de cette hydrolyse continue d'ATP. La

3. k_{cat} : nombre de molécules d'ATP hydrolysées par minute

recombinase bactérienne a des fonctions dont sont incapables ses homologues non-bactériennes, celles-ci nécessitent toutes l'hydrolyse de l'ATP. En particulier, RecA est capable de passer des insertions de séquences hétérologues longues de plus de 100 paires de bases lors de l'échange de brins, alors que ScRad51 ne peut pas passer plus de 9pb hétérologues. Ceci nécessite certainement de dénaturer la partie hétérologue. RecA est également capable d'étendre l'échange à quatre brins, ce qui n'a jamais été montré pour les autres recombinases.

Enfin, il a été montré une activité hélicase indirecte pour RecA [43] nécessitant également l'hydrolyse de l'ATP. Elle peut ainsi dérouler jusqu'à 400 pb. La dénaturation complète par cet effet est limitée à environ 30 pb auxquelles RecA est directement liée. Il faut noter que la présence d'une cassure simple-brin (ou nick) empêche cette activité.

5 Limite des connaissances

Après cette revue de l'état des connaissances concernant la recombinaison homologue, il faut se pencher sur les nombreuses zones d'ombre qui persistent.

Tout d'abord, on a vu que la conformation de l'ADN dans le filament nucléo-protéique n'a jamais été mesurée directement. Il est clair qu'il se trouve dans une conformation étirée et déroulée par rapport à sa forme canonique. Mais cela a été mesuré d'une part indirectement et d'autre part de manière statique. Il serait intéressant de mesurer en temps réel, lors de la polymérisation, le changement de conformation de l'ADN lors de l'ajout de monomères. On pourrait obtenir ainsi des informations complémentaires concernant en particulier la dynamique d'assemblage du filament. Ce dernier point est abordé par des expériences de molécule unique, en particulier avec des pinces magnétiques, mais avec une résolution ne permettant pas de distinguer l'arrivée de chaque monomère.

Un autre point concernant l'assemblage du filament présynaptique est la question de l'ajout de monomères ou de multimères. De nombreux articles concordent pour une étape de nucléation fortement coopérative nécessitant 4-5 monomères, mais la discussion reste ouverte en ce qui concerne l'étape d'élongation. Une mesure directe de l'addition des monomères ou multimères permettrait de répondre à cette question. Ceci nécessite, une fois encore, d'observer la formation du filament avec la résolution du monomère.

Finalement, on aimerait connaître l'énergie mise en jeu lors de la polymérisation. En effet, la protéine étire et déroule partiellement l'ADN, elle doit donc produire une force et un couple. La mesure de ces grandeurs pourrait aider à comprendre à quel moment l'énergie est dissipée dans ce processus. Pour aller plus loin, si l'on est capable d'appliquer un couple qui s'oppose à celui produit par la protéine, on peut imaginer arrêter la polymérisation et même engendrer la dépolymérisation tout en mesurant son coût énergétique. Si ceci est réalisé pour les différentes étapes de la recombinaison homologue, on peut espérer établir le panorama énergétique complet

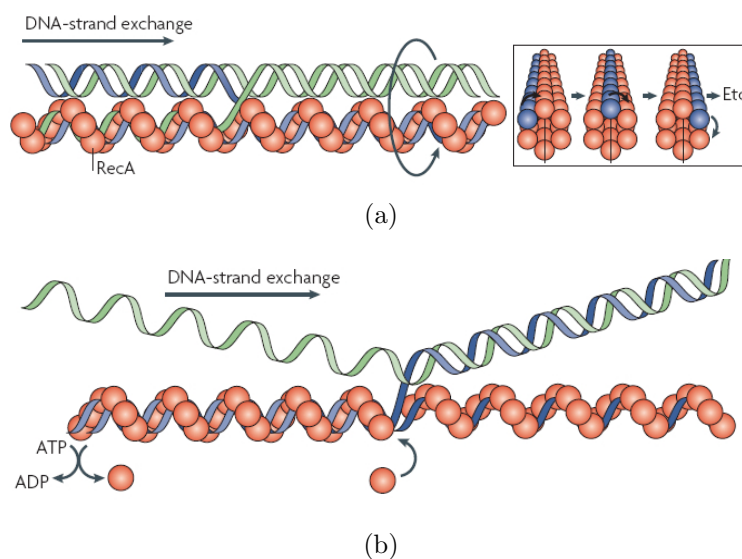


FIGURE I.9 – **Différents modèles pour expliquer le rôle de l'hydrolyse de l'ATP dans l'échange de brin.** (a) Le modèle de rotation facilitée de l'ADN. Les deux molécules d'ADN subissent une rotation l'une par rapport à l'autre, basé sur l'idée de vagues d'hydrolyse d'ATP dans le filament [42]. (c) Le modèle de redistribution des monomères. RecA a uniquement un rôle de couplage des ADN, l'hydrolyse de l'ATP sert à faciliter la dissociation de RecA et sa redistribution. Ces trois modèles impliquent un intermédiaire à trois brins qui n'est pas montré ici. Tiré de [44].

de ce processus biologique.

L'étape de recherche d'homologie est pour l'instant la moins connue et la moins décrite des trois étapes de la recombinaison homologue. Il existe des expériences en volume qui permettent d'accéder à certains états intermédiaires de cette recherche et de caractériser l'état final. Cependant, la recherche d'homologie n'a jamais été observée en temps réel. Elle pose pourtant des questions intéressantes concernant en particulier l'efficacité de cette recherche par rapport à la taille totale du génome à explorer. Quelle est la stratégie adoptée pour rechercher efficacement la cible et non une cible ressemblante ?

Enfin, une autre question qui cause beaucoup de débats est celle du rôle de l'hydrolyse de l'ATP. Les différences de taux d'hydrolyse entre RecA et Rad51 associées aux différences observées dans leur comportement pourrait aider à mieux comprendre le rôle de leur activité ATPase. Étant donné que RecA hydrolyse davantage l'ATP et peut effectuer des fonctions supplémentaires par rapport à Rad51 (passage d'hétérologie, échange à quatre brins), elle a été davantage étudiée sous l'aspect moteur moléculaire [43]. Il existe des modèles pour expliquer à quel moment et comment

RecA utilise cette énergie [44]. On montre figure I.9 deux exemples de modèles.

La figure I.9(a) présente le modèle de rotation facilitée de l'ADN suggéré par M.Cox en particulier. Dans celui-ci, on attribue une fonction de moteur moléculaire à RecA, ce qui lui permettrait de faire tourner une molécule d'ADN par rapport à l'autre lors de l'échange de brins. Cette activité pourrait générer des contraintes en torsion capables de dénaturer une zone hétérologue afin de la dépasser.

Dans un second modèle, dit de redistribution des monomères (figure I.9(b)) et proposé par S.Kowalczykowski, RecA n'a pas d'activité moteur mais uniquement une fonction d'hybridation des molécules d'ADN. Ce modèle propose que l'hydrolyse de l'ATP serve à redistribuer les monomères de RecA lorsque des discontinuités sont rencontrées dans le filament. Ainsi, l'hydrolyse de l'ATP en dehors des extrémités du filament serait inutile. Ce modèle propose également de justifier le passage d'hétérologie par l'utilisation de la torsion libérée lors la dissociation de monomères de l'ADNdb pour dérouler et dénaturer la zone hétérologue. Dans les deux cas, on remarque que l'hypothèse retenue pour le passage de séquence hétérologue est celle de la dénaturation locale.

B Études en molécule unique

1 Un moteur moléculaire : la kinésine

Nous avons vu précédemment que les protéines recombinaise agissent mécaniquement sur l'ADN, en changeant sa longueur et son état de torsion. Nous avons aussi noté leur capacité à hydrolyser l'adénosine tri-phosphate (ATP). Ces deux caractéristiques les apparentent à une autre famille de protéines : les moteurs moléculaires. Comme les recombinaises, les moteurs utilisent l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour accomplir un travail mécanique. Dans cette partie, nous verrons des expériences récentes qui permettent d'illustrer le fonctionnement d'un moteur du cytosquelette. Ces expériences seront utiles pour introduire quelques concepts-clés sur la conversion de l'énergie chimique en travail mécanique tels que la force d'arrêt, la relation force/vitesse et le rendement du moteur. L'analogie entre moteurs et recombinaises s'est avérée précieuse pour dessiner et interpréter nos expériences sur la polymérisation de hRAD51.

On appelle moteur moléculaire une protéine capable de transformer de l'énergie chimique, provenant en général de l'hydrolyse de l'ATP⁴, en travail mécanique. Les protéines moteurs les plus étudiées sont celles couplées au cytosquelette : la myosine couplée aux filaments d'actine est responsable de la contraction musculaire, ou la kinésine responsable du transport intracellulaire le long des microtubules. Ces deux protéines, en particulier, ont été largement étudiées par des techniques dites de

4. Certains moteurs hydrolysent d'autres nucléotides (GTP,TTP,CTP).

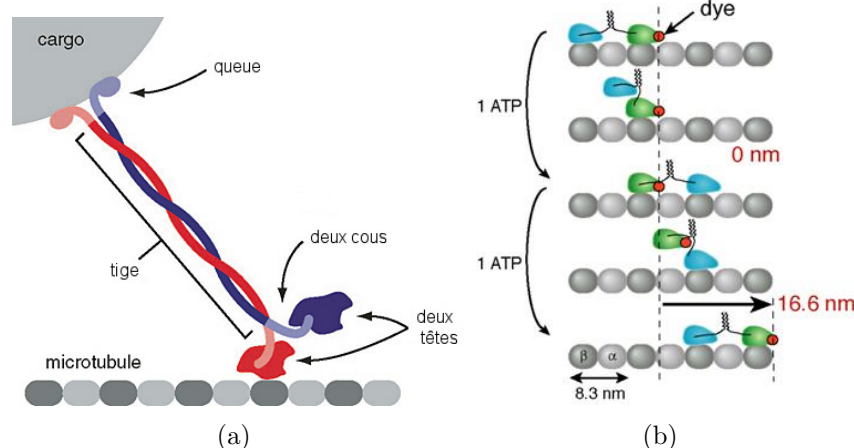


FIGURE I.10 – **La kinésine : un marcheur moléculaire** (a) La kinésine est un dimère, elle est constituée de deux têtes qui peuvent se lier au microtubule et hydrolyser l'ATP, d'une longue tige faite de l'enroulement des deux monomères et enfin d'une région terminale capable de lier un cargo. Figure du groupe de S. Block. (b) La kinésine marche comme un humain, en mettant un pied devant l'autre, à la différence que ses pieds sont appelés têtes et qu'ils se lient fortement au microtubule afin d'effectuer une marche processive. Le centre de masse de la protéine effectue des pas de 8nm, ce qui est aussi la taille du dimère de tubuline. Illustration tirée de [48].

molécule unique depuis les années 1990 [45, 46]. Ces études ont permis de comprendre le cycle mécano-chimique de ces enzymes ou comment l'hydrolyse de l'ATP est couplée à un changement conformationnel [47] de grande ampleur permettant le mouvement. Nous avons choisi comme exemple la kinésine dont le fonctionnement est représentatif de la plupart des moteurs processifs.

1.1 Présentation

La kinésine est une protéine dimérique capable de se déplacer le long des microtubules. Les microtubules sont des filaments du cytosquelette, organisés de manière radiale dans la cellule, le centre organisateur des microtubules étant localisé près du noyau. Ce sont des protofilaments polaires résultant de la polymérisation de dimères de tubuline. On peut donc différencier les deux extrémités d'un microtubule : on note (–) l'extrémité proche du centre organisateur des microtubules et (+) celle qui se situe à la périphérie de la cellule. La kinésine conventionnelle se déplace vers l'extrémité (+) des microtubules, elle lie des vésicules et les transporte vers la périphérie de la cellule. Elle a été identifiée pour la première fois grâce à des expériences de motilité de microtubules *in vitro* par Vale et collaborateurs [49].

On peut différencier plusieurs domaines dans la structure de la kinésine (figure I.10(a)). Tout d'abord, le domaine moteur, appelé « tête » de la kinésine, qui est capable de lier et d'hydrolyser l'ATP ainsi que de se fixer au microtubule. La

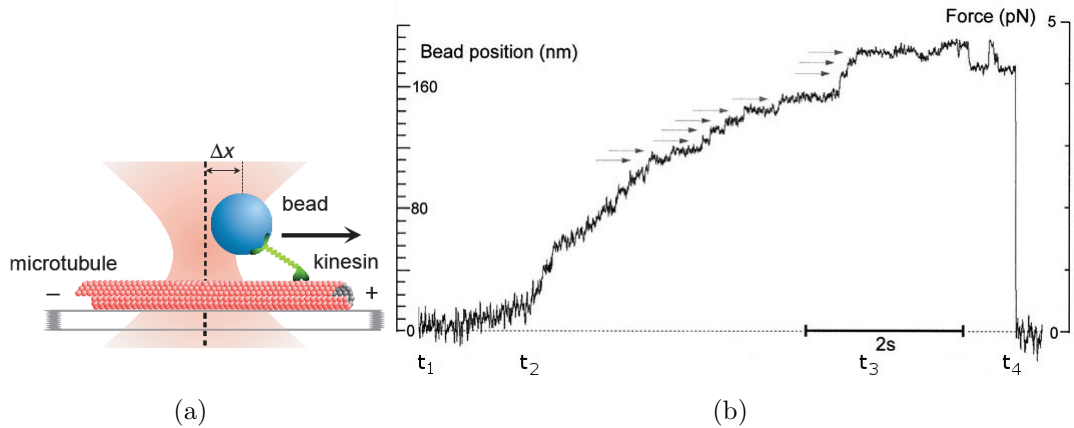


FIGURE I.11 – **La kinésine dans les pinces optiques** (a) Schéma de principe d'une expérience de molécule unique avec la kinésine dans les pinces optiques. La kinésine couplée à une bille micrométrique marche sur un microtubule déposé à la surface d'une lamelle de microscope. Elle exerce une force qui déplace la bille hors du centre du piège optique de Δx . Tiré de [50]. (b) Exemple de mesure de la position de la bille en fonction du temps. Au fur et à mesure que la kinésine déplace la bille, elle ressent une force plus élevée et finit par s'arrêter lorsqu'elle atteint sa force d'arrêt. Les pas de la kinésine sont montrés par les flèches. Adapté de [51]

kinésine est un homodimère qui comprend deux têtes se touchant à la hauteur du « cou » (voir figure I.10(a)). On distingue ensuite une région où les deux monomères sont enroulés en une longue tige, puis à l'extrémité de celle-ci se situe le domaine responsable de la liaison du cargo à transporter.

La kinésine est un véritable « marcheur moléculaire ». On peut faire un parallèle saisissant avec la marche humaine à condition de remplacer les mots « tête » par « pied » et « cou » par « jambe ». La kinésine pose un pied devant l'autre séquentiellement, en gardant au moins un des deux pieds fermement attaché au microtubule (figure I.10(b)). Elle marche ainsi le long du microtubule de la même façon que nous le ferions sur une poutre.

1.2 Expériences et résultats en molécule unique.

Le fonctionnement de ce moteur est bien illustré par une série d'expériences de molécule unique, particulièrement élégantes. Afin de pouvoir suivre sa position en fonction du temps, la kinésine est marquée en lui fixant, de manière spécifique ou non, une bille micrométrique. On peut ainsi mesurer sa vitesse, ses écarts à la vitesse moyenne et son temps de persistance sur le microtubule, appelé « processivité ».

On peut aussi se servir de cette bille comme d'une « poignée moléculaire » : on piège la bille à l'aide d'une pince optique, faisceau laser fortement focalisé. La bille, étant diélectrique, est attirée par les forts champs électriques, donc par le point de focalisation du faisceau laser. En réalité, la bille est piégée légèrement après

le point de focalisation dans le sens de propagation du faisceau dû à la pression de radiation subie par la particule (pour une description complète des pinces optiques, se référer aux revues de Svoboda, Neuman et Block [52, 53]). On oppose ainsi une force contrôlée à l'avancement de la kinésine (figure I.11(a)). En première approximation, la pince optique agit comme un ressort de raideur équivalente κ . Sa force de rappel, dirigée vers le centre du piège, est proportionnelle au déplacement imposé Δx (pour de faibles déplacements).

Force d'arrêt et pas de la kinésine Crevel et collaborateurs ont ainsi observé le mouvement d'une kinésine⁵ unique lorsqu'elle est fixée à une bille maintenue par des pinces optiques. On montre figure I.11(b), un enregistrement typique de cette expérience publiée en 1999 [51]. Entre t_1 et t_2 , la bille a un mouvement brownien limité par le piège optique. Vers t_2 , la kinésine, collée à la bille, s'attache à un microtubule déposé à la surface, et commence à se déplacer. On observe que la protéine déplace la bille par une séquence de pas discrets de 8nm environ (marqués par des flèches sur la figure I.11(b)). Au fur et à mesure que la kinésine se déplace dans le piège entre t_2 et t_3 , la force de rappel est augmentée (car proportionnelle au déplacement) et on observe que la vitesse du moteur diminue. En effet, la vitesse de déplacement de la kinésine diminue quasiment linéairement avec la force, depuis environ $1 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ en l'absence de force jusqu'à devenir nulle à la force d'arrêt. Cette force d'arrêt est atteinte en t_3 sur la figure I.11(b). A cette force, la kinésine peut alterner pas en avant et pas en arrière, mais sa vitesse moyenne est nulle. La force d'arrêt a été mesurée pour des kinésines provenant de différents organismes, elle est comprise entre 5 et 7 pN.

Finalement, en t_4 , la kinésine se détache du microtubule provoquant le retour brusque de la bille au centre du piège. La kinésine est un moteur processif, c'est-à-dire qu'elle peut enchaîner plusieurs pas sans se détacher complètement du microtubule. Ainsi, lorsque l'on ne lui applique aucune force, la kinésine effectue en moyenne une centaine de pas avant de se détacher du microtubule, ceci représente un parcours de l'ordre d'un micromètre.

D'autre part, les travaux publiés en 1997 par Schnitzer et Block [54] ainsi que par Hua *et al.* [55] ont montré que la kinésine hydrolyse une, et une seule, molécule d'ATP par pas de 8nm. En particulier, Schnitzer et Block montrent que la vitesse du moteur kinésine suit une loi de Michaelis-Menten en fonction de la concentration en ATP. Lorsque la concentration en ATP est limitante, le mouvement de la kinésine est limitée par l'arrivée d'une molécule d'ATP, sa vitesse est ralentie. Par contre, lorsque la concentration en ATP est saturante, alors c'est le temps nécessaire au cycle catalytique de l'enzyme qui limite le mouvement à sa vitesse maximale.

Ces résultats permettent de faire le bilan énergétique du pas de la kinésine. La protéine est capable d'avancer contre une force, F , allant jusqu'à 6 pN environ, en effectuant des pas de taille $d = 8 \text{ nm}$. Ceci correspond à un travail

5. Il s'agit de Nkin : kinésine de *Neurospora Crassa*.

mécanique $W = F \cdot d = 48 \text{ pN} \cdot \text{nm}$. On peut définir et calculer le rendement de ce moteur moléculaire, ρ , comme étant le rapport entre le travail produit pour un pas et l'énergie disponible via l'hydrolyse d'une molécule d'ATP par pas ($E_{ATP \rightarrow ADP + P_i} \approx 80 \text{ pN} \cdot \text{nm}$) :

$$\rho = \frac{W}{E_{ATP \rightarrow ADP + P_i}} \approx 60\%.$$

Stochasticité Il est possible de s'affranchir de l'observation directe des pas, en analysant les fluctuations du mouvement. Pour un moteur processif, les fluctuations autour de la vitesse moyenne reflètent la stochasticité sous-jacente de l'enzyme [56]. L'analyse de ces fluctuations peut révéler le nombre de sous-étapes biochimiques limitantes pour effectuer le pas mécanique.

Si l'on considère un moteur **poissonien** ayant effectué $n(t)$ pas, alors la variance du nombre de pas, σ_n^2 , est égale au nombre moyen de pas, $\langle n(t) \rangle$:

$$\sigma_n^2 = \langle n^2(t) \rangle - \langle n(t) \rangle^2 = \langle n(t) \rangle. \quad (\text{I.1})$$

Dans le cas d'un moteur comme la kinésine, on mesure le déplacement $x(t) = d \cdot n(t)$. On peut calculer la variance de sa position en fonction du nombre de pas réalisés :

$$\sigma_x^2 = \langle d^2 \cdot n^2(t) \rangle - \langle d \cdot n \rangle^2 = d^2 \cdot (\langle n^2 \rangle - \langle n \rangle^2). \quad (\text{I.2})$$

D'après le calcul précédent (équation I.1), si la kinésine est un moteur poissonien, alors la variance de sa position vaut finalement :

$$\sigma_x^2 = d^2 \cdot \langle n(t) \rangle = d \cdot \langle x \rangle. \quad (\text{I.3})$$

On définit le paramètre de stochasticité, r , comme étant le rapport entre la variance et le produit de la moyenne par la taille du pas :

$$r = \frac{\langle x^2(t) \rangle - \langle x(t) \rangle^2}{d \cdot \langle x(t) \rangle} \quad (\text{I.4})$$

Ainsi, d'après l'équation I.3, le paramètre de stochasticité d'un moteur poissonien, effectuant des pas de taille d , est égal à 1.

Si maintenant le pas de taille d est effectué en N sous-étapes de probabilités égales, alors la taille effective du pas limitant est de d/N . Ainsi, la variance de la position vaut maintenant : $\frac{d}{N} \langle x \rangle$, et le paramètre de stochasticité vaut :

$$r = \frac{\frac{d}{N} \langle x(t) \rangle}{d \langle x(t) \rangle} = \frac{1}{N}. \quad (\text{I.5})$$

Cette analyse statistique a été utilisée notamment par Schnitzer et Block [54] pour montrer que la kinésine hydrolyse une molécule d'ATP par pas. Ils obtiennent

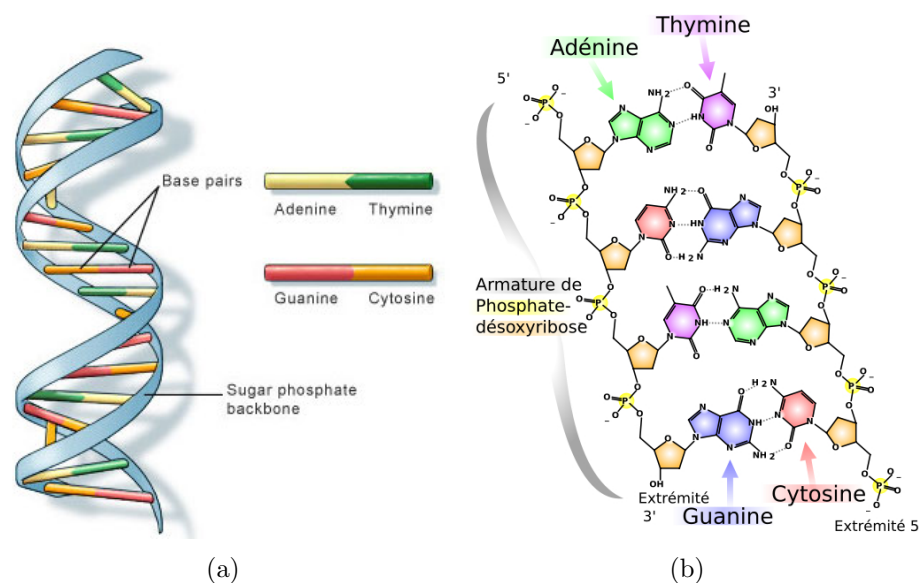


FIGURE I.12 – **Structure de l’ADN double-brin : la double hélice, l’enchaînement des bases.** (a) Copyright : US National library of medicine.

un paramètre de stochasticité proche de 1 lorsque l’ATP est limitant. Dans ce cas, il y a une seule étape limitante pour effectuer un pas de 8nm : la liaison d’une molécule d’ATP. Par contre, lorsque l’ATP est en concentration saturante, ils observent un paramètre de stochasticité d’environ 1/2. Dans ce deuxième cas, il y a donc deux sous-étapes limitantes.

2 Physique de l’ADN en molécule unique

2.1 Introduction

Nous allons étudier les interactions de RecA/Rad51 avec une molécule unique d’ADN, nous avons donc besoin de présenter ici la modélisation physique de la molécule d’ADN double-brin.

Tout d’abord, l’ADN est une molécule formée de deux brins anti-parallèles arrangés en double-hélice (figure I.12). Ces deux brins sont reliés entre eux par des liaisons hydrogènes entre les bases complémentaires, Adénine-Thymine (A-T) et Guanine-Cytosine (G-C). Les bases s’enchaînent en une longue chaîne via le squelette phosphate. La structure cristallographique de la double-hélice a été résolue en 1953 par J. Watson et F. Crick à partir de clichés de diffractions des rayons X obtenus par R. Franklin. Il faut 10,4 paires de bases pour faire un tour de la double-hélice, dont le pas est de 3,4 nm.

On décrit bien la physique d’une molécule d’ADN par les modèles créés pour les

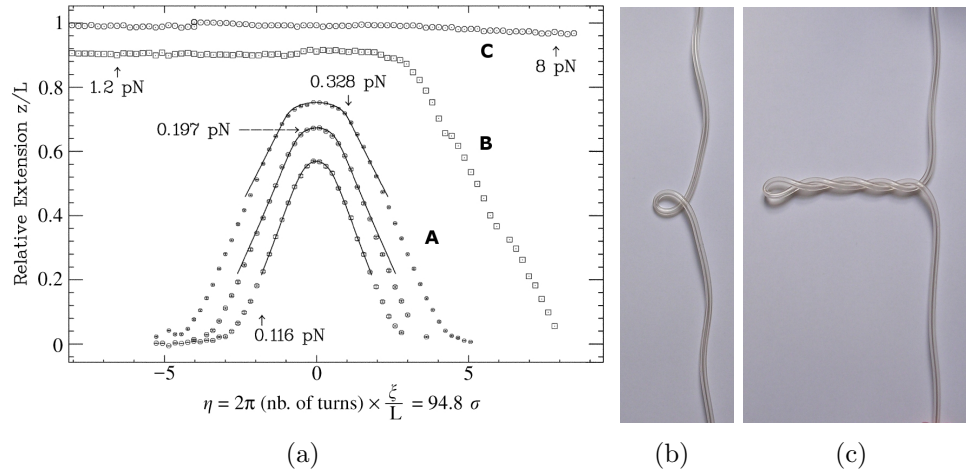


FIGURE I.13 – **Comportement d’une molécule unique d’ADN en fonction de l’enroulement et de la force imposés.** (a) Extension relative de molécules d’ADN en fonction du degré de surenroulement pour différentes forces. Le comportement est symétrique à faible force (A), le raccourcissement étant dû à la formation de plectonèmes. A force intermédiaire (B), le comportement est asymétrique. Des plectonèmes sont toujours formés pour un enroulement positif alors qu’un enroulement négatif dénature l’ADN. Pour des forces supérieures à 3pN (C), aucun plectonème n’est formé, la torsion est absorbée par des changements structuraux de la molécule. Les lignes continues correspondent à l’ajustement par le modèle « rod-like chain ». Adapté de [58]. (b) et (c) Illustration de la formation des plectonèmes sur un tube en plastique. (b) Formation de la première boucle. (c) A mesure que l’on continue d’ajouter de l’enroulement, celui-ci est stocké dans le plectonème qui s’agrandit.

polymères. En effet, l’ADN se comporte en solution comme une chaîne de polymère : il forme une pelote aléatoire pour maximiser l’entropie [57]. Tirer sur la molécule coûte de l’entropie, et donc de l’énergie, en réduisant le nombre de configurations possibles du système. Lorsque la molécule est complètement étirée, il ne reste alors qu’une seule configuration possible, celle d’une chaîne disposée en ligne droite. Pour atteindre cette configuration, il faut produire du travail contre l’entropie, il faut donc appliquer une force. Cette force est relativement faible, typiquement inférieure à 10pN. Au-delà de ce régime entropique et jusqu’à 70pN, l’ADN peut être étiré comme un ressort : l’enthalpie domine dans ce régime.

2.2 Modélisation

Différents modèles ont été utilisés pour décrire les polymères. Nous allons présenter uniquement le « rod like chain model » (modèle du tube), développé par Bouchiat et Mézard en 1998 [59], qui décrit le comportement d’une chaîne continue de polymère, ayant une énergie de courbure et une énergie de torsion, et mise sous

tension par une force F . Dans ce modèle, l'énergie du polymère est donnée par :

$$E = \frac{B}{2} \int_0^{l_0} \left(\frac{d\vec{t}}{ds} \right)^2 ds - F \int_0^{l_0} \cos \Theta(s) ds + \frac{C}{2} \int_0^{l_0} \Omega^2(s) ds, \quad (\text{I.6})$$

où s est l'abscisse curviligne le long du polymère de longueur l_0 .

Dans cette équation :

- le premier terme correspond à l'énergie de courbure, avec B le module de courbure et $\frac{d\vec{t}}{ds}$ la courbure locale.
- le deuxième terme correspond au travail de la force appliquée aux extrémités de la molécule avec $\cos \Theta(s)$ l'angle local de courbure.
- le dernier terme correspond à l'énergie de torsion, avec C le module de torsion et $\Omega(s)$ la torsion locale.

Ce modèle permet bien de décrire le comportement d'une molécule d'ADN lorsqu'elle est manipulée en torsion avec une faible force de traction comme cela est possible dans les pinces magnétiques. En effet, ses prédictions ajustent très bien l'extension de l'ADN en fonction de son enroulement à faible force (figure I.13(a), courbes A) lorsque l'extension de la molécule diminue à mesure que l'on lui impose des rotations supplémentaires à une de ses extrémités, l'autre étant fixe. Cet ajustement fournit une valeur pour le module de torsion C de l'ADN : $C/k_B T$ vaut environ 85 nm. Cependant l'incertitude sur cette grandeur est assez élevée puisqu'elle a été également déduite par d'autres méthodes donnant finalement un consensus à 75 ± 25 nm.

Formation de plectonèmes Pour des forces inférieures à 0,5 pN, l'enroulement imposé à la molécule est transformé en boucles d'ADN appelées plectonèmes entraînant la diminution de son extension (figure I.13(a), courbes (A) et photographies). On verra en section 3.2 comment former et observer expérimentalement ces plectonèmes sur une molécule unique d'ADN.

Les plectonèmes sont le résultat d'une instabilité mécanique que l'on peut également observer sur un tube en caoutchouc par exemple. Afin de modéliser ce comportement de manière simple, on peut se ramener au cas du tube en caoutchouc et négliger les fluctuations thermiques [58]. Dans ce cas, lorsque l'on tient le tube à force constante, F , assez faible pour observer les plectonèmes, et que l'on commence à tourner une de ses extrémités alors la torsion dans le tube augmente. Le couple associé, Γ , augmente linéairement avec l'angle imposé θ : $\Gamma = C\theta/l$, et le tube reste droit. A mesure que l'on continue, on atteint le couple critique Γ_p et le tube forme localement une boucle de rayon R_p (voir figure I.13(b)).

Pour calculer le coût énergétique de la formation d'une telle boucle, il faut considérer deux choses : l'énergie de courbure et le travail accompli contre la force de traction F . D'après l'équation I.6, l'énergie de courbure nécessaire pour former une

boucle de rayon R est donnée par :

$$E_{courbure} = \frac{B}{2} \int_0^{2\pi R} \frac{1}{R^2} ds = \frac{\pi B}{R}, \quad (\text{I.7})$$

où $1/R$ est la courbure de la boucle de rayon R . Le travail nécessaire pour raccourcir la molécule d'ADN de $2\pi R$ contre la force F est : $2\pi RF$. Ainsi, le coût énergétique total pour créer la première boucle de plectonème est :

$$E^- = \frac{\pi B}{R} + 2\pi RF. \quad (\text{I.8})$$

Ce coût énergétique est minimisé pour une boucle de rayon $R_p = \sqrt{B/2F}$, et sa valeur minimale est :

$$E_{min}^- = 2\pi\sqrt{2BF}. \quad (\text{I.9})$$

Le couple critique de formation des plectonèmes est donné par l'équilibre entre gains et pertes énergétiques. Le gain d'énergie vient du relâchement d'un tour de torsion qui a été converti dans la boucle plectonémique, avec le couple Γ . Il vaut :

$$E^+ = 2\pi\Gamma. \quad (\text{I.10})$$

L'équilibre énergétique donne finalement le couple critique de formation des plectonèmes :

$$\Gamma_p = \frac{E_{min}^-}{2\pi} = \sqrt{2BF}. \quad (\text{I.11})$$

Une fois ce couple critique atteint et si l'on continue à rajouter de l'enroulement, alors le couple reste constant, égal à Γ_p , et l'enroulement supplémentaire est stocké dans le plectonème (voir figure I.13(c)).

Longueur de persistance On définit la longueur de persistance, ξ , d'un polymère par $\xi = B/k_B T$. C'est la longueur caractéristique de perte des corrélations angulaires de courbure. Elle reflète la rigidité en courbure du polymère considéré et dépend du solvant, en particulier de sa force ionique. En pratique, pour mesurer la longueur de persistance d'une molécule unique d'ADN, on ajuste la courbe force-extension expérimentale par la solution numérique du modèle du ver (worm like chain) obtenue par Bouchiat et collaborateurs [60]. Le modèle du ver ne prend en compte que les deux premiers termes de l'équation I.6, termes liés à la courbure du polymère. Il s'agit donc d'un modèle de polymère libre en torsion. Ainsi, en conditions physiologiques⁶, la longueur de persistance de l'ADN est de 52 nm [58]. On verra en section 3.1 comment obtenir expérimentalement ces courbes force-extension.

6. tampon phosphate 10mM, NaCl 10mM, pH 7,5

2.3 Au-delà du régime entropique

Le modèle précédent décrit bien le comportement d'une molécule d'ADN pour de faibles enroulements et de faibles forces, c'est-à-dire dans le régime entropique. Lorsque la molécule est complètement étirée, elle se comporte alors comme un tube élastique de section efficace A et de module d'Young E . Le module élastique de l'ADN est $EA \sim 1000$ pN [58]. Dans ce régime, on peut négliger les contributions entropiques et la courbe force-extension suit la loi de Hooke⁷ : $F = EA(x - 1)$, avec $x = l/l_0 > 1$.

D'autre part, à environ 70 pN, l'ADN subit une transition de phase du premier ordre qui résulte en l'allongement de la molécule jusqu'à environ 1,7 fois sa longueur cristallographique. Cette transition est très coopérative et une petite augmentation de la force entraîne un allongement important de la molécule. Cette nouvelle conformation est appelée ADN-S.

Transitions induites par un couple On montre figure I.13(a), l'extension relative de molécules d'ADN de longueur L en fonction du degré de surenroulement η défini par $\eta = 2\pi N\xi/L$ avec N le nombre de tours imposés à la molécule et ξ sa longueur de persistance. Les courbes (A), obtenues à force faible (inférieure à 0,5 pN) sont symétriques par rapport à l'enroulement. Elles correspondent à la formation de plectonèmes. Lorsque l'on tire à des forces intermédiaires ($0,5 < F < 3$ pN, courbes (B)), la courbe extension versus enroulement perd sa symétrie. A enroulement positif, on forme toujours des plectonèmes, mais à enroulement négatif, l'ADN conserve une extension constante. En effet, lorsque l'on atteint un couple critique, l'ADN est dénaturé localement, c'est-à-dire que les deux brins sont séparés. A plus haute force ($F > 3$ pN, courbes (C)), la courbe devient complètement plate, l'ADN conserve une forme étendue indépendamment de l'enroulement. Pour les enroulements négatifs, cela correspond toujours à la dénaturation, mais pour les enroulements positifs il s'agit d'un changement de la structure interne de la molécule vers une nouvelle phase appelée ADN-P.

3 Revue des techniques de molécule unique utilisées sur le système RecA/Rad51.

Nous allons voir dans cette partie certaines techniques de molécule unique employées pour étudier le système RecA/Rad51 et leurs principaux résultats.

3.1 Appliquer mesurer une force avec des pinces optiques

Nous allons tout d'abord nous intéresser aux techniques permettant de manipuler l'ADN. Les pinces optiques, présentées en section 1.2, permettent d'appliquer une

7. « *ut tensio sic vis* », Robert Hooke, 1678.

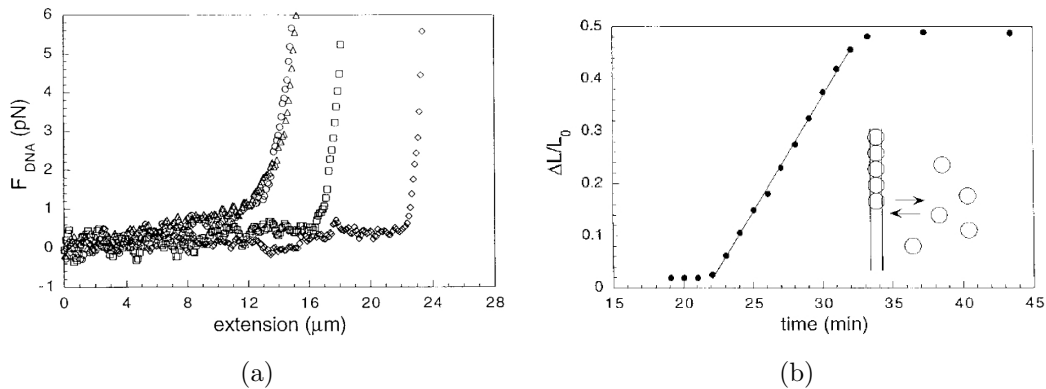


FIGURE I.14 – **Polymérisation de RecA en pinces optiques par Shivashankar *et al.* [61]** (a) Courbes force-extension de molécules individuelles d’ADN à différents temps au cours de la polymérisation de RecA. (○) : ADN nu, (△) : après dépolymérisation, (□) : partiellement couvert par RecA et (◇) : complètement couvert par RecA. (b) Longueur relative d’une molécule d’ADN pendant la polymérisation de RecA en présence d’ATP (●). La ligne continue correspond à l’ajustement linéaire de la phase de croissance. Le schéma illustre le mécanisme de croissance proposé.

force contrôlée aux extrémités d’une molécule unique d’ADN.

Shivashankar et collaborateurs [61] ont utilisé cette technique pour étudier les propriétés mécaniques du filament formé par RecA et sa cinétique de polymérisation sur une molécule d’ADN double-brin (ADNdb). Une molécule d’ADN unique est fixée par une extrémité à une lamelle de microscope et par l’autre extrémité à une bille en polystyrène. Cette bille est tenue par des pinces optiques et la lamelle peut être déplacée verticalement grâce à un élément piézo-électrique, ce qui permet de tracer la courbe force-extension de la molécule piégée. On montre figure I.14(a) les courbes force-extension obtenues sur un ADN nu (○), sur un ADN partiellement couvert par RecA (□) et sur un ADN complètement couvert par RecA (◇). L’ajustement de ces courbes par le modèle du ver (mentionné p.33) donne la longueur cristallographique et la longueur de persistance de chaque molécule. L’ADN passe ainsi d’une longueur de persistance de 50 nm lorsqu’il est nu à environ 900 nm lorsqu’il est couvert par RecA en présence d’ATP ou d’ATP γ S [61, 62].

Shivashankar et collaborateurs se sont également intéressés à la cinétique de polymérisation de RecA. La figure I.14(b) montre la longueur relative d’une molécule unique d’ADN lors de la polymérisation de RecA en présence d’ATP. Etant donné que l’ADN est étiré de 50% dans le filament, la mesure de la longueur de la molécule piégée permet de suivre la polymérisation de RecA. Celle-ci démarre après un temps de latence, puis la longueur de l’ADN augmente de manière linéaire et finalement s’arrête brusquement. Ceci étant caractéristique d’une croissance à partir d’un noyau unique, les auteurs proposent un modèle de nucléation-croissance pour la polymérisation de RecA. Ce modèle est maintenant admis pour RecA et pour Rad51 même

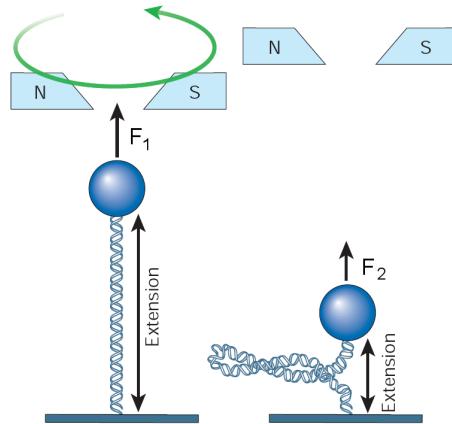


FIGURE I.15 – **Schéma de principe des pinces magnétiques.** Une molécule d'ADN est étirée entre une lamelle de microscope et une bille magnétique à l'aide d'une paire d'aimants. La rotation des aimants permet d'imposer une torsion à l'ADN qui se traduit, à faible force, par la formation de plectonèmes (à droite). D'après [63].

si les détails ne sont pas encore clairs.

3.2 Force et torsion avec des pinces magnétiques

L'outil le plus adapté pour étudier les propriétés mécaniques d'une molécule unique d'ADN est les pinces magnétiques [64]. Elles permettent, tout comme les pinces optiques, d'appliquer et de mesurer une force mais aussi d'appliquer un couple permettant de contraindre topologiquement la molécule d'ADN.

Le principe des pinces magnétiques est très similaire à celui des pinces optiques. Tout comme une bille diélectrique est attirée par les fortes intensités lumineuses, une bille magnétique est attirée par les champs magnétiques intenses. La force qu'elle subit est donnée par : $\vec{F}_{mag} = \text{grad}(\vec{M} \cdot \vec{B})$. Le moment magnétique de la bille étant à saturation dans ce dispositif, il en découle que la force est directement proportionnelle au gradient du champ magnétique $\vec{F}_{mag} \propto \text{grad}(B)$.

Dans une expérience de pinces magnétiques, la molécule d'ADN est attachée d'une part à la lamelle de microscope et d'autre part à une bille magnétique de taille micrométrique. Cette bille est tirée selon l'axe perpendiculaire au plan de lamelle grâce à une paire d'aimants (figure I.15). La force de traction dépend de la position macroscopique des aimants (distance par rapport à l'échantillon). Le gradient de champ magnétique est homogène à l'échelle de la bille ce qui a pour conséquence qu'à une position des aimants correspond une force, il est donc naturel de travailler à force constante. L'extension de la molécule d'ADN est mesurée avec une résolution d'environ 10 nm grâce la figure d'interférence créée autour de la bille.

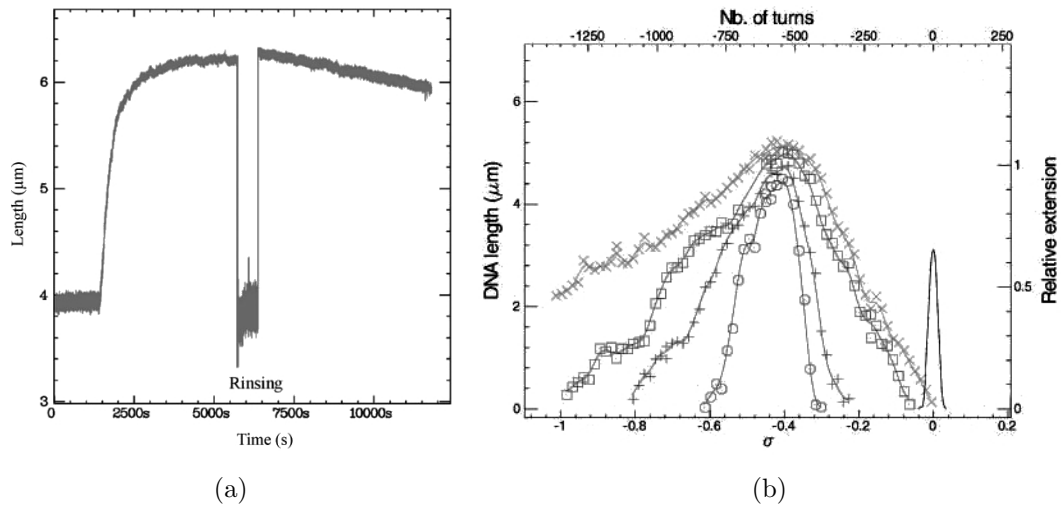


FIGURE I.16 – **Études de RecA/Rad51 en pinces magnétiques** (a) Polymérisation et dépolymérisation de hRad51 sur une molécule d'ADNdb maintenue à 3pN dans un dispositif de pinces magnétiques. La dépolymérisation a lieu après le rinçage des protéines en solution. Tiré de [65]. (b) Extension en fonction du surenroulement pour un filament formé par RecA en présence d'ATP. (\times) : 0,8pN, (\square) : 0,4pN, (+) : 0,2pN et (\circ) : 0,1pN. La ligne continue représente la courbe obtenue pour l'ADN nu à 0,3pN. D'après [66].

Une particule magnétique subit également un couple lorsqu'elle est plongée dans un champ magnétique, dont l'expression est : $\vec{\Gamma} = \vec{M} \otimes \vec{B}$. Dans ce dispositif, le champ magnétique appliqué est horizontal⁸ et suffit à bloquer la direction de l'aimantation magnétique de la bille et donc la bille elle-même. En tournant la paire d'aimant, on tourne d'autant la bille magnétique et la molécule d'ADN. Si celle-ci est attachée par ses deux brins et que ceux-ci sont intacts alors la torsion est accumulée dans la molécule. Mais il suffit d'une cassure simple-brin (entaille ou « nick ») pour que la molécule soit libre en rotation, dans ce cas, on ne peut lui imposer aucune torsion, celle-ci étant immédiatement libérée par l'entaille. Dans le cas d'une molécule d'ADNdb intacte, cela permet d'explorer sa topologie à différentes forces, comme on l'a montré figure I.13(a).

3.3 Expériences avec RecA/Rad51 en pinces magnétiques

Des expériences de pinces magnétiques pour étudier RecA et Rad51 ont été conduites essentiellement par deux équipes, celle de C.Dekker à Delft et celle de J.-L. Viovy à Paris.

8. horizontal : parallèle au plan de la lamelle de microscope

Cinétique de polymérisation et dépolymérisation Cette technique permet de suivre l'extension d'une molécule d'ADN en temps réel et à force constante, c'est une des manières par laquelle la polymérisation de RecA [66, 67] et de Rad51 [65, 68] a été étudiée (figure I.16(a)). Ces expériences permettent de mesurer les cinétiques de polymérisation et de dépolymérisation du filament (mesure des taux d'association et dissociation, vitesse de polymérisation) en fonction de nombreux paramètres. Tout d'abord le substrat peut être de l'ADN simple-brin ou double-brin, ce dernier pouvant être entaillé ou non. Il est également possible d'effectuer la réaction en présence de différents cofacteurs (ATP, ATP γ S, AMP-PNP, calcium, magnésium) et pour différentes forces. On obtient ainsi un faisceau d'informations que l'on peut ensuite essayer d'ajuster par des modèles. Ceci donne lieu actuellement à une discussion à propos de l'élongation du filament nucléoprotéique de Rad51 : a-t-elle lieu par ajout de monomères ou de multimères ? Il semble clair que la nucléation nécessite la coopération d'environ 5 protéines. Concernant la croissance, T. van der Heijden et collaborateurs [68] soutiennent que celle-ci est obtenue par l'ajout de multimères composés d'au moins 4 protéines, basé sur l'ajustement de l'extension de l'ADN en fonction du temps par des simulations Monte-Carlo.

Topologie de l'ADN dans le filament L'autre aspect accessible par cette technique concerne les propriétés mécaniques et la topologie de l'ADN. De la même manière que dans les pinces optiques, on peut obtenir la longueur de persistance de la molécule observée. Mais on peut également obtenir des informations topologiques à partir de l'étude de la longueur d'ADN en fonction du surenroulement imposé. On voit figure I.16(b), quelques-unes de ces courbes obtenues lors de la polymérisation de RecA. Pour référence, la courbe sans marqueur et centrée sur zéro est celle de l'ADN nu. Les autres sont obtenues sur un ADN couvert par RecA à différentes forces (de 0,1 à 0,8pN). On observe que le centre de rotation du filament est décalé vers les surenroulements négatifs : l'ADN est déroulé d'environ 40% dans le filament protéique. L'extension maximale est également modifiée, l'ADN dans le filament est étiré d'un facteur 1,5 par rapport à l'ADN nu. On retrouve les données structurales obtenues précédemment par d'autres techniques mais ici pour un filament unique dont on a contrôlé la polymérisation.

Il faut noter également que cette technique a permis de montrer la sensibilité du filament à l'état de torsion de l'ADN. En effet, pour polymériser un filament RecA sur de l'ADNdb intact, il faut d'abord dérouler la molécule pour favoriser la nucléation. Ensuite, la polymérisation peut être stoppée à cause du surenroulement positif résultant dans la partie d'ADN nu [66, 67]. Enfin, l'ajout de surenroulement positif ou négatif peut engendrer la dépolymérisation partielle du filament [66].

Échange de brins Par ailleurs, la question de l'échange de brins a été abordée dans les pinces magnétiques [69]. Ces expériences suggèrent que plusieurs synapses peuvent exister le long d'une molécule d'environ 10 kb, produisant autant de boucles

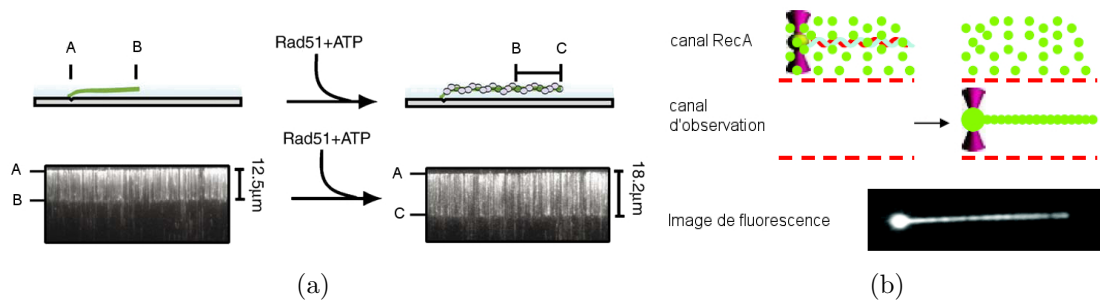


FIGURE I.17 – **Observation de la polymérisation de recombinaise en fluorescence.** (a) Des molécules d'ADN sont attachées à une extrémité à la surface (A) et étirées par un flux. Lors de l'ajout de Rad51 et d'ATP, l'extension de ces molécules augmente passant de B à C. Schéma de principe et image de fluorescence obtenue par Prasad *et al.* en 2006 [70]. (b) Une molécule d'ADN est maintenue par une bille piégée optiquement, elle est étirée par un flux qui délimite deux régions dans la chambre d'observation : l'une contient la protéine RecA et l'autre est utilisée pour l'observation. La protéine est fluorescente, le filament formé est donc observable en microscopie. Expérience réalisée par Galletto *et al.* et publiée en 2006 [71].

D. Il est surtout montré qu'une activité de dépolymérisation a lieu lors de l'échange de brin. Ceci ajouté à l'observation d'une contrainte en torsion sur le troisième brin, est favorable au modèle de redistribution des monomères présenté en section 4 de la partie précédente.

3.4 Techniques de visualisation/microscopie

Il existe aussi d'autres techniques, dans lesquelles on cherche à observer directement la molécule d'ADN et/ou la protéine recombinaise. Nous allons présenter ici quelques expériences de ce type et leurs principaux résultats.

Fluorescence Comme vu plus haut, une molécule d'ADN en solution forme une « pelote entropique », et celle-ci est animée d'un mouvement brownien. Lorsque l'on veut visualiser l'ADN ou une protéine agissant sur l'ADN, la première difficulté tient donc à immobiliser et étirer l'ADN sans interférer avec l'action de la protéine. Une méthode consiste à attacher au moins une extrémité de l'ADN à la surface de la lamelle de microscope. L'ADN peut alors être étiré soit par un flux constant, soit en fixant également la deuxième extrémité. La technique développée par P. Desbiolles consiste à attacher spécifiquement à la lamelle les deux extrémités de la molécule d'ADN ayant été étirée par un flux. Nous reviendrons en détails sur ce travail dans le chapitre II. Dans une autre technique développée par E. Greene, la lamelle est couverte par une bicouche lipidique pouvant lier spécifiquement une extrémité de l'ADN, un flux est ensuite appliqué ayant pour effet d'aligner et d'étirer toutes les molécules d'ADN. Ceci leur permet d'observer directement l'extension d'un grand nombre de molécules d'ADN au cours de la polymérisation de Rad51

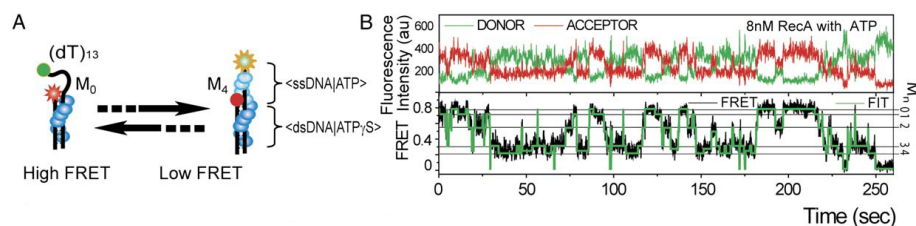


FIGURE I.18 – **Polymérisation de RecA observée en FRET** par Joo *et al.* [73]. (A) Une molécule d'ADNdb est terminée par 13 bases simple-brin, un filament stable est formé sur la partie double-brin. Le donneur est placé à l'extrémité simple-brin et l'accepteur à la jonction entre les deux parties. (B) Intensité de fluorescence et efficacité du FRET au cours du temps. Lorsqu'un monomère de RecA est ajouté au filament, il provoque l'éloignement des deux fluorophores et l'intensité du FRET diminue. Les lignes horizontales M_0 , M_1 , M_2 , M_3 et M_4 représentent cinq niveaux de FRET différents supposés correspondre au nombre de monomères liés sur la partie simple-brin.

[70] (figure I.17(a)). La principale difficulté de ces techniques est due à la proximité de la surface pouvant entraîner un collage non-spécifique des protéines et/ou de l'ADN.

Pour pallier à cette difficulté, on peut éloigner l'ADN de la surface : à l'aide d'une pince optique, on tient une bille couplée à une molécule d'ADN. L'étirement de la molécule s'effectue en imposant un flux [71] ou avec une deuxième bille attachée à l'autre extrémité de la double-hélice. Suivant le design de l'expérience, cette deuxième bille est manipulée par un deuxième piège optique ou à l'aide d'une micropipette [72]. Ainsi, à l'aide d'un piège optique et d'un flux, Galletto et collaborateurs ont observé la polymérisation de RecA [71]. Dans cette expérience, c'est la protéine rendue fluorescente qui est visualisée (figure I.17(b)). Leurs travaux confirment le modèle de nucléation-croissance proposé par Shivashankar *et al.* et permettent de quantifier les taux de nucléation et de croissance. Ils sont capables de dénombrer les noyaux présents sur une molécule d'ADN et d'observer pour la première fois la croissance du filament nucléoprotéique à partir d'un noyau unique. Ces observations leur permettent également de confirmer la coopérativité de 4-5 monomères pour la formation d'un noyau initiateur de la polymérisation.

FRET (Förster Resonance Energy Transfer) Le FRET (Förster Resonance Energy Transfer) est une autre technique de fluorescence qui permet de mesurer des distances entre 1 et 10 nm, sans observer directement d'image. Le principe est de mesurer l'échange d'énergie entre deux molécules fluorescentes. Ce transfert d'énergie entre un fluorophore donneur (Cy3 dans l'exemple suivant) et un fluorophore accepteur (Cy5 dans l'exemple) est possible car l'émission du premier correspond à l'absorption du second, l'efficacité, E , de ce transfert dépend de la distance, r , entre

les deux molécules par :

$$E = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6}, \quad (\text{I.12})$$

avec R_0 la distance de Förster de cette paire de fluorophores.

Cette technique a été récemment utilisée par Joo et collaborateurs [73], pour étudier la dynamique de formation de filaments RecA sur molécule unique d'ADN. La molécule d'ADN est constituée d'une partie double-brin fixée par une extrémité à la lamelle de microscope et d'une partie simple-brin d'une dizaine de bases (voir figure I.18). Le donneur (Cy3) est placé à l'extrémité simple-brin et l'accepteur (Cy5) est placé à la jonction double-brin/simple-brin. Dans l'expérience décrite figure I.18, un filament RecA est formé de manière stable (en présence d'ATP γ S) sur la partie double-brin. L'ajout d'un monomère supplémentaire sur la partie simple-brin entraîne l'éloignement des deux fluorophores et la diminution de l'efficacité du FRET. Cela leur permet de distinguer cinq états de FRET différents qu'ils attribuent à la liaison de 1 à 5 monomères de RecA. Leur observation montre que l'élongation d'un filament RecA sur ADN simple-brin peut avoir lieu par ajout de monomères. Le FRET est pour l'instant la seule technique permettant d'observer la polymérisation de la recombinaison avec la résolution du monomère.

3.5 Limites

On a vu que les expériences de molécule unique sur RecA/Rad51 peuvent se diviser en deux classes. D'une part, celles d'observation, dans lesquelles on voit le « film » de la polymérisation mais où on ne peut pas véritablement agir sur le processus. Et d'autre part, les expériences de pinces qui nous apportent des informations sur les propriétés mécaniques d'un filament ainsi que des données cinétiques sur une molécule unique d'ADN.

Que ce soit dans ces expériences de molécule unique ou dans celles précédemment évoquées dans la partie A, l'état de torsion de l'ADN n'a jamais été mesuré directement et en temps réel lors de la polymérisation. Une mesure globale est donnée par les pinces magnétiques, déroulement d'environ 40%, mais aucune mesure de la torsion induite par une seule protéine n'a été effectuée. Il serait intéressant de mesurer la torsion de l'ADN au cours de la polymérisation, d'une part, pour en avoir une mesure précise et directe. D'autre part pour savoir si cette déformation est induite pas à pas lors de l'ajout de chaque monomère ou si elle résulte plutôt d'un effet global des protéines provoquant une déformation continue au cours de la polymérisation.

On a évoqué dans la partie A, la parenté des protéines RecA/Rad51 avec d'autres protéines telles que des hélicases et la F1-ATPase, leur domaine ATPase étant homologue. Or des études de biophysique en molécule unique ont montré, en particulier,

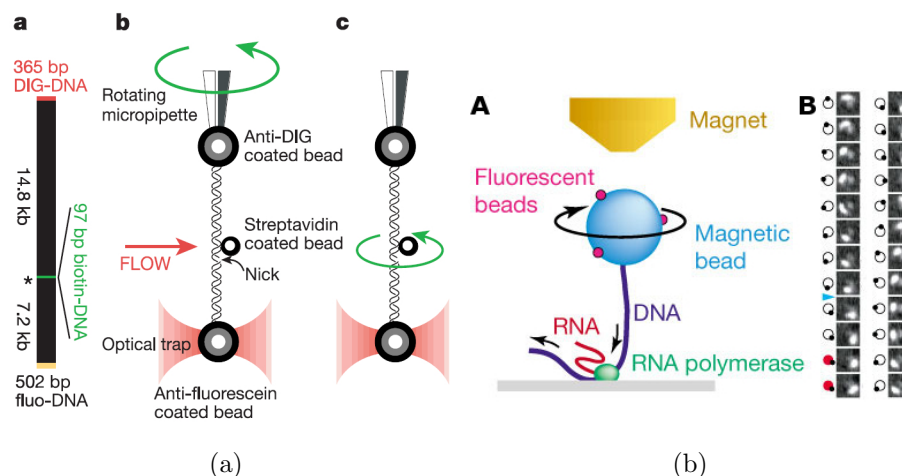


FIGURE I.19 – Mesurer un couple et/ou une torsion sur une molécule unique d’ADN. (a) Schéma illustrant l’expérience réalisée par Bryant et collaborateurs [75]. La molécule d’ADN résulte de la ligation de cinq fragments afin d’obtenir trois sites distincts d’attachement et une entaille à un site spécifique (a). La molécule est étirée entre deux billes attachées l’une à une micropipette et l’autre à un piège optique (b). Une petite bille est attachée à la partie biotinyllée. Elle est maintenue par un flux alors que de la torsion est ajoutée dans l’ADN via la rotation de la micropipette. Lorsque le flux arrêté, la bille tourne pour relâcher la contrainte torsionnelle (c). (b) Schéma illustrant l’expérience réalisée par Harada et collaborateurs [76]. Une molécule d’ADN est liée à une bille magnétique décorée de petites billes fluorescentes (A). Elle interagit avec une enzyme située à la surface. La bille est tirée grâce à un aimant couplé à une pièce conique en fer pour augmenter la force magnétique. L’action de l’enzyme fait tourner l’ADN qui fait tourner la bille. On observe la rotation via les billes fluorescentes (B).

que la F1-ATPase est un moteur rotatif [74]. Il est donc logique de s’interroger sur l’activité moteur de RecA/Rad51.

Pour étudier l’activité moteur de RecA/Rad51, on peut commencer par s’intéresser à la formation du filament nucléoprotéique. En effet, lors de cette étape, la protéine étire et déroule partiellement l’ADN, elle doit donc être capable de produire un couple et une force. Si l’on veut effectuer le même type d’étude que celles vues plus haut sur la kinésine, alors il faut être capable de gêner la polymérisation en appliquant en retour une force et/ou un couple. Etant donné, que la protéine étire l’ADN, il faut alors appliquer une force en compression pour l’empêcher de polymériser. Ceci paraît assez difficile à réaliser et à contrôler. Par contre, on peut imaginer imposer un couple dans le même but. Ceci est en fait accompli dans les pinces magnétiques, mais avec un couple que l’on peut considérer comme infini vu de la protéine. Il faut donc pouvoir appliquer un couple mesuré et le contrôler. Comme on l’a évoqué plus haut, en appliquant un tel couple, on peut espérer sonder les coûts énergétiques des différentes étapes de la recombinaison homologe et ainsi dessiner le paysage énergétique de la réaction.

3.6 Mesurer une torsion et un couple

Il n'existe, à ma connaissance, que deux techniques développées pour mesurer une torsion et/ou un couple. L'une a été conçue dans l'équipe de C. Bustamante, dans laquelle une molécule d'ADN est tenue entre une micropipette et un piège optique [75] (figure I.19(a)). La construction de l'ADN est assez complexe : elle résulte de la ligation de cinq parties différentes afin d'une part de pouvoir coupler l'ADN aux billes et d'autre part d'avoir une entaille sur la molécule qui puisse être marquée par une autre petite bille. De cette manière, lorsqu'un flux est appliqué, la petite bille est maintenue en aval de la molécule d'ADN, on peut alors imposer une torsion en faisant tourner la micropipette. Lorsque le flux est arrêté, le couple stocké dans la molécule d'ADN est relâché entraînant la rotation de la petite bille autour de l'ADN. A faible nombre de Reynolds, le couple visqueux en rotation est déterminé par le produit de la vitesse angulaire du rotor, ω , et de son coefficient de viscosité, γ : $\Gamma = \gamma\omega$. Ils ont ainsi mesuré, pour la première fois directement, l'élasticité en torsion et les couples associés aux transitions structurales de l'ADN, en particulier le couple critique de dénaturation mesuré à 9,6 pN · nm. Ce dispositif a été légèrement modifié, en remplaçant la micropipette et le piège optique par des pinces magnétiques afin de l'appliquer à l'étude d'une enzyme capable de changer la torsion de l'ADNdb, la gyrase. La torsion de l'ADN pendant l'activité de la gyrase a ainsi été mesurée et un couple a été déduit de la vitesse de rotation de la petite bille [77]. La résolution angulaire est de l'ordre de la centaine de degrés.

La deuxième technique, développée dans l'équipe de K. Kinoshita Jr, apparaît plus simple dans sa réalisation (figure I.19(b)). La molécule d'ADN est directement obtenue par *Polymerase Chain Reaction* (PCR) avec une extrémité marquée biotine pour s'attacher spécifiquement à une bille magnétique. L'ADN interagit avec une enzyme déposée à la surface d'une lamelle de microscope. Cette enzyme, la RNA polymérase, est supposée progresser le long de la molécule en suivant son pas hélical. Ceci est observé directement dans cette expérience via la rotation de la bille magnétique. En effet, celle-ci est tirée par un aimant de symétrie cylindrique, couplé à une pointe conique en fer pour en augmenter la force de gradient magnétique. Ainsi le champ magnétique créé et l'aimantation de la bille sont verticaux rendant possible la rotation de la bille autour de l'axe vertical. La rotation angulaire de la bille magnétique est mesurée via la visualisation des billes fluorescentes, ceci avec une résolution angulaire de l'ordre de la centaine de degrés. Encore une fois, un couple est déduit de la vitesse de rotation de la bille magnétique dans un fluide visqueux.

Ces deux expériences sont les premières à observer directement la torsion de l'ADN, en particulier pendant l'action d'une enzyme. Cependant, la résolution semble encore assez limitée pour pouvoir mesurer la torsion induite par une seule recombinaison au cours de la polymérisation. D'autre part, on a vu qu'il peut être intéressant de pouvoir imposer un couple fini pour gêner la polymérisation. Ces deux

Chapitre I. État des connaissances

techniques permettent certes de mesurer un couple, via le couple de frottements visqueux, mais elles ne permettent pas d'en imposer un. On voit ici les limites des techniques existantes et la nécessité de développer, en s'en inspirant, une nouvelle expérience permettant une mesure de torsion plus précise et l'application d'un couple variable et mesuré. Ceci sera l'objet du chapitre 3 de cette thèse.

Chapitre II

Étude de la recherche d'homologie

Avant de pouvoir échanger les brins homologues entre une molécule d'ADN simple-brin et une molécule double-brin homologue, la recombinaise (RecA ou Rad51) forme un filament nucléoprotéique sur le simple-brin. Ce filament doit ensuite « reconnaître » la molécule double-brin homologue parmi d'autres ADN hétérologues, aligner les deux séquences et les appairer. La recherche d'homologie est l'étape la moins connue de la recombinaison homologue, il existe cependant quelques études expérimentales et des modèles dont il a été question dans le premier chapitre (page 19).

Durant ma première année de thèse, nous avons voulu développer une expérience permettant de visualiser un filament nucléoprotéique lors de son approche et de son interaction avec une molécule d'ADN double-brin homologue (cible). L'idée de départ est d'étirer un grand nombre d'ADN cibles à la surface d'une lamelle de microscope puis de les mettre en présence de filaments préparés à partir d'un ADN simple-brin homologue à une partie de l'ADN cible. En marquant les filaments par une sonde visible en microscopie telle qu'un nanocristal fluorescent (ou quantum dot) ou une bille micrométrique, on doit être capable de suivre leur mouvement près de la surface. Si les ADN cibles sont également marqués (par des marqueurs fluorescents : nanocristal ou fluorophore), on peut alors étudier le mouvement relatif d'un filament par rapport à une molécule cible. On espère ainsi être capable de distinguer par exemple un mouvement à une dimension le long de la molécule étirée (diffusif ou directionnel) d'un mouvement diffusif dans les trois dimensions.

A Étirement de l'ADN

Le principe de cette expérience est d'étirer des molécules d'ADN par un flux et de les maintenir dans cette conformation étirée en faisant en sorte qu'elles se lient à la surface par leurs deux extrémités (figure II.1). Nous avons choisi de travailler avec des surfaces recouvertes de streptavidine d'après le protocole de P. Desbiolles (Laboratoire Kastler Brossel, Paris). La molécule d'ADN est préparée de manière à présenter des nucléotides modifiés par de la biotine à ses deux extrémités unique-

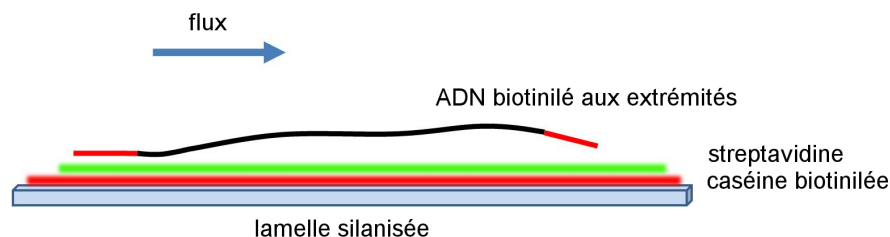


FIGURE II.1 – **Schéma descriptif de l'étirement d'une molécule d'ADN.** La lamelle silanisée est recouverte tout d'abord d'une couche de caséine biotinylée, puis de streptavidine qui se lie à la biotine de la couche précédente. L'ADN comporte à ses extrémités des nucléotides modifiés avec de la biotine, il peut donc s'attacher à la surface. Lorsque la molécule est attachée à un bout, un flux est imposé pour étirer la molécule et qu'elle s'accroche par sa deuxième extrémité en position étirée.

ment. Ainsi elle peut s'attacher à la surface streptavidinée par les extrémités¹, la partie centrale de la molécule étant libre en solution. Le principal avantage de cette technique est qu'une fois l'ADN étiré et attaché à la lamelle des deux côtés, on peut travailler sans flux, l'ADN reste étiré. On pourra donc observer la diffusion libre des filaments nucléoprotéiques puis leur interaction avec l'ADN cible.

1 Préparation de l'ADN

La molécule d'ADN cible doit pouvoir se lier par ses extrémités à la surface couverte de streptavidine. On souhaite également que la majeure partie, centrale, de la molécule n'interagisse pas avec la surface afin d'être complètement disponible pour réagir avec le filament nucléoprotéique. Pour préparer cet ADN, on utilise un protocole développé dans l'équipe pour étudier des molécules uniques d'ADN dans les pinces magnétiques. Dans ce cas la molécule doit être marquée par de la biotine à un bout et par de la digoxigénine à l'autre². Ce protocole est donc modifié pour marquer la molécule par de la biotine des deux côtés. Ce protocole est décrit brièvement ici, mais il est détaillé dans les annexes (p. 127).

La molécule finale est le résultat de la ligation entre trois fragments d'ADN (voir figure II.2) :

- un grand fragment central non marqué (14 434pb)
- deux fragments plus courts (environ 800pb), marqués avec de la biotine.

Ces fragments d'ADN sont tous obtenus par Polymerase Chain Reaction (PCR), c'est-à-dire qu'ils sont amplifiés au cours de cycles thermiques à l'aide d'une enzyme

1. la biotine est la vitamine H, elle se lie à l'avidine et ses dérivés (streptavidine, extravidine, neutravidine...), leur énergie de liaison est légèrement inférieure à celle d'une liaison covalente.

2. c'est la construction que nous avons utilisée pour les expériences décrites dans les chapitres III et IV.

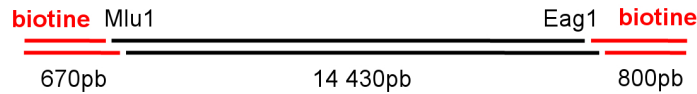


FIGURE II.2 – **Schéma de la construction d'ADN utilisée.** Trois fragments d'ADN sont obtenus par PCR, dont deux avec des nucléotides marqués avec de la biotine. Ces deux courts fragments sont liés à chaque extrémité du fragment plus long à l'aide d'enzymes de restriction (Mlu1 et Eag1) et de ligation.

polymérase thermorésistante. Lors de l'amplification des deux fragments courts, des nucléotides marqués avec de la biotine sont incorporés (dUTP-biotine); ainsi, le produit de l'amplification comporte une fraction de ses bases marquée avec de la biotine. A l'issue des PCR, on obtient trois molécules d'ADN différentes que l'on souhaite coller bout à bout. Pour cela, on utilise des enzymes de restriction (Eag1 et Mlu1) qui découpent l'ADN à des sites particuliers (séquence reconnue par Eag1 : CGGCCG, séquence reconnue par Mlu1 :ACGCGT) en laissant quatre bases simple-brin. Ainsi les extrémités coupées par Eag1 (de même pour Mlu1) se reconnaissent. En coupant une extrémité du long fragment avec Eag1 et un des deux courts fragments par la même enzyme, ceux-ci se reconnaissent et peuvent être liés avec une enzyme de ligation (T4 DNA ligase). De même on coupe l'autre côté du long fragment et le deuxième fragment court avec Mlu1. Après ligation, on obtient finalement la molécule d'ADN décrite schématiquement sur la figure II.2.

Difficultés Dans la réalité, on arrive bien à produire les ADN par PCR, y compris avec les nucléotides modifiés. Le découpage par les enzymes de restriction fonctionne bien également. Par contre, en ce qui concerne l'étape de ligation, les résultats sont plus mitigés. On a plusieurs difficultés. La première est que la séquence de bases laissées simple-brin par les enzymes de restriction, et servant à la reconnaissance spécifique de deux sites coupés par la même enzyme, est palindromique. Ainsi par exemple, deux molécules du grand fragment peuvent se lier et former un dimère. Il en est de même pour les deux fragments courts.

La première difficulté vient donc de la formation de ces dimères, la seconde vient du fait qu'il faut lier trois molécules ensemble. Si une molécule de grand fragment n'est liée qu'à un seul petit fragment marqué, l'ADN final ne pourra pas se lier par ses deux extrémités à la lamelle. Pour favoriser la liaison de deux petits fragments pour chaque molécule de long fragment, ils sont mis en excès par rapport au fragment long, sachant que l'on peut éliminer par la suite les dimères de fragments courts par purification.

Au final on obtient une minorité de molécules telles que celle décrite sur la figure II.2 comme on le verra sur la figure II.4, commentée au paragraphe 3. Ceci est particulièrement gênant dans notre expérience car nous visualisons la totalité des

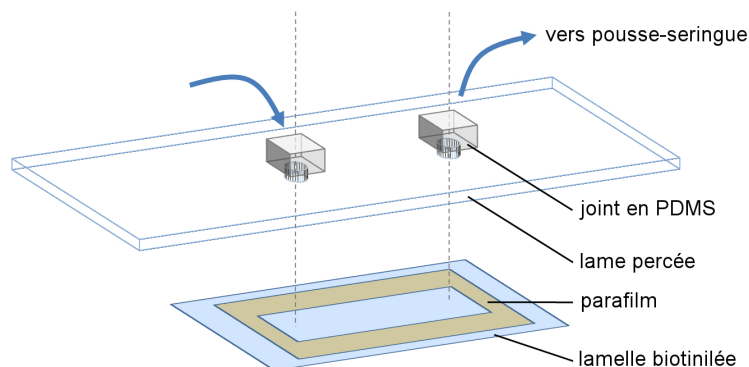


FIGURE II.3 – **Schéma descriptif de la chambre à flux utilisée.** Le canal est le résultat de l'empilement de la lamelle couverte de biotine, d'une feuille de parafilm évidée d'une forme rectangulaire en son centre et d'une lame de microscope percée de deux trous. Les connexions sont assurées par des blocs de PDMS collés à la lame et faisant office de joints.

molécules ayant au moins une extrémité marquée par la biotine.

2 Préparation des surfaces streptavidine

Pour la préparation des lamelles recouvertes de streptavidine, nous avons collaboré avec Pierre Desbiolles du laboratoire Kastler Brossel (Paris) qui avait déjà élaboré un protocole permettant d'étirer des molécules d'ADN doublement marquées biotine sur une surface streptavidine.

La streptavidine perd sa fonction si elle déposée directement sur une surface, l'idée est donc de la lier à une surface biotinilée. Comme la streptavidine comprend quatre sites de liaison à la biotine, il reste ainsi des sites libres pour fixer la molécule d'ADN. Afin d'adsorber efficacement la biotine à la lamelle de microscope, elle est ainsi d'abord liée de manière covalente à de la caséine. La caséine est une protéine du lait qui est souvent utilisée pour recouvrir, ou passiver, une surface car elle se fixe assez facilement de manière non-spécifique. La caséine biotinilée est obtenue en faisant réagir les fonctions amines naturellement présentes dans la caséine avec une biotine modifiée présentant une fonction NHS (N-hydroxy-succinimide). La caséine ainsi biotinilée est ensuite mise en contact avec une lamelle préalablement silanisée (protocole détaillé de la préparation des surfaces streptavidine en annexe D). On peut conserver ces lamelles biotinilées pendant plusieurs jours dans une boîte hermétiquement fermée à 4°C.

Au début de l'expérience d'étirement d'ADN, on prend une lamelle biotinilée que l'on fixe à une lame de microscope percée de deux trous afin de pouvoir imposer un flux dans le canal ainsi créé (voir figure II.3). Le flux est créé et contrôlé par un pousse-seringue. Pour éviter les contaminations, le pousse-seringue fonctionne en aspiration. La lamelle est tout d'abord rincée avec une solution tampon, puis on

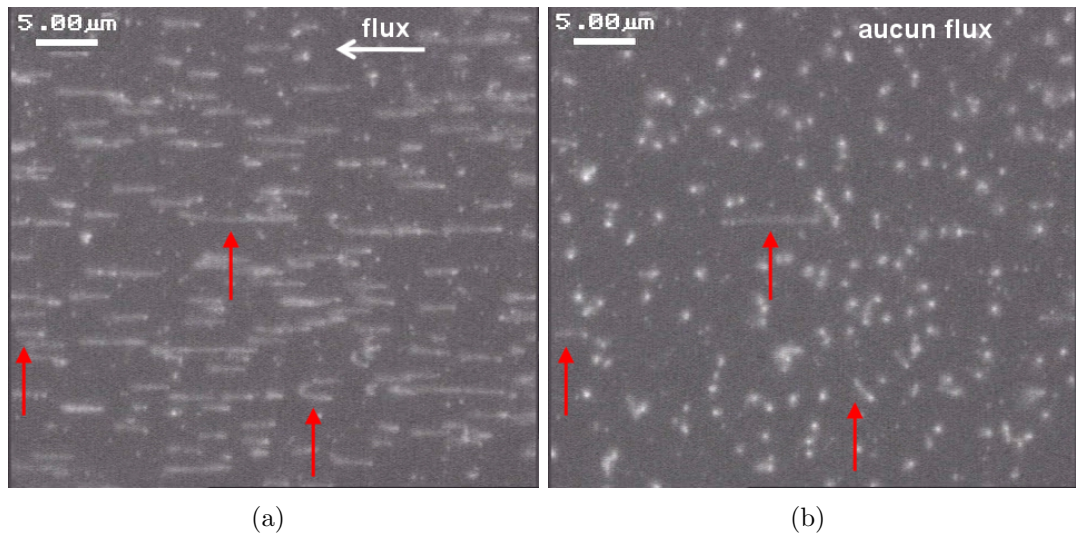


FIGURE II.4 – **Images en fluorescence de l'ADN cible étiré à la surface, en présence (a) et en absence (b) de flux.** (a) Tous les ADN sont étirés par le flux. On remarque un ADN étiré en U car ses deux extrémités se sont attachées côté à côté (flèche du bas). (b) Lorsque l'on arrête le flux, la plupart des molécules forment une pelote, ce sont les taches diffuses sur l'image. Deux molécules restent étirées en pont, elles sont marquées par les flèches.

injecte de la streptavidine à une concentration 0,2 mg/mL dans le même tampon. On laisse incuber environ dix minutes avant de rincer à nouveau. La surface est maintenant couverte de streptavidine et est prête à recevoir l'ADN à étirer.

3 Observations

Ensuite on injecte la solution d'ADN, celle-ci est laissée incuber pendant 10 à 15 minutes afin qu'un maximum de molécules soient attachées à la surface. Le canal est ensuite rincé avec un flux important (100 – 500 μL/min) pour étirer les molécules d'ADN [78]. Une méthode simple pour visualiser ces molécules d'ADNdb consiste à les mettre en présence de YOYO ou de SYBR. Ces deux intercalants de l'ADN deviennent fluorescents lorsqu'ils se lient à de l'ADNdb et révèlent ainsi les molécules. L'observation en présence d'un flux montre un tapis d'ADN étiré dont les fluctuations dépendent de la vitesse du flux (voir figure II.4). On trouve par endroit une molécule d'ADN en U qui résulte de l'attachement proche des deux extrémités de l'ADN lors de l'incubation (flèche du bas). L'observation en flux permet également d'estimer la longueur des molécules. En particulier, on note des ADN de taille double correspondant donc à un dimère du fragment long lié à un ou deux fragments courts.

L'observation sans flux d'un canal typique à ce stade de l'expérience montre essentiellement deux populations de molécules d'ADN : les unes en « pelote », qui ne sont attachées que d'un côté à la lamelle ; d'autres « en pont », étirées et attachées

des deux côtés (voir figure II.4, flèches rouges). Ces ADN en pont sont rares : on en observe en moyenne moins de 1 par champ de vision ($40\ \mu\text{m} \times 40\ \mu\text{m}$). C'est beaucoup moins que ce que nous envisagions au début : le but était de pouvoir faire un « tapis » d'ADN en pont à la surface (au moins de l'ordre de 100 ADN par champ de vision) pour être capable d'observer plusieurs évènements de recherche d'homologie en parallèle. Ce mauvais rendement vient très probablement de la préparation de ces molécules d'ADN, une majorité d'entre elles ne présentant qu'une seule extrémité biotinilée.

B Préparation des filaments nucléoprotéiques

Malgré la faible proportion d'ADN étirés en pont à la surface, nous avons tout de même tenté l'expérience complète en mettant les ADN étirés en présence de filaments nucléoprotéiques homologues à la partie centrale de l'ADN étiré. Nous décrivons ici le principe des expériences réalisées, les protocoles détaillés de la préparation des filaments sont décrits en annexe, page 133.

1 Préparation de l'ADN simple-brin

La première étape consiste à produire des molécules d'ADN simple-brin qui serviront de substrat à la polymérisation de RecA. L'ADN est produit par PCR et est long de 3,5 kb (voir annexes p.131). Il est amplifié à partir de l'ADN du phage lambda avec des amorces modifiées l'une par la biotine et l'autre par la digoxygénine. Le produit de la PCR présente donc une biotine d'un côté et une digoxygénine de l'autre³. Afin d'éviter que les deux brins de la molécule ne se réappariant dans la suite, il faut les séparer et n'en garder qu'un seul. Pour cela, après avoir dénaturé⁴ l'ADN une minute à 94°C , on le fait réagir avec des billes magnétiques couvertes d'anticorps anti-digoxygénine (protocole de préparation des billes anti-digoxygénine page 135). Les billes sont séparées de la solution à l'aide d'un aimant, on ne garde ainsi que l'ADN simple-brin marqué par la biotine.

2 Formation du filament nucléoprotéique

L'ADN simple-brin obtenu est mis à réagir avec RecA à 37°C pendant 5 minutes en présence de magnésium, d'ATP et de SSB⁵ dans la solution tampon adéquate.

3. Cette méthode de marquage n'était pas envisageable pour produire l'ADN étiré à la surface, car le collage aurait été insuffisant. C'est pourquoi un grand nombre de biotines ont été introduites dans les deux fragments courts lors de la préparation de cette construction.

4. dénaturation : séparation des deux brins d'ADN, ceci est obtenu en chauffant à plus de 90°C .

5. Single Strand Binding protein (SSB) : cette protéine se lie à l'ADN simple-brin et le stabilise en empêchant la formation de structures secondaires.

B. Préparation des filaments nucléoprotéiques

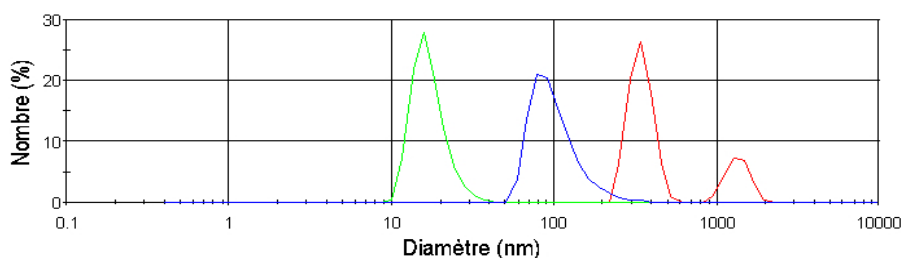


FIGURE II.5 – **Mesure du diamètre des particules au Zetasizer.** Rouge : Echantillon initial de nanocristaux. Vert : Echantillon de nanocristaux après sonication. Bleu : Echantillon obtenu après l’incubation des nanocristaux avec l’ADN.

Une stoechiométrie de 4 bases d’ADN pour 1 protéine RecA est respectée. L’hydrolyse de l’ATP étant assez rapide pour RecA et liée à la dépolymérisation du filament, il faut rajouter un stock d’ATP à la fin de la réaction pour entretenir la polymérisation. Les filaments peuvent également être formés en présence d’ATP γ S, dans ce cas les filaments formés initialement sont stables et ne peuvent pas (ou très peu) dépolymériser.

3 Marquage des filaments

Le but de l’expérience est de visualiser les filaments formés par RecA lors de leur recherche d’homologie sur les ADN étirés à la surface. Pour voir les filaments il faut les marquer avec une sonde visible, nous avons pour cela essayé deux marqueurs : des billes micrométriques et des nanocristaux (quantum dots).

3.1 Marquage par bille

Le marquage par une bille micrométrique en latex couverte de streptavidine (commerciale) s’est avéré assez facile (protocole p.136). Le protocole de conjugaison a d’abord été testé sur de l’ADN simple-brin n’ayant pas réagi avec RecA. L’efficacité a ainsi pu être estimée en mesurant la concentration en ADN simple-brin dans le surnageant après avoir sédimenté les billes. Cette concentration d’ADNsb était inférieure à la concentration minimale mesurable par le Nanodrop⁶. Les observations décrites dans la partie suivante ont été réalisées avec des filaments nucléoprotéiques marqués par ces billes micrométriques.

3.2 Marquage par nanocristaux

Nous avons également tenté de marquer les filaments (ou les ADN cibles) avec des nanocristaux couverts de streptavidine, l’avantage étant la faible taille de ces

⁶. Nanodrop : appareil qui permet de mesurer l’absorbance d’un échantillon à partir d’une goutte de 1 à 2 μ L.

Chapitre II. Étude de la recherche d'homologie

objets : 20 nm contre 490 nm pour les billes en latex. On espère ainsi moins gêner stériquement l'interaction entre le filament et l'ADN cible attaché à la surface. Ils sont de plus très lumineux, et un seul nanocrystal peut facilement être visualisé en microscopie de fluorescence. Nous avons essayé de mettre au point un protocole de conjugaison de l'ADN avec les nanocristaux. Les échantillons pris à différents stades du protocole ont été analysés par le Zetasizer⁷. La figure II.5 montre la distribution des diamètres des particules. Tout d'abord, nous avons observé que la taille apparente des nanocristaux est de quelques centaines de nanomètres (courbe rouge), ce qui indique qu'ils ont tendance à s'agréger. Après quelques secondes en présence d'ultra-sons, la distribution de leur taille se déplace aux alentours de 10 – 20 nm (courbe verte). On montre ainsi qu'il faut absolument soniquer l'échantillon initial de nanocristaux pour les désagréger. Après incubation avec l'ADN, la taille moyenne est déplacée vers environ 95 nm (courbe bleue). De plus, le potentiel de surface varie de $-7,1 \pm 0,5$ mV à $-13,8 \pm 3$ mV ; il devient plus négatif ce qui est compatible avec le greffage d'ADN, polymère négativement chargé. On est donc capable de conjuguer l'ADN aux nanocristaux. Ces expériences ont cependant été abandonnées pour deux raisons principales.

La première difficulté vient lorsque l'on injecte une solution d'ADN cible marqué par des nanocristaux dans le canal : on observe alors que la surface se couvre de nanocristaux de manière homogène, sans colocalisation spécifique avec l'ADN. On a donc un problème d'interaction de la surface de la lamelle avec les nanocristaux. On a tenté de diminuer ce problème en passivant la surface avec de l'albumine de sérum bovin (BSA), ce qui a donné des résultats encourageants. L'interaction des nanocristaux avec la surface pourrait également être spécifique car il y a de la biotine à la surface sous la couche de streptavidine. Ceci ne pose pas de problème avec les billes streptavidine, mais les nanocristaux étant beaucoup plus petits, ils peuvent certainement se glisser plus facilement dans une zone où la couche de streptavidine n'est pas homogène. une solution envisageable consisterait à passiver la fonction streptavidine des nanocristaux avec de la biocytine (forme soluble de la biotine, liée à une lysine).

Le second problème est lié à la stratégie de marquage. En effet, on peut s'interroger sur la gêne occasionnée par la liaison d'une bille ou d'un nanocrystal à une extrémité du filament. L'échange de brin opéré par RecA est directionnel de 5' vers 3' relativement au simple-brin [27, 28, 29], les détails moléculaires restant mal connus. Ainsi, il est probable que l'extrémité 5' du filament soit nécessaire pour initier l'échange de brin. Il en résulte que le marquage en 5' du filament par une bille ou un nanocrystal pourrait empêcher ou gêner la recherche d'homologie. Il reste envisageable de marquer les filaments par l'extrémité 3' et de tester comparativement les deux marquages.

7. Zetasizer : appareil de mesure de la taille des objets en solution et du potentiel zeta à leur surface

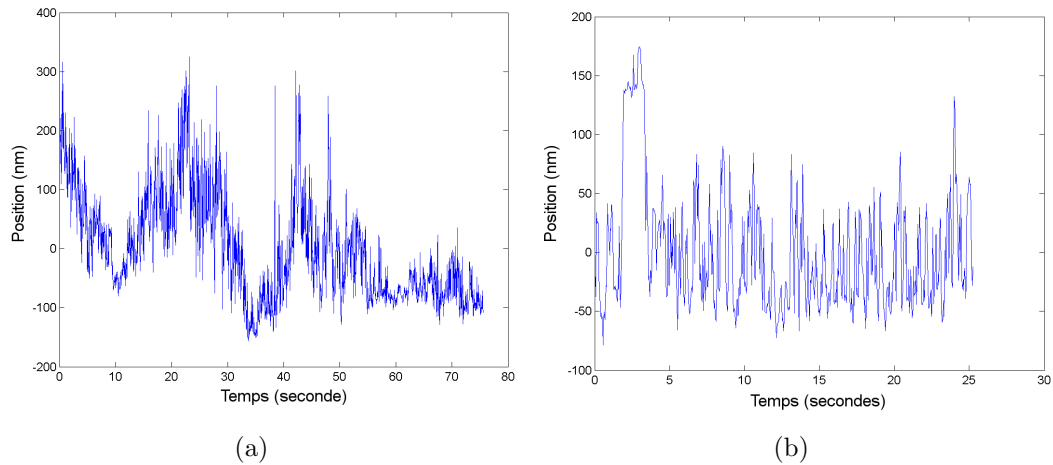


FIGURE II.6 – **Traces de billes en présence d’ADN cible à la surface.** (a) La bille est liée à un filament de RecA. On observe des aller-retours d’environ 250 nm avant que la bille ne s’arrête. (b) Contrôle sans RecA : la bille est liée à un ADNsb avec SSB. La bille montre un mouvement brownien d’amplitude environ 50 nm autour d’une position moyenne stable.

C Observations

1 Mouvement des filaments

L’expérience complète a été réalisée plusieurs fois. Après avoir étiré des ADN cibles à la surface, des filaments RecA marqués par des billes en latex (diamètre 490 nm) ont été injectés. La concentration de billes+filaments est assez faible, de même que la densité d’ADN cibles à la surface. Afin d’augmenter les chances d’assister à un évènement d’interaction entre ces deux partenaires, l’observation a lieu en présence d’un léger flux (vitesse des billes : $\sim 10 \mu\text{m/s}$). On voit donc des billes rouler sur la surface. Certaines billes se fixent à la surface et restent ensuite complètement immobiles. D’autres, par contre, montrent un mouvement confiné autour d’un point de la surface. On peut voir figure II.6(a) la trace selon la direction du flux d’une de ces billes. Elle révèle que la bille a fait des aller-retours d’environ 250 nm (entre $t=0$ et $t=50$ secondes), avant de s’immobiliser. Le fait que la bille ait pu aller contre le flux sur environ 250 nm peut être intéressant.

Contrôle Afin de déterminer si cette trajectoire observée peut être due à l’activité de RecA, nous avons refait la même expérience sans RecA. On montre figure II.6(b) la trace d’une bille ayant présenté un mouvement autour d’un point de la surface. Cette trace n’a pas du tout la même allure que la précédente. Hormis un saut de 150 nm très brutal que l’on attribue à un choc extérieur, la bille présente un mouvement brownien d’amplitude environ 50 nm autour d’une position moyenne stable.

L’expérience de contrôle où les filaments marqués sont injectés sur une surface

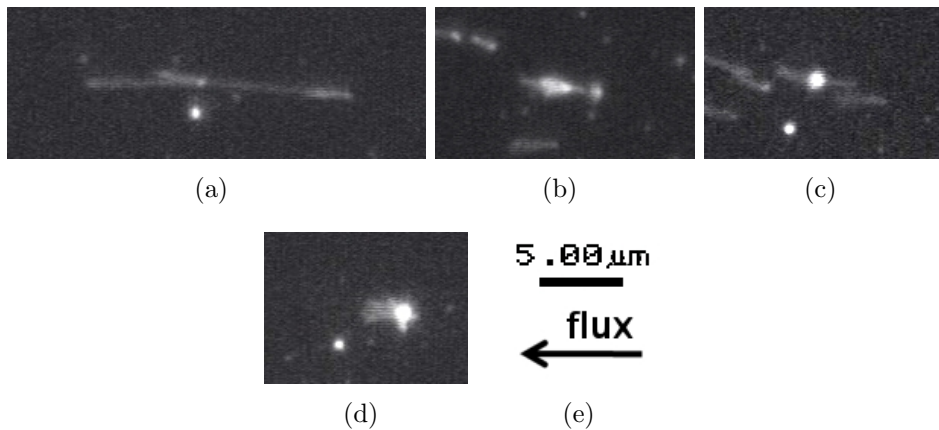


FIGURE II.7 – Exemples de configurations d'ADN observées.

où aucun ADN cible n'a été déposé aurait également dû être menée, mais le manque de temps nous en a empêchés.

Interprétation et problèmes Il semble que le mouvement observé sur la figure II.6(a), comme sur quelques autres billes dans les mêmes conditions, soit dépendant de RecA. Cependant nous manquons de preuves pour conclure que nous avons observé le processus de reconnaissance d'homologie. En particulier, l'expérience a lieu en présence d'un léger flux. Or dans le contrôle, la bille choisie a une position moyenne fixe, elle doit être donc être liée à la surface. La trace observée dans le contrôle est finalement assez proche de celle observée lors de l'expérience avec RecA entre les temps 55 et 75 s (figures II.6(a) et II.6(b)). Etant donné le faible nombre de billes observées, il se peut que l'on ait manqué la première phase du mouvement (grands aller-retours d'environ 250 nm) lors du contrôle. Néanmoins nous avons observé un mouvement qui n'est pas purement du mouvement brownien et qui ne semble pas non plus être le seul résultat du flux. Afin de discriminer ce résultat d'un artefact, il faudrait être capable de refaire la même expérience et de vérifier si la bille intéressante était au voisinage d'un ADN cible, ce qui n'a pas pu être fait dans le cas précédent.

On s'aperçoit ici que ces expériences sont très difficiles à interpréter. Il nous manque particulièrement de la statistique sur des expériences davantage reproductibles. De plus, un meilleur contrôle de la force (ici due au flux) permettrait d'influer sur le système et d'étudier la dépendance de ce paramètre.

2 Observations *a posteriori*

Dans le but de visualiser les ADN cibles et de comparer leur position à celle des billes liées aux filaments RecA, nous avons observé la surface en fluorescence après

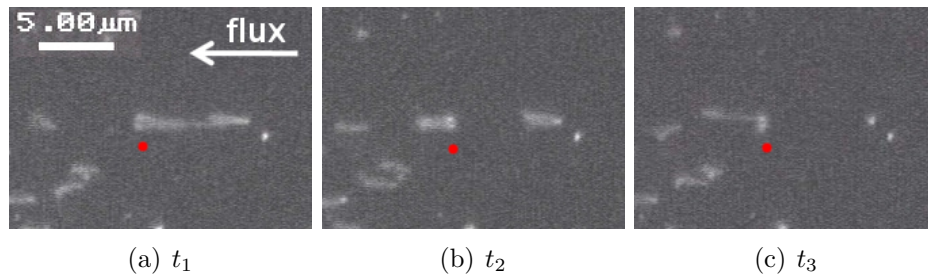


FIGURE II.8 – **Séquence d’images d’une molécule d’ADN à la structure complexe.** Cette molécule est attachée à la surface par trois extrémités! En flux, on observe tout d’abord l’ADN fluctuer (a), puis l’ADN est cassé aux environs de son milieu (b). Une partie de l’ADN est alors rabatue en U par le flux. Puis elle est à nouveau cassée, on voit alors une seule molécule étirée par le flux (c).

avoir injecté un fluorophore marquant l’ADN (YOYO). Cette première observation ayant montré des formes d’ADN différentes de celui initialement étiré, l’expérience a été renouvelée après l’injection de filaments libres (non marqués par des billes).

Avant l’injection des filaments, on observe uniquement des ADN étirés par le flux de taille normale (et quelques dimères). Après avoir laissé incubé quelques minutes les filaments dans la solution tampon appropriée (riche en magnésium), on rince par une solution tampon sans magnésium car celui-ci empêche la fixation du fluorophore sur l’ADN. On observe les molécules d’ADN dans un grand nombre de configurations différentes (voir figure II.7). Tout d’abord, on trouve des molécules d’ADN bien plus longues que l’ADN cible initial (même plus long que les dimères). L’ADN initial a une longueur légèrement inférieure à $4\ \mu\text{m}$. On peut voir sur la figure II.7(a), une molécule d’ADN étirée par le flux, de longueur environ $15\ \mu\text{m}$. On voit également qu’un ADN plus court (environ $2,5\ \mu\text{m}$) a son point d’attache sur la longue molécule⁸! Un autre ADN court semble être attaché au même endroit que la longue molécule (extrémité droite de la longue molécule, le flux va de droite à gauche sur ces images). La figure II.7(b) montre également une molécule d’ADN sur laquelle sont fixés d’autres morceaux d’ADN plus courts. De plus on a observé des « boules lumineuses ». La figure II.7(c) montre une de ces « boules » fixée au milieu d’une molécule d’ADN étirée par le flux. Alors que la figure II.7(d) montre une « boule » de laquelle on voit s’étirer de courts fragments d’ADN. Ces quatre images représentent bien la zoologie des formes d’ADN observées.

La figure II.8 présente une séquence d’images dans laquelle on peut voir une structure d’ADN complexe. Sur la première image, on voit une longue molécule d’ADN

8. L’image II.7(a) est ambiguë, le petit ADN pouvant aussi bien être attaché à la surface. L’observation de la vidéo lève toute ambiguïté car le point d’ancrage suit les fluctuations de la grande molécule.

étirée par le flux. Il semble y avoir deux points d'attache différents à l'extrémité gauche, tandis qu'une molécule plus courte semble être attaché au même point que l'extrémité droite de la grande molécule. L'observation de l'ADN entraîne du photoblanchiment qui provoque des cassures dans la molécule d'ADN. Une telle cassure s'est produite aux alentours du milieu de la grande molécule entre les images (a) et (b). La partie de gauche a donc basculé de l'autre côté de son point d'attache, étirée par le flux en forme de U. Une deuxième cassure intervient avant l'image (c) aux alentours d'un des deux points d'attache. Il en résulte que l'ADN en U se trouve complètement étiré par le flux, doublant la longueur observée. En résumé, cette molécule d'ADN montre une structure en Y, avec trois extrémités.

Contrôles Des expériences de contrôle ont été effectuées afin de déterminer si toutes ces formes étranges d'ADN sont dues à l'activité de RecA :

- la même expérience sans RecA montre des « boules » se fixer sur les ADN étirés, mais aucun ADN plus long que la molécule initiale n'est observé.
- l'expérience avec RecA mais sans SSB montre des ADN plus longs qu'initialement et des « boules » d'où partent des fragments d'ADN
- en l'absence d'ADN cible à la surface, on observe uniquement quelques « boules lumineuses » posées à la surface.

D'autre part, une solution d'ADN du phage lambda, non marqué par de la biotine, a été incubé dans un canal typique de l'expérience en présence de la solution tampon utilisée pour la recherche d'homologie. On observe alors des ADN se fixer à la surface par une de leurs extrémités ou par un point situé à l'intérieur de la molécule (certainement un site de cassure simple-brin). On suppose que cette fixation est permise par la concentration élevée en ions magnésium (Mg^{2+}) dans la solution tampon.

D Interprétation

Au vu des observations réalisées et des contrôles, il semble que ce que nous appelions des « boules lumineuses » soient des agrégats d'ADNsb et des protéines RecA et SSB. Ces agrégats peuvent se fixer sur une molécule d'ADN cible en l'absence de RecA, mais la présence de RecA est indispensable pour provoquer des « réarrangements » entre les molécules d'ADN et notamment ces structures d'ADN ramifiés. Il y a donc eu dans cette expérience, une activité de recombinaison due à RecA.

On remarque que les ADN, même non marqués, se fixent parfois à la surface de manière non spécifique, tout comme les nanocristaux. Ces observations suggèrent qu'il faudrait éloigner l'ADN de la surface pour minimiser les interactions non spécifiques.

De plus, on a vu que le protocole de préparation de l'ADN cible n'a pour l'instant pas permis d'obtenir des échantillons satisfaisants (majorité d'ADN marqués d'un côté uniquement). Plusieurs pistes peuvent être envisagées pour améliorer cette

partie de l'expérience, par exemple il est possible d'obtenir de meilleurs rendements lors de la ligation en utilisant la recombinaise RecA. En effet, celle-ci apparie efficacement les deux extrémités simple-brin issues de la digestion enzymatique alors que dans le protocole actuel on se contente d'attendre que les extrémités se rencontrent grâce au mouvement brownien. On peut également envisager de purifier la « bonne molécule » à partir d'un gel d'électrophorèse, ceci nécessite une électrophorèse en champ pulsé pour bien séparer les différentes populations d'ADN.

E Éloigner l'ADN de la surface

On a vu qu'un des problèmes majeurs de cette expérience vient de la proximité de la surface, associé au besoin d'utiliser une solution tampon riche en ions magnésium. Grâce à l'expertise de notre équipe en micro-fabrication, et en particulier avec l'aide d'Antoine-Emmanuel Saliba, j'ai essayé d'insérer un espacement entre l'ADN et la surface.

Dans le passé, l'idée de suspendre les molécules d'ADN en ponts (suspendus, cette fois) avait déjà été évoquée. Une collaboration avec un laboratoire spécialisé dans la nano-fabrication (C. Dekker, Université de Delft) avait été démarrée afin d'obtenir des nano-structures en créneaux sur lesquelles l'ADN pourrait être suspendu. A partir de cette idée, j'ai simplifié la construction en utilisant des billes couvertes de streptavidine comme espaceur. L'idée est d'aligner ces billes en lignes de taille et d'espacement contrôlés grâce à la technique de *micro-contact printing* (micro-tampon).

1 Principe

Le principe de cette expérience est décrit schématiquement sur la figure II.9. Un micro-tampon en PDMS (Polydiméthylsiloxane)⁹ est obtenu en moulant le polymère liquide sur un modèle en silicium. Après cuisson, le PDMS est solide et conserve la forme donnée par le moule. On se sert ensuite de ce micro-tampon en PDMS exactement comme d'un tampon macroscopique, l'encre étant remplacée ici par une solution de caséine biotinilée. On en dépose une goutte sur le tampon que l'on laisse incuber quelques minutes. Après rinçage et séchage du tampon pour obtenir un motif bien net, on tamponne une lamelle de verre silanisée. Ceci a pour effet de déposer à la surface de la caséine biotinilée uniquement selon le motif du tampon. On obtient donc une lamelle fonctionnalisée avec de la caséine biotinilée comme dans l'expérience précédente, sauf que le dépôt n'est pas réalisé sur toute la surface mais seulement suivant le motif choisi.

9. PDMS : Polymère siliconé largement utilisé dans la fabrication de circuits micro-fluidiques.

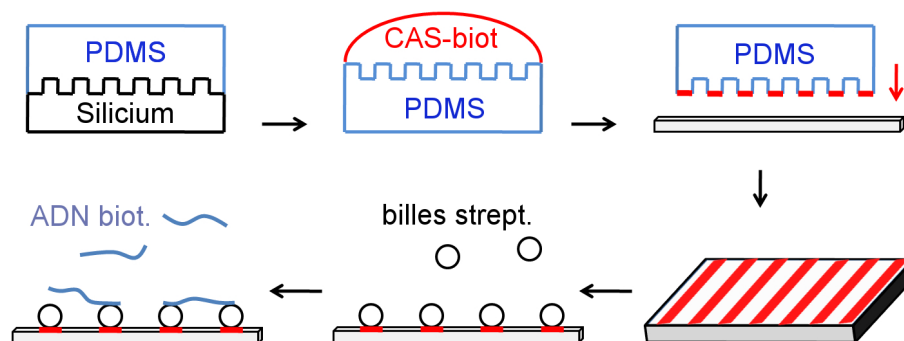


FIGURE II.9 – Schéma de principe pour créer un motif en relief par la mise en place d'un réseau organisé de billes. Grâce à un modèle original en silicium, un tampon en PDMS au relief voulu est créé. Ce tampon est mis en présence de caséine biotinylée puis séché. Comme le PDMS est un matériau poreux, on peut ensuite très facilement imprimer le motif de caséine biotinylée sur une lamelle de verre silanisée. Ceci permet à des billes couvertes de streptavidine de se fixer à la surface suivant le motif imprimé. On peut ensuite injecter de l'ADN biotinylé qui pourra être étiré entre deux billes par un flux. L'ADN en pont est ainsi éloigné de la surface de la hauteur de la bille.

On incube ensuite une solution de billes couvertes de streptavidine. Ces billes en allant se déposer spécifiquement sur les lignes tamponnées vont mettre en relief le motif dessiné. De plus, le motif en relief obtenu est déjà fonctionnalisé par la streptavidine, il n'y a besoin d'aucune modification chimique supplémentaire. Une solution d'ADN biotinylé peut finalement être injectée dans le canal pour être étiré en pont suspendu entre deux rangées de billes.

Cette technique nécessite une étape de micro-lithographie pour créer le modèle original en silicium. Mais une fois ce modèle réalisé, on peut produire un grand nombre de micro-tampons en PDMS qui eux-mêmes peuvent être utilisés plusieurs fois. Un autre avantage est que la hauteur des créneaux peut être modifiée sans avoir besoin de refaire une lithographie. Il suffit pour cela de changer le diamètre des billes streptavidine. De plus, l'ADN cible ne peut s'attacher spécifiquement que sur le relief et non pas entre les lignes de billes. On a donc un relief micrométrique ajustable présentant une fonctionnalisation différente de celle de la surface.

2 Mise en oeuvre du réseau de billes

2.1 Motif modèle

Le but étant d'étirer des molécules d'ADN par un flux, le motif choisi est composé de lignes parallèles. Ces lignes seront placées perpendiculairement au flux, et la distance entre chaque ligne est choisie pour qu'un ADN attaché sur une ligne puisse s'étirer et s'attacher sur la ligne suivante. Les expériences précédentes nous apprennent la longueur de nos molécules d'ADN dans nos conditions expérimentales,

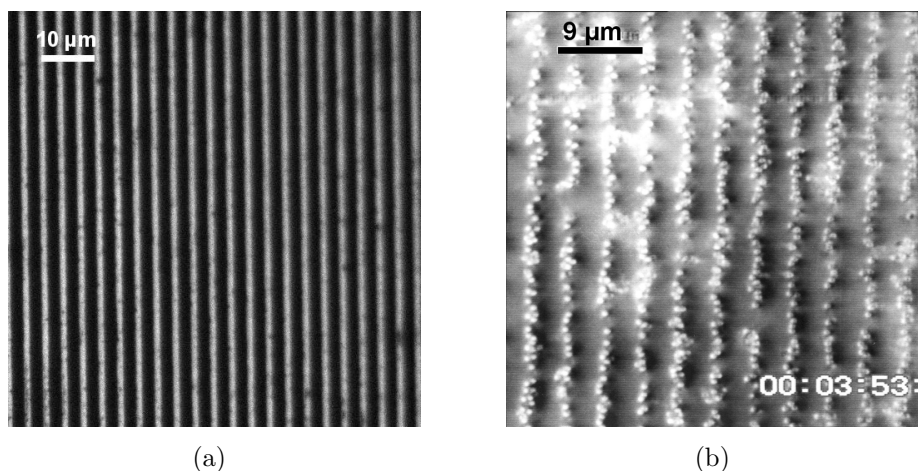


FIGURE II.10 – **Images en fluorescence de l’empreinte du tampon (a) et du réseau de billes obtenu (b).** (a) Empreinte de caséine fluorescente (FITC) obtenu avec un timbre imprimant des lignes de $1\ \mu\text{m}$ séparées par lignes « noires » de $2,5\ \mu\text{m}$. (b) Réseau de billes streptavidines de $490\ \text{nm}$ de diamètre obtenu sur une impression de lignes de $1\ \mu\text{m}$ espacées de $3\ \mu\text{m}$. Expériences réalisées par Sabri Karra au cours de son stage de Master 1.

soit environ $3,5\ \mu\text{m}$. Pour avoir une chance d’attacher une molécule d’ADN entre deux lignes adjacentes, il faut donc que leur espacement soit inférieur à $3,5\ \mu\text{m}$.

Afin de pouvoir tester différentes conditions, nous choisissons de créer un modèle comprenant 9 zones différentes : la taille des lignes imprimées peut être de 1 , $1,5$ ou $2\ \mu\text{m}$; la taille des espacements peut être de 2 , $2,5$ ou $3\ \mu\text{m}$. Chaque zone correspond à une combinaison de deux de ces valeurs. Le modèle original en silicium a été réalisé au Laboratoire de Photonique et de Nanostructures (LPN à Marcoussis) par Laurent Malaquin.

2.2 Résultats

Tests en fluorescence Dans un premier temps, pour définir les meilleures conditions à utiliser pour l’impression de la caséine biotinillée, nous réalisons des tests avec de la caséine fluorescente (caséine marquée par du FITC, Fluoresceine Iso Thio Cyanate). On montre figure II.10(a), l’image obtenue en microscopie de fluorescence de l’impression de caséine fluorescente par un tampon présentant des lignes de $1\ \mu\text{m}$ séparées de $2,5\ \mu\text{m}$. Sur cette image, on ne voit aucune tache lumineuse entre les lignes. On observe cependant que les lignes sont par endroits tachetées de noir, ceci provient probablement d’impuretés présentes à la surface du tampon en PDMS empêchant l’adsorption de la caséine à cet endroit. On mesure que les lignes ont une largeur moyenne de $1,3\ \mu\text{m}$ et sont séparées en moyenne de $2,2\ \mu\text{m}$. Les lignes imprimées sont légèrement plus larges que celles du timbre. On a retrouvé cet effet, plus ou moins important, avec tous les timbres utilisés. Il vient certainement de la

Chapitre II. Étude de la recherche d'homologie

manière de tamponner la lamelle, le PDMS pouvant se déformer si l'on appuie trop fort. De plus si le timbre n'est pas assez rincé et séché, une quantité trop importante de caséine peut être tamponnée et baver légèrement en dehors de la zone imprimée.

Les résultats de ces tests en fluorescence montrent que l'on reproduit fidèlement le motif du tampon au détail près de la largeur de la ligne imprimée ; ce qui n'est absolument pas gênant pour la suite. De plus, la surface est imprimée de manière homogène par la quasi-totalité de la surface du tampon, ce qui représente une surface exploitable d'environ $1\text{ cm}\times 1\text{ cm}$.

Avec les billes On a ensuite essayé de tamponner de la caséine biotinilée (invisible en microscopie) et d'incuber les billes streptavidine (490 nm de diamètre). La figure II.10(b) montre le résultat obtenu avec un tampon de $1\text{ }\mu\text{m}\times 3\text{ }\mu\text{m}$ après optimisation du protocole. On voit très nettement le motif des lignes de billes. En de rares endroits ces lignes sont discontinues, mais le résultat est tout à fait satisfaisant car la quasi-totalité des billes font face à une autre bille sur la ligne adjacente permettant à une molécule d'ADN de s'accrocher des deux côtés. On remarque toutefois que les lignes sont bien plus larges que le tampon utilisé ; il y a par endroit trois billes dans la largeur d'une ligne. En effet comme les billes sont sphériques, si une bille se fixe sur le bord de l'impression, elle déborde d'une longueur équivalente à son rayon. Ainsi on peut voir trois billes de 490 nm rangées dans la largeur d'une bande de $1\text{ }\mu\text{m}$.

3 Essai d'étirement de l'ADN

Dans ces expériences, nous avons rencontré quelques difficultés pour visualiser l'ADN à cause de la légère autofluorescence des billes et surtout du reste de caséine fluorescente sur les tampons utilisés provoquant un important bruit de fond. Cependant il a été possible d'observer des molécules d'ADN s'accrocher sur les billes par une extrémité. Par contre aucun ADN en pont n'a pu pour l'instant être observé. Une meilleure préparation des ADN à étirer contenant une majorité d'ADN marqué aux deux extrémités permettrait de valider ou non cette approche.

F Conclusions

Nous avons vu que le schéma simple de la fonction de RecA exposé dans le premier chapitre de cette thèse ne rend pas compte de la complexité des formes d'ADN que peut provoquer RecA. En particulier, il semble que RecA soit capable de faire, littéralement, des « noeuds » entre plus de deux molécules d'ADN (voir la forme en Y figure II.8). Nous avons montré que de multiples ADN simple-brin et double-brin peuvent s'attacher à une même molécule d'ADN. Ces observations sont à comparer aux expériences en solution suggérant que des agrégats d'ADN pourraient faciliter la recherche d'homologie[22, 23]. Nous avons également observé des mouvements de

billes liées à des filaments RecA qui ne peuvent pas être expliqués sans faire appel à une interaction particulière entre la bille et la surface couverte d'ADN. D'autre part, nous avons élaboré avec succès un protocole pour la mise en place d'une nanostructure en relief facilement modulable. Cette technique est très facile à réaliser et pourrait être utilisée pour d'autres expériences : pour suspendre des objets plus rigides que l'ADN tels que des microtubules ou des filaments d'actine par exemple.

Lors de ces expériences exploratoires, nous avons rencontré un grand nombre de difficultés : rendement insuffisant en « bonnes molécules » de la préparation de l'ADN cible, présence importante d'interactions non spécifiques (ADN-surface, nanocristaux-surface), technique de marquage peut-être pas judicieuse. De plus l'expérience manque de reproductibilité et de contrôle : contrôle en force et manipulation de l'ADN.

Afin de poursuivre dans cette voie, la première nécessité est d'éloigner l'ADN de la surface. Il faudrait également être capable d'aller au-delà de la simple observation dont l'interprétation s'avère difficile. Il faudrait donc effectuer une mesure dynamique en faisant varier différents paramètres de contrôle : force, couple, élongation, torsion. Ceci est possible, au moins en partie, grâce à des techniques de manipulation de molécule unique d'ADN comme les pinces magnétiques. Cependant celles-ci ne permettent pas encore de manipuler **et** d'observer en fluorescence. La combinaison des pinces magnétiques classiques avec une visualisation de la molécule d'ADN fait l'objet de la thèse de Ludovic Disseau dans notre équipe.

Chapitre III

Les pinces magnétiques sensibles au couple

Un de nos objectifs est de mesurer le couple exercé par Rad51 sur l'ADN lors de la formation du filament nucléoprotéique (voir chapitre I.A). On a vu dans le premier chapitre (partie B) les techniques de molécule unique existantes qui permettent de mesurer de tels couples. Nous avons aussi noté que ces méthodes ne permettent pas d'étudier la polymérisation de la recombinaison en termes de torsion-couple avec la résolution d'une protéine unique. En nous en inspirant, nous avons développé un nouveau dispositif expérimental associant la mesure de couple et la résolution « protéine unique ».

Le développement de la nouvelle pince magnétique à mesure de couple a été démarré par Hideyuki Arata, qui a passé une année de sa thèse au sein de notre équipe. Hideyuki Arata a conçu une expérience simple et pouvant fonctionner rapidement, dont le principe sera expliqué dans la suite de ce chapitre. Il a ainsi pu réaliser une preuve de principe en observant la polymérisation de Rad51. A son départ, j'ai repris le système et entrepris de le caractériser, d'en améliorer la reproductivité et d'obtenir des résultats avec la recombinaison.

A Le dispositif expérimental

1 Principe

Le principe de notre expérience est d'observer l'état de torsion d'une molécule d'ADN via la rotation d'une bille micrométrique. Dans les pinces magnétiques classiques, l'ADN est immobilisé entre une lamelle de microscope et la bille magnétique (figure III.1(a)).

Pour tirer une bille de $2,8 \mu\text{m}$ de diamètre avec une force de 1 pN , il faut appliquer un champ d'environ 100 mT . Le couple magnétique résultant est d'environ $10^7 \text{ pN} \cdot \text{nm}$, ce qui correspond à une énergie d'environ $10^6 \text{ k}_B\text{T}$ pour faire tourner

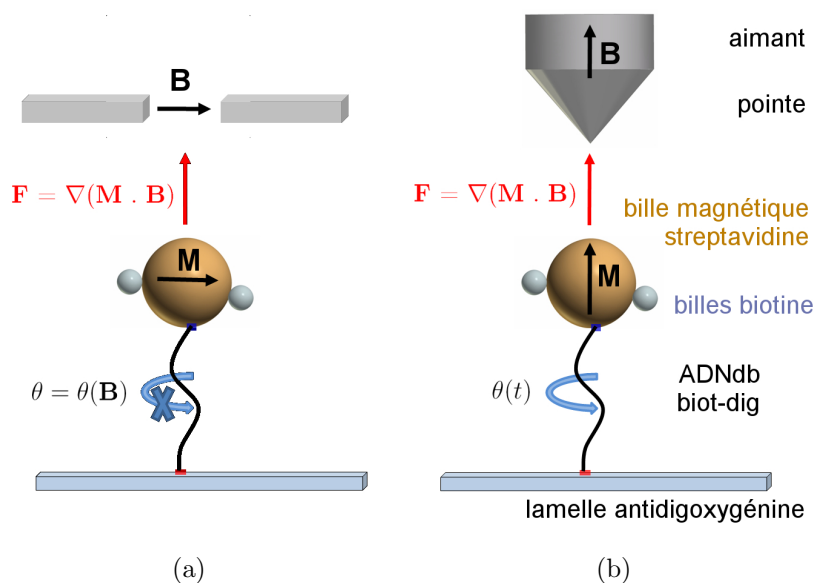


FIGURE III.1 – **Les pinces magnétiques sensibles au couple.** (a) Les pinces magnétiques classiques. Une molécule d'ADN est liée spécifiquement d'un côté à une lamelle de microscope et de l'autre à une bille magnétique. Celle-ci est tirée grâce à une paire d'aimants créant un champ magnétique horizontal. (b) Dans les pinces magnétiques sensibles au couple, un aimant crée un champ magnétique colinéaire à la force qu'il exerce. La bille est alors libre de tourner autour de cet axe vertical. La bille magnétique est marquée par des billes plus petites en polystyrène afin de pouvoir mesurer son mouvement de rotation.

la bille d'un radian. Ce couple est supérieur de plusieurs ordres de grandeurs aux couples pertinents dans une expérience de ce type.

On peut donc considérer que l'orientation de la bille, qui est solidaire de celle de son moment magnétique, est bloquée dans la direction du champ magnétique. Dans le cas des pinces magnétiques classiques, on utilise cet effet pour imposer une torsion donnée à l'ADN. Au contraire, nous souhaitons que la bille soit libre en rotation autour de l'ADN. Dans le but de libérer la rotation de la bille, nous avons choisi d'imposer un champ magnétique vertical (figure III.1(b)). Dans cette géométrie un gradient de champ est toujours présent, ce qui permet d'exercer une force de traction sur l'ADN, mais le rotation n'est pas contrainte. Ainsi, la bille est libre de tourner en lien avec l'état de torsion de l'ADN. Comme dans l'expérience réalisée par Harada et collaborateurs [76], afin de réaliser ce champ magnétique on utilise un aimant (en Neodymium) de symétrie cylindrique couplé à une pointe (en fer) pour en augmenter le gradient magnétique, et par conséquent, la force.

2 Description de l'expérience

2.1 Construction d'ADN

Afin de réaliser ce montage, on a profité de toute l'expertise acquise dans notre équipe concernant les pinces magnétiques classiques [79]. Ainsi, pour commencer, on utilise la même construction d'ADN. Celle-ci est obtenue par la ligation de trois produits différents de PCR (Polymerase Chain Reaction). Deux PCR sont conduites avec des nucléotides marqués par la biotine pour l'une et par la digoxygénine pour l'autre (dUTP-biotine ou dUTP-digoxygénine). Ces deux fragments d'ADN sont ligués au fragment central d'environ 14 kb. On obtient une molécule d'ADN longue d'environ 16 kb avec environ 600 pb marquées spécifiquement aux extrémités.

2.2 Chambre d'observation

On utilise également la même chambre microfluidique (figure III.2). Celle-ci est réalisée en polydiméthylsiloxane (PDMS) et comprend un canal de 25 mm de long, 2 mm de large et environ 100 μm de haut. Ce canal est obtenu par moulage du PDMS sur un relief de résine obtenu par photolithographie. La cellule en PDMS est collée à une lamelle de verre précédemment silanisée (Sigmacote[®]), puis une solution d'antidigoxygénine (anticorps spécifique de la digoxygénine) y est incubée à 37°C. Après rinçage, on obtient un canal microfluidique dont une surface est couverte d'antidigoxygénine.

L'ADN est couplé spécifiquement, grâce à son fragment biotinylé, à des billes magnétiques couvertes de streptavidine (diamètre 2,8 μm , Dynabeads[®]) de manière à obtenir moins d'une molécule par bille. On peut rincer l'ADN n'ayant pas réagi en séparant les billes magnétiques du surnageant grâce à un aimant. Ces billes sont ensuite incubées dans la chambre pendant quelques minutes afin de lier la deuxième extrémité de la molécule d'ADN à la lamelle via l'interaction digoxygénine-anticorps. Après un rinçage *in situ*, on obtient finalement des molécules d'ADN attachées d'un côté à la lamelle de microscope et de l'autre à une bille magnétique (figure III.1(b)), tout comme dans les pinces magnétiques.

2.3 Observer la rotation

On veut mesurer la rotation de la bille magnétique pour en déduire l'état de torsion de la molécule d'ADN. La bille étant sphérique, il faut lui rajouter des « défauts » afin de détecter précisément sa position angulaire. Ceci est obtenu en injectant dans le canal contenant les billes magnétiques attachées à l'ADN, une solution de petites billes biotinilées (diamètre 800 nm, Polybeads[®]). Lorsque les billes magnétiques sont toutes pourvues d'au moins une petite bille, on rince abondamment. Tous les couplages (biotine-streptavidine et digoxygénine-antidigoxygénine) sont effectués en tampon TE-NaCl, les rinçages sont effectués en tampon TE-BSA (voir recettes en Annexes A).

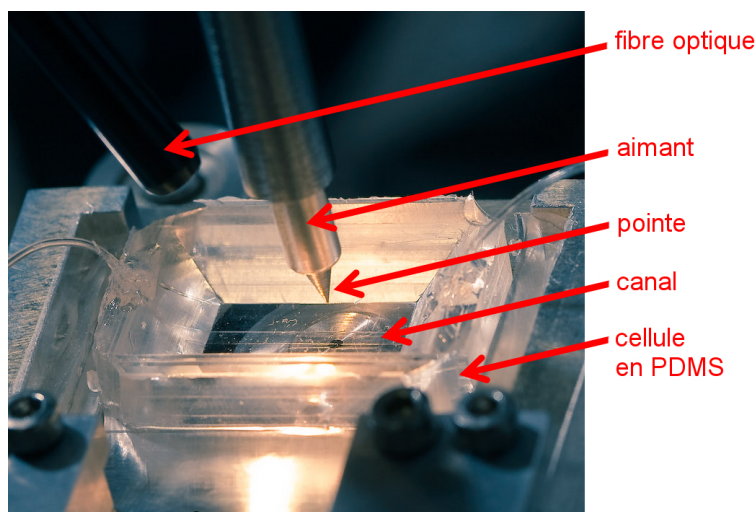


FIGURE III.2 – **Les pinces magnétiques sensibles au couple.** Photographie du dispositif expérimental. La cellule en PDMS, dont on aperçoit le canal microfluidique, est posée sur un objectif à immersion (100x), un flux peut y être imposé grâce aux tubes de connection. La pointe aimantée est suspendue à la verticale de l'objectif, l'éclairage se fait en lumière blanche par une fibre optique.

2.4 Le montage expérimental

La chambre PDMS-lamelle est placée au-dessus d'un microscope inversé fait-maison. Il est constitué d'un objectif 100x (immersion à huile, Zeiss), d'une lentille de tube et d'un miroir qui renvoie l'image sur une caméra CCD. Ceci nous permet d'avoir à moindre coût un microscope très stable, que l'on peut facilement ouvrir et modifier.

L'illumination est délicate, car la pointe aimantée est placée juste à la verticale du point observé au microscope. Ainsi on ne peut pas éclairer en transmission exactement selon l'axe optique. Dans un premier temps, l'illumination est faite en lumière blanche par une fibre optique placée sur le côté (voir figure III.2).

La chambre peut être déplacée dans le plan à l'aide de deux platines de translation, l'objectif peut être déplacé verticalement par une vis micrométrique afin de faire la mise au point. La pointe aimantée est suspendue au-dessus du microscope via une tour et un bras en aluminium. On peut déplacer la pointe dans les trois directions de l'espace grâce à des platines micrométriques.

2.5 Analyse du film

On observe en temps réel les mouvements de la bille magnétique sur un écran. L'acquisition est faite à la cadence de 25 images par seconde. La séquence vidéo est enregistrée sur une cassette magnétique (type DVcam), puis transférée sur l'ordinateur via le logiciel Windows Movie Maker. A cause du temps de calcul conséquent,

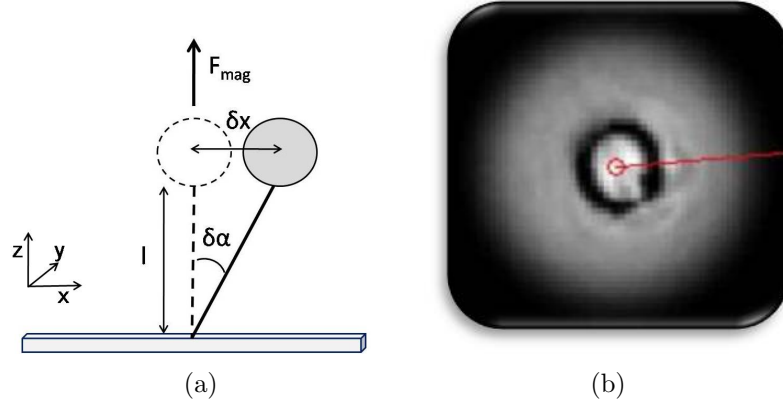


FIGURE III.3 – (a) Schéma illustrant la mesure de la force. (b) Capture d'écran du programme de suivi de position angulaire.

environ 5 images analysées par seconde, l'analyse se fait *a posteriori* sur l'ordinateur. Une fois la vidéo transférée sur l'ordinateur, on souhaite en extraire trois informations : la force de traction appliquée à la molécule d'ADN, la position angulaire de la bille en fonction du temps et le couple magnétique appliqué à la bille.

Mesure de la force On mesure la force magnétique appliquée à la bille, et donc à l'ADN, de la même manière que dans les pinces magnétiques classiques [80]. La bille a un mouvement brownien, dû aux chocs des molécules de la solution, mais ce mouvement est confiné à cause du lien avec la surface (la molécule d'ADN). Ce système { bille + ADN } lié à la lamelle de microscope et subissant la force de gradient magnétique, homogène à l'échelle de la bille, est équivalent à un pendule dans un milieu visqueux. La force de traction peut être calculée à partir de la mesure des fluctuations de la position de la bille dans le plan (xy), perpendiculaire à la force (figure III.3(a)). Lorsque la bille s'écarte de δx de sa position moyenne, l'axe de la molécule d'ADN fait un angle $\delta\alpha$ avec l'axe de la force. Elle subit une force de rappel dans le plan xy donnée par :

$$F_{rappel} = F_{mag} \sin(\delta\alpha) \approx \frac{F_{mag}\delta x}{l}, \quad (\text{III.1})$$

où l est l'altitude du centre de la bille. La force de rappel est proportionnelle à l'écart à la position d'équilibre, on peut donc définir la raideur du ressort équivalent : $\kappa = F_{mag}/l$. Cette raideur peut être calculée à l'aide du théorème d'équipartition de l'énergie [81] :

$$\frac{1}{2}\kappa \langle \Delta x^2 + \Delta y^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B T, \quad (\text{III.2})$$

qui donne finalement :

$$F_{mag}(l) = k_B T \frac{l}{\langle \Delta x^2 + \Delta y^2 \rangle}. \quad (\text{III.3})$$

La mesure de l'altitude, l , et des fluctuations de la position de la bille, $\langle \Delta x^2 + \Delta y^2 \rangle$, permettent donc de mesurer la force magnétique. Ces fluctuations sont obtenues par un programme écrit sous MATLAB. Ce programme détermine la position du centre de la bille grâce à un calcul de corrélation croisée entre l'image et son inverse par rapport aux axes médians. Comme nous ne mesurons pas l'altitude de la bille magnétique, celle-ci est déduite à partir d'une courbe force-extension obtenue avec des pinces magnétiques classiques (sur la même construction d'ADN et dans les mêmes conditions salines). Lorsque l'on trace sur une même figure la courbe force-extension mesurée ailleurs et la courbe $F_{mag}(l)$ calculée à partir des fluctuations transverse, l'unique point d'intersection de ces deux courbes a pour coordonnées l'altitude l de la bille et la force de traction. Ceci est effectué pour plusieurs enregistrements de 500 images (soit 20 secondes) pour une bille donnée. On obtient ainsi la force à 0,1 pN près.

2.6 Mesure de la position angulaire en fonction du temps

Le programme écrit sous MATLAB permet aussi de déterminer l'angle θ de rotation de la bille en se basant sur la corrélation entre deux images successives. Dans la pratique l'utilisateur choisit la bille à suivre dans le champ de vision, le programme réduit alors toutes les images à une zone limitée autour de cette bille et masque en noir au-delà d'un rayon défini par l'utilisateur (figure III.3(b)). Ainsi on réduit la taille des images à traiter et en masquant le fond autour de la bille, on s'affranchit de tout problème lié à son inhomogénéité de ce fond.

Sur la première image du film, l'utilisateur pointe une petite bille fixée à la périphérie de la bille magnétique donnant le zéro du suivi angulaire. A chaque itération, le programme recentre l'image sur la bille et détermine l'angle de rotation par rapport à l'image précédente. Pour cela, on tourne numériquement l'image $i + 1$ et on la compare à l'image i par un calcul de corrélation croisée. Ceci est effectué pour plusieurs angles, et une interpolation permet de déduire l'angle donnant la meilleure corrélation. L'affichage montre alors l'angle mesuré par un segment de droite pointant dans cette direction (figure III.3(b)) l'utilisateur peut ainsi suivre au fur et à mesure le travail du programme. De plus, toutes les N images, le programme s'interrompt et demande à l'utilisateur de confirmer ou de corriger l'angle obtenu. Le nombre N est choisi au lancement du programme en fonction de la qualité de la vidéo, typiquement cette valeur varie entre 10 et 100.

Le programme a été testé sur une vidéo « artificielle » obtenue en faisant tourner une image typique de l'expérience. Ainsi, le programme suit l'angle de rotation avec une résolution meilleure qu'un degré. Sur une vidéo « réelle », l'image de la bille n'est pas constante et des effets d'ombre, dus à l'éclairage de côté, peuvent altérer la

résolution du suivi angulaire. C'est pourquoi on peut assister à une dérive de l'angle mesuré et on a parfois besoin de le corriger toutes les N images.

Ce programme permet donc, à partir de l'enregistrement vidéo d'une expérience, d'obtenir la position angulaire de la bille en fonction du temps avec une résolution de quelques degrés.

Cependant, il présente quelques inconvénients que nous essaierons de corriger dans une nouvelle version. Tout d'abord, le suivi se fait après l'expérience, il serait bien plus avantageux d'être capable de l'effectuer en temps réel. Pour l'instant, l'expérience est faite en suivant « à l'œil » sur l'écran de contrôle. De plus, le suivi en lui-même est très long : il faut découper le film en séquences de 1500 images (= 1 minute), et l'analyse de chaque séquence prend environ 10 minutes. Ajouté au temps de transfert vers l'ordinateur qui est effectué à la vitesse de lecture vidéo (25 images/seconde), il est clair que ce temps d'analyse doit être réduit, l'optimum étant de l'accomplir en temps réel.

2.7 Avantages

L'expérience est assez proche de celle développée par Harada et collaborateurs [76], étant donné le choix d'un champ magnétique vertical. Cependant, elle en diffère notamment par le choix des billes utilisées. Nous utilisons une bille magnétique de diamètre $2,8 \mu\text{m}$ contre seulement 850 nm dans leur cas. Ceci apporte différents avantages.

Tout d'abord, l'aimantation de la bille étant proportionnelle à son volume, une bille plus volumineuse est plus sensible à la force et au couple magnétique pour un champ donné. Ainsi nous pouvons tirer jusqu'à 2 pN contre seulement quelques dixième de picoNewtons dans leur cas. Nous pouvons également lui appliquer un couple, il en sera question dans la partie B.

L'autre intérêt de choisir une bille de diamètre important est le gain en résolution angulaire. En effet, une bille de rayon R tournant de $d\alpha$ autour de son centre entraîne un déplacement linéaire d'un point situé à sa périphérie de $dl = R d\alpha$. On mesure la position angulaire de la bille via la position d'un détail à sa périphérie, ainsi la résolution angulaire $d\alpha$ est liée à la résolution sur la position de la petite bille dl par la relation précédente. Ceci nous permet d'atteindre une résolution de quelques degrés, qui pourra être encore améliorée par un travail sur le programme de suivi et sur l'illumination.

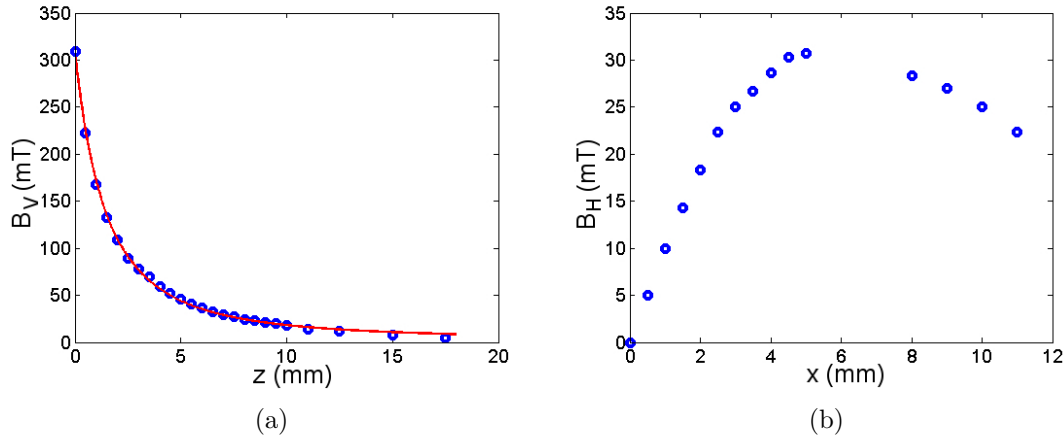


FIGURE III.4 – **Mesure du champ magnétique créé par la pointe.** (a) Mesure du champ magnétique vertical en fonction de la distance z à la pointe magnétique. On peut remarquer une décroissance en $1/z^2$ (ligne rouge). (b) Mesure du champ magnétique horizontal, à une distance verticale de 5 mm de la pointe, en fonction de la distance x à l'axe de la pointe.

B Caractérisation du montage

1 Mesure du champ magnétique créé par la pointe

Afin de caractériser le montage, le champ magnétique vertical créé par la pointe a été mesuré. On utilise pour cela un Teslamètre¹ ; la taille du capteur est de l'ordre de quelques millimètres carrés, il permet de mesurer des champs compris entre 10 mT et 1 T avec une précision de quelques milliTeslas. Le capteur est positionné de manière à être centré et perpendiculaire à l'axe de la pointe, celle-ci est ensuite déplacée selon son axe (verticalement) grâce à une vis micrométrique. On mesure ainsi le champ magnétique vertical en fonction de la distance z à la pointe. Il vaut 320 mT au contact et 15 mT à une distance de 1 cm (figure III.4(a)). Il est important de connaître la valeur du champ magnétique vertical si l'on veut utiliser dans le futur un autre champ magnétique, horizontal, afin d'appliquer un couple mesuré à la bille. Ainsi on peut estimer la valeur théorique du champ magnétique horizontal souhaité pour appliquer un couple Γ .

On a également mesuré les composantes horizontales du champ magnétique. En plaçant la sonde verticalement à $z = 5$ mm de la pointe, on mesure la composante horizontale du champ (figure III.4(b)). Celle-ci est nulle pour $x = 0$, dans l'axe, montrant que le champ est à cet endroit colinéaire à l'axe de la pointe. Elle augmente ensuite jusqu'à 25 mT à 5 mm de l'axe ($x = 5$ mm). Ces mesures ne permettent pas de bien connaître le champ magnétique autour de la pointe, mais elles permettent de

1. dont le montage électronique a été effectué par Nicolas Desprat dans le laboratoire

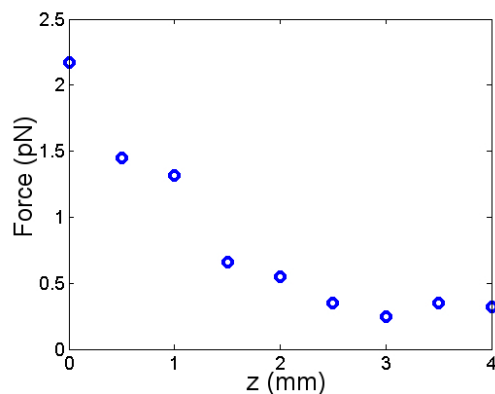


FIGURE III.5 – Force magnétique mesurée sur une bille liée à une molécule d’ADN, en fonction de l’altitude z de la pointe.

se faire une idée de l’effet de l’alignement de la pointe. En effet, à proximité de l’axe ($x < 1$ mm), la composante horizontale du champ augmente linéairement de 10mT pour 1mm pour un champ vertical mesuré dans l’axe de 45 mT. On voit donc qu’il est critique de bien aligner la pointe avec le microscope, pour que le champ appliqué soit véritablement vertical et colinéaire à la force. Ainsi, avant chaque expérience, la pointe est centrée « à l’œil » au-dessus de l’objectif.

Nous avons aussi essayé de visualiser les lignes de champ sortant de la pointe à l’aide de limaille de fer. Mais, le gradient étant très intense près de la pointe, il est difficile d’avoir une image correcte. Les particules s’accumulent au contact de la pointe déplaçant le volume. On trouve près de la pointe plusieurs « rayons » de particules formant un cône assez fermé. Il est donc difficile de mesurer la géométrie du champ créé par la pointe par ce genre d’approche.

2 Caractérisation à l’aide d’une bille magnétique

2.1 Mesure de la force magnétique

La force due au gradient de champ magnétique est mesurée par l’analyse des fluctuations de la position horizontale de la bille comme décrit dans la partie précédente. On montre figure III.5, la force mesurée sur une bille liée à une molécule d’ADN pour différentes hauteurs z de la pointe. On voit que l’on peut aller de 0,2 pN jusqu’à 2 pN en changeant l’altitude de la pointe. Pour comparaison, dans le dispositif de pinces magnétiques utilisé dans notre équipe, avec les mêmes cellules en PDMS limitant la même hauteur minimale d’approche des aimants, on peut atteindre une force de 8 pN. Cette différence pourrait se justifier par la géométrie différente du champ magnétique utilisé, engendrant certainement un gradient moins important dans notre cas.

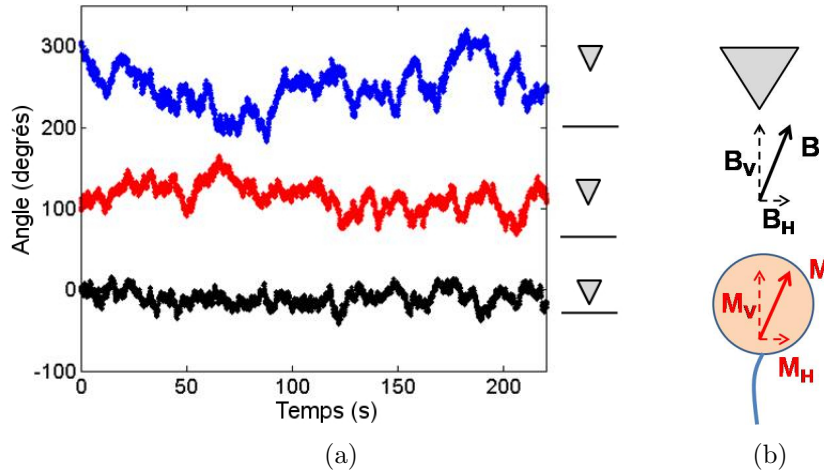


FIGURE III.6 – **Effet de l'anisotropie de la pointe magnétique** (a) Fluctuations angulaires d'une bille liée à un ADN, pour trois altitudes différentes de la pointe. L'amplitude des fluctuations est plus grande lorsque la pointe est plus éloignée de l'échantillon. (b) Schéma explicatif des notations utilisées pour décrire le champ et le moment magnétiques.

Il faut remarquer que cette mesure dépend fortement de l'alignement de la pointe. On peut ainsi exercer une force de près de 2,5 pN dans le meilleur des cas contre moins de 1 pN pour la même altitude de la pointe dans une autre expérience.

2.2 Observation des fluctuations angulaires

L'étape suivante dans la caractérisation du montage est d'étudier le comportement en rotation d'une bille magnétique retenue par une molécule unique d'ADN. On utilise le programme précédemment décrit pour suivre la position angulaire d'une bille magnétique liée à une molécule d'ADN entaillée et par conséquent libre de tourner. En observant une bille suffisamment longtemps, on s'aperçoit que son mouvement brownien est limité (figure III.6(a)). Il existe donc un couple de rappel qui tend à garder la bille dans une certaine direction. Étant donné qu'aucun flux n'est appliqué pendant cette expérience, ce couple doit venir de l'interaction du moment magnétique de la bille avec un champ magnétique horizontal.

On peut, dans un premier temps, obtenir une information qualitative sur le couple de rappel en regardant l'amplitude des fluctuations angulaires : plus celle-ci est réduite, plus le couple est important. Nous avons observé de cette manière l'effet de la hauteur de la pointe, z , sur les fluctuations angulaires. Il apparaît que le couple magnétique augmente quand z diminue (III.6(a)). Il semble donc que ce champ magnétique horizontal provienne de la pointe, ce qui est cohérent avec les mesures de champs magnétiques évoquées en 1 pour un pointe imparfaitement centrée. Ce champ magnétique horizontal semble relativement faible puisque les fluctuations

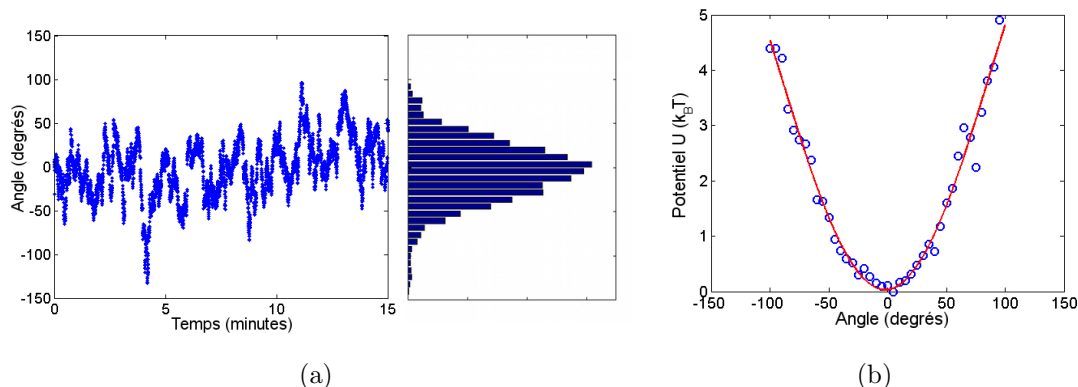


FIGURE III.7 – **Mesure de couple à partir des fluctuations angulaires.** (a) Fluctuations angulaires libres d’une bille retenue par un ADN. On trace l’histogramme des angles atteints, une fois normalisée cette distribution donne la probabilité P d’avoir un angle θ . (b) A partir de la loi de Boltzmann, on déduit de la probabilité $P(\theta)$ le potentiel dans lequel baigne la bille. Celui-ci est ajusté par l’expression théorique du potentiel magnétique subi par un dipôle dans un champ.

browniennes de la bille peuvent avoir une amplitude de plusieurs dizaines de degrés.

2.3 Mesure du couple

Nous pouvons calculer la valeur du couple magnétique de rappel à partir de l’analyse des fluctuations angulaires d’une bille liée à une molécule d’ADN entaillée.

Distribution des fluctuations angulaires Les fluctuations angulaires de la bille sont l’image des fluctuations angulaires de son dipôle M_H dans le potentiel

$$U = -M_H B_H \cos(\theta - \theta_0) \quad (\text{III.4})$$

créé par le champ magnétique horizontal M_H (voir figure III.6(b)). La probabilité $P(\theta)$ d’avoir l’angle θ dans ce potentiel est donnée par la loi de Boltzmann :

$$P(\theta) = \frac{\exp(-U(\theta)/k_B T)}{Z}, \quad (\text{III.5})$$

avec Z la fonction de partition, k_B la constante de Boltzmann et T la température. En mesurant les fluctuations angulaires de la bille pendant un temps assez long, on peut établir la distribution de θ qui, une fois normalisée, donne la probabilité $P(\theta)$ (figure III.7(a)). A partir de l’équation précédente et de la mesure de $P(\theta)$, on peut donc obtenir le potentiel U par :

$$U = -k_B T \ln(P(\theta)) + \text{constante}. \quad (\text{III.6})$$

On peut ensuite ajuster le potentiel obtenu par son expression théorique donnée par l’équation III.4 (figure III.7(b)).

Chapitre III. Les pinces magnétiques sensibles au couple

Mesure du couple Le couple produit par le champ magnétique horizontal est donné par la dérivée de l'énergie potentielle U par rapport à l'angle θ :

$$\Gamma = M_H B_H \sin(\theta - \theta_0), \quad (\text{III.7})$$

avec M_H la composante horizontale du moment magnétique de la bille et $(\theta - \theta_0)$ l'écart angulaire à la position d'équilibre où M_H et B_H sont alignés (figure III.6(b)).

En pratique, l'ajustement du potentiel U donne la valeur du produit $M_H B_H$. Dans le cas où le champ magnétique horizontal est assez fort pour que $\theta - \theta_0$ soit faible, on peut approximer la fonction cosinus du potentiel par une parabole et définir ainsi une raideur $\kappa = M_H B_H$. Ainsi, dans cette même approximation, le couple de rappel est donné par

$$\Gamma = \kappa(\theta - \theta_0). \quad (\text{III.8})$$

Nos pinces magnétiques sensibles au couple sont alors tout à fait comparables aux pinces optiques dans lesquelles la force est donnée le produit de la raideur du piège optique et de l'écart à la position d'équilibre, $F = \kappa_{opt}(x - x_0)$.

Cette méthode de mesure du couple est assez efficace pour des enregistrements assez longs (10-15 minutes) et des raideurs suffisamment élevées. En effet, elle repose sur l'ajustement du potentiel et plus la raideur est forte, plus celui-ci est stable.

2.4 Caractérisation du champ magnétique horizontal

A condition de connaître le champ magnétique vertical et l'aimantation de la bille magnétique, il est possible d'évaluer le champ magnétique horizontal.

Le producteur des billes magnétiques fournit la valeur de leur susceptibilité magnétique ainsi que de leur aimantation à saturation. Ayant mesuré le champ magnétique créé par la pointe, un rapide calcul montre que dans notre dispositif l'aimantation des billes est égale à sa valeur à saturation. L'aimantation volumique d'une bille vaut donc : $M^{vol} = M_{sat}^{vol} = 14 \text{ kA/m}$. Finalement, l'aimantation M d'une bille de diamètre $2,8 \mu\text{m}$ vaut : $1,6 \cdot 10^{-13} \text{ [SI]}$.

Le moment magnétique de la bille s'aligne avec le champ total formant un angle, α , avec la verticale donné par

$$\alpha \approx \tan(\alpha) = \frac{B_H}{B_V} = \frac{M_H}{M_V}.$$

En considérant que cet angle α est petit devant 1, on peut écrire : $M_H = M \sin \alpha \simeq M\alpha$ et $\tan \alpha \simeq \alpha = B_H/B_V$. Ainsi l'amplitude U_0 du potentiel mesuré en fonction des valeurs connues et de B_H est :

$$U_0 = M_H B_H = M\alpha B_H = M \frac{B_H^2}{B_V}. \quad (\text{III.9})$$

Finalement, on peut donc calculer la valeur du champ magnétique horizontal par :

$$B_H = \sqrt{\frac{U_0 B_V}{M}}. \quad (\text{III.10})$$

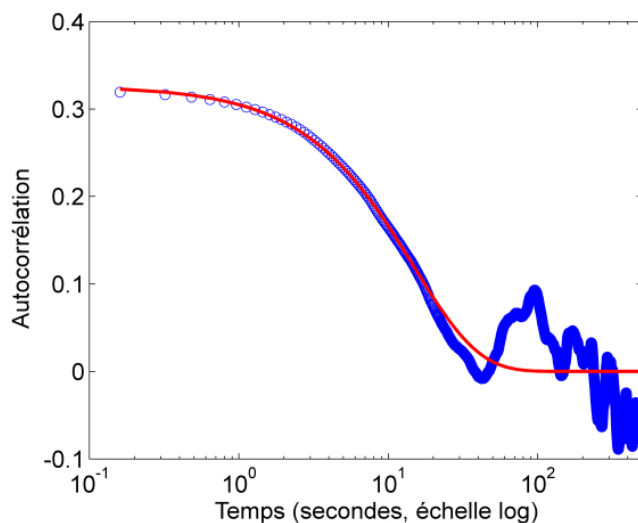


FIGURE III.8 – **Mesure du couple par l’autocorrélation des fluctuations angulaires.** L’autocorrélation de l’enregistrement montré figure III.7(a) est ajustée pour une exponentielle décroissante avec deux paramètres ajustables donnant accès à la raideur κ et au coefficient de friction visqueuse ξ .

Lorsque la pointe se situe à quelques millimètres de la surface de la cellule en PDMS, on mesure typiquement un potentiel d’environ $4 - 8 k_B T$. Le champ magnétique a été mesuré dans cette situation valant environ 50 mT . On obtient un champ magnétique horizontal de l’ordre de $100 \mu\text{T}$, seulement deux fois plus élevé que le champ magnétique terrestre à Paris ($45 \mu\text{T}$). On verra plus tard, que ce résultat est largement inférieur au champ horizontal réel ressenti par la bille. Cette mesure dépend de trois paramètres : l’amplitude du potentiel U_0 , l’aimantation de la bille M et la valeur du champ vertical B_V . Il est possible que la mesure de ce dernier paramètre, B_V , soit mauvaise en particulier à cause de la taille macroscopique de la sonde du Teslamètre. Il nous est pour l’instant impossible d’utiliser les fluctuations verticales de la bille pour obtenir la valeur de ce champ, car nous ne mesurons pas la position de la bille selon cet axe.

2.5 Mesure du coefficient de friction visqueuse

La bille magnétique fluctue sous l’effet de l’agitation thermique, modélisée par la force de Langevin $F(t)$. Son mouvement angulaire est retenu par le champ magnétique horizontal, modélisé par un ressort en torsion de raideur κ , et par la friction visqueuse. L’équation du mouvement de la bille est :

$$\xi \frac{d\theta}{dt} + \kappa\theta = F(t), \quad (\text{III.11})$$

Chapitre III. Les pinces magnétiques sensibles au couple

où ξ est de le coefficient de friction visqueuse. On a pris θ_0 , l'angle d'équilibre du ressort, égal à zéro afin de simplifier les équations. On définit R_θ la fonction d'autocorrélation de $\theta(t)$ par :

$$R_\theta(\tau) = \langle \theta(t)\theta(t + \tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \left\{ \frac{1}{T} \int_0^\infty \theta(t)\theta(t + \tau).dt \right\}. \quad (\text{III.12})$$

$R_\theta(\tau)$ vérifie l'équation :

$$\xi \frac{dR_\theta}{d\tau}(\tau) + \kappa R_\theta = 0, \quad (\text{III.13})$$

puisque par définition la force de Langevin est dénuée de toute corrélation. La solution de cette équation est :

$$R_\theta(\tau) = R_\theta(0).e^{-\frac{\kappa}{\xi}\tau}. \quad (\text{III.14})$$

Or $R_\theta(0) = \langle \theta^2(t) \rangle$ est donné par le théorème d'équipartition de l'énergie : $\langle \theta^2(t) \rangle = k_B T / \kappa$. D'où finalement :

$$R_\theta(\tau) = \frac{k_B T}{\kappa}.e^{-\frac{\kappa}{\xi}\tau}. \quad (\text{III.15})$$

L'autocorrélation $R_\theta(\tau)$ est calculée à partir de $\theta(t)$ en utilisant l'algorithme de transformée de Fourier rapide (fft) sous MATLAB. Le calcul précédent permet d'ajuster $R_\theta(\tau)$ par une exponentielle comportant deux paramètres ajustables : κ la raideur du ressort équivalent et ξ le coefficient de friction visqueuse. Ceci permet donc en théorie de mesurer ces deux grandeurs, cependant l'ajustement n'est pas facile. L'autocorrélation obtenue a une allure exponentielle uniquement pour les temps courts (figure III.8). Ainsi l'ajustement avec deux paramètres libres sur quelques points du début de la courbe n'est pas toujours très stable.

En pratique, on obtient κ avec la première méthode indépendante de la viscosité, et on utilise la deuxième méthode pour obtenir le coefficient de friction visqueuse ξ . Ce coefficient peut difficilement être calculé théoriquement car il dépend de chaque couple bille-ADN. Il dépend d'une part du nombre et de la position des petites billes greffées et d'autre part de la position de la liaison avec la molécule d'ADN, celle-ci imposant le centre de rotation. Ainsi, le coefficient de friction visqueuse est plus important pour une bille tournant par rapport à un point de son équateur que pour une bille tournant autour de son centre. Il dépend, de plus, de la distance de la bille à la paroi celle-ci étant du même ordre de grandeur que la taille de la bille [82]. En pratique, ce coefficient de friction visqueuse vaut en moyenne 120 pN · nm · s.

3 Difficultés rencontrées, améliorations en vue

3.1 Mouvement de rotation non simple

Nous avons observé, dans certaines expériences avec la protéine, que la bille peut tourner autour d'un point situé à son équateur. En effet, la molécule d'ADN n'est pas

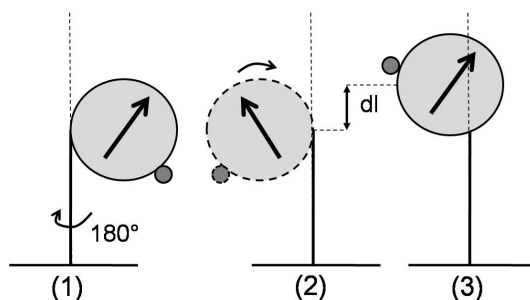


FIGURE III.9 – Schéma illustrant un effet possible de l'attachement de la molécule d'ADN à l'équateur de la bille magnétique. Si l'ADN entraîne une rotation de 180° de la bille (de 1 à 2), et si le champ magnétique n'est pas colinéaire à l'axe de la rotation, alors la bille doit aussi avoir un mouvement pour conserver son moment aligné avec le champ (de 2 à 3). Sur le schéma, on illustre cette situation en montrant que dans ce cas la bille se rapproche de l'aimant de dl . L'énergie magnétique est donc plus faible en (3) qu'en (1). On montre également qu'une petite bille peut apparaître (3) et disparaître (1) au cours d'une rotation à cause du mouvement de rotation non simple de la bille magnétique.

forcément attachée au pôle Sud de la bille comme schématisé sur la figure III.1(b). Il arrive qu'elle soit liée au niveau de l'équateur. Dans ce cas, on observe la rotation autour de ce point. Cette disposition entraîne certaines différences par rapport au cas idéal. Tout d'abord le coefficient de friction visqueuse est plus grand pour une rotation excentrée ($14\pi\eta R^3$) que pour une rotation centrée ($8\pi\eta R^3$). De plus, du fait de la légère inclinaison du champ magnétique, il peut exister une position angulaire plus avantageuse. On peut voir sur le schéma figure III.9 que pour passer de la position (3) à la position (1), il faut fournir un travail contre la force de traction qui vaut approximativement $W = 1 \mu\text{m} \times 1 \text{pN} = 250k_B T$.

Il arrive aussi que l'on observe que lors de la rotation d'une bille magnétique, les petites billes qui lui sont attachées disparaissent à chaque tour à une même position angulaire. Le schéma présenté figure III.9 donne un élément d'explication pour comprendre ce phénomène : vue de dessous, la petite bille est visible dans la position (1) et invisible dans la position (3). Ce schéma n'illustre certainement pas le mouvement réel de la bille magnétique, mais il permet de comprendre la complexité du mouvement et les différents aspects, géométriques et magnétiques, à prendre en compte.

3.2 Couple et force

On a vu que grâce à l'anisotropie de la pointe magnétique, on peut appliquer un couple magnétique de l'ordre de la dizaine de $k_B T$, c'est l'ordre de grandeur intéressant pour sonder le travail d'une protéine. Cependant, le couple et la force sont dépendants l'un de l'autre dans ce dispositif. En effet, comme ils sont créés par le même champ magnétique, pour augmenter la force il faut baisser la pointe ce

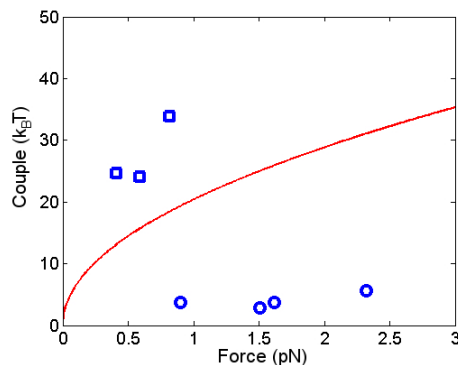


FIGURE III.10 – **Couple en fonction de la force appliquée.** La ligne rouge représente le couple critique de formation des plectonèmes. Les carrés et les ronds sont les points expérimentaux obtenus sur deux billes différentes, ils représentent deux comportements extrêmes.

qui a pour effet d'augmenter également le couple. Ainsi, on ne peut pas faire varier indépendamment le couple et la force, c'est la principale limitation du système.

On verra dans la suite que l'on atteint facilement le couple de formation des plectonèmes² lors des expériences avec hRAD51. Une manière de s'en affranchir serait de repousser plus haut cette limite expérimentale en augmentant la force de traction, car le couple critique de formation des plectonèmes est proportionnel à la racine carrée de cette force. Mais ceci n'est pas envisageable pour l'instant car augmenter la force augmente proportionnellement le couple magnétique, celui-ci restant alors supérieur à celui pour former les plectonèmes. Il faut donc travailler à force faible pour que le couple magnétique soit inférieur au couple critique des plectonèmes. Il faut noter que le couple magnétique dépend de l'expérience et en particulier de l'alignement de la pointe magnétique. Ainsi dans certains cas, on se situe toujours au-dessus $\Gamma_c(F)$ (figure III.10, \square) et la bille ne pourra pas tourner, alors que dans d'autres cas on est capable d'augmenter la force de traction, sans faire varier sensiblement le couple (\circ). A présent, nous ne contrôlons pas la force et le couple indépendamment. Il faut étalonner les raideurs en traction et en rotation avant (ou après) chaque expérience.

3.3 Améliorations effectuées

Élimination de tout champ extérieur Le principe de l'expérience était d'appliquer un champ magnétique vertical afin de laisser la bille libre de tourner, pour éventuellement ensuite appliquer un autre champ magnétique, horizontal et maîtrisé, pour sonder le couple mis en jeu dans une réaction biologique. On a vu que pour l'instant, le champ magnétique a une composante horizontale venant principalement de la pointe.

2. Plectonèmes : Définition et rappels théoriques p.32

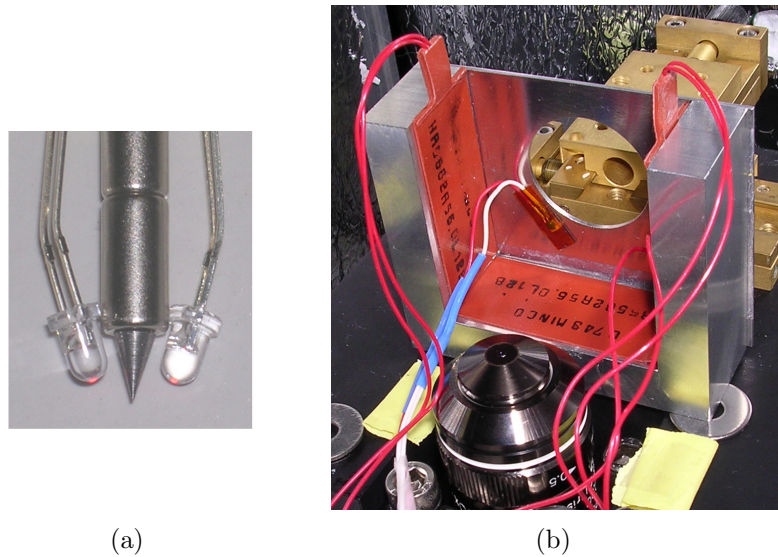


FIGURE III.11 – **Améliorations apportées.** (a) **Illumination** à l'aide de deux petites diodes lumineuses éliminant le problème d'ombre. (b) **Thermalisation.** Trois résistances d'environ 50Ω sont collées à l'intérieur du porte-échantillon autour de l'objectif. La température est mesurée par une sonde de résistance posée juste sous l'échantillon. Le thermalisation est obtenue par un module PID non montré sur la photographie.

On a essayé de maîtriser davantage l'existence de champ magnétique parasite, en éliminant toute pièce ferromagnétique du montage. La platine de translation a ainsi été changée pour une platine ne contenant que des matériaux non magnétiques (cuivre, bronze, aluminium), ainsi que toutes les vis. Une seule partie du montage est encore légèrement magnétique, il s'agit de l'objectif. Des tests sont en cours pour choisir le modèle présentant les meilleures caractéristiques magnétiques. Une autre source de champ magnétique est la table optique. Pour résoudre ce problème, l'expérience sera certainement déplacée sur un marbre ou une table non magnétique. Un blindage à base de mumétal a également été évoqué, mais après quelques tests cela s'est avéré assez délicat. De plus la principale source de champ magnétique horizontal étant la pointe, et celle-ci étant obligatoirement à l'intérieur du blindage, ce projet a été mis de côté.

Amélioration de l'illumination Le dispositif initial d'illumination a posé des problèmes lors de l'analyse des films par notre programme MATLAB. En effet, la fibre optique placée au-dessus de l'échantillon l'éclaire de manière oblique à cause de la présence de la pointe magnétique exactement à la verticale du point d'observation. L'effet d'ombre nous a notamment empêché de mesurer la position angulaire de la bille pour plusieurs expériences. La difficulté étant d'éclairer dans l'axe au-dessus de l'échantillon, on a tout d'abord essayé d'éclairer par en-dessous à l'aide d'une lame

Chapitre III. Les pinces magnétiques sensibles au couple

semi-réfléchissante. De cette manière, on observe très clairement les billes magnétiques, sur fond noir, mais les petites billes en latex sont quasiment invisibles. Le suivi angulaire est donc impossible à moins d'utiliser par exemple des petites billes fluorescentes.

On a finalement modifié l'éclairage en montant deux petites diodes électroluminescentes (DEL), monochromatiques, de part et d'autre de la pointe magnétique (figure III.11(a)). Les deux diodes sont diamétralement opposées par rapport à la pointe, et sont légèrement inclinées vers l'axe de la pointe. L'ombre provoquée par une diode est éclairée par la seconde réduisant quasiment intégralement ce problème. Cet éclairage permet d'observer une belle figure d'interférence en anneaux autour d'une bille magnétique en dehors du plan de focalisation. Cet effet est utilisé dans les pinces magnétiques classiques pour mesurer la hauteur de la bille, ce qui n'est pas encore possible dans notre montage, mais paraît donc envisageable grâce à cette méthode d'illumination. L'autre avantage comparé à la fibre optique est que l'on n'a plus besoin de se soucier de régler l'éclairage à chaque expérience, les diodes étant placées et réglées la première fois et ne sont jamais déplacées. Finalement, l'intensité lumineuse peut être réglée à l'aide d'un potentiomètre placé dans le boîtier contenant les piles électriques responsables de l'alimentation.

Thermalisation La recombinaison humaine, hRAD51, est une protéine « frileuse », dont le taux de polymérisation augmente considérablement au-delà de 25°C. Pour assurer la reproductibilité des expériences, il a été rapidement indispensable de contrôler la température de la chambre d'observation.

On a choisi pour cela de placer trois résistances chauffantes d'environ 50 Ω chacune (MINCO) sur les trois parois verticales à l'intérieur du porte-échantillon (figure III.11(b)). Celui-ci est en aluminium et est directement en contact avec la lamelle. Il forme une boîte ouverte sur une face autour de l'objectif du microscope. Ainsi, le porte-échantillon est directement chauffé par les résistances et l'objectif est chauffé par rayonnement. L'échantillon est principalement chauffé par contact avec le support et l'objectif, via l'huile, ainsi que par convection de l'air chaud présent dans le porte-échantillon. La température est mesurée sous la face supérieure du porte-échantillon à l'aide d'un thermomètre à résistance platine (Resistance Temperature Detector = RTD). La mesure de la température est envoyée à un boîtier électronique comprenant un module PID et un amplificateur, monté par Jean-Hugues Cordabox à l'atelier d'électronique du laboratoire. Une température de consigne (typiquement 30°C) est donnée au PID qui régule l'alimentation des résistances pour la conserver. En pratique, la régulation est obtenue à 0,1°C près au niveau de la sonde après quelques minutes de mise en route. Par contre, le reste du dispositif et notamment l'objectif sont plus longs à chauffer, et on observe pendant une dizaine de minutes des dérives mécaniques se traduisant par une défocalisation. Ces dérives deviennent ensuite négligeables lorsque tout le système est en régime permanent.

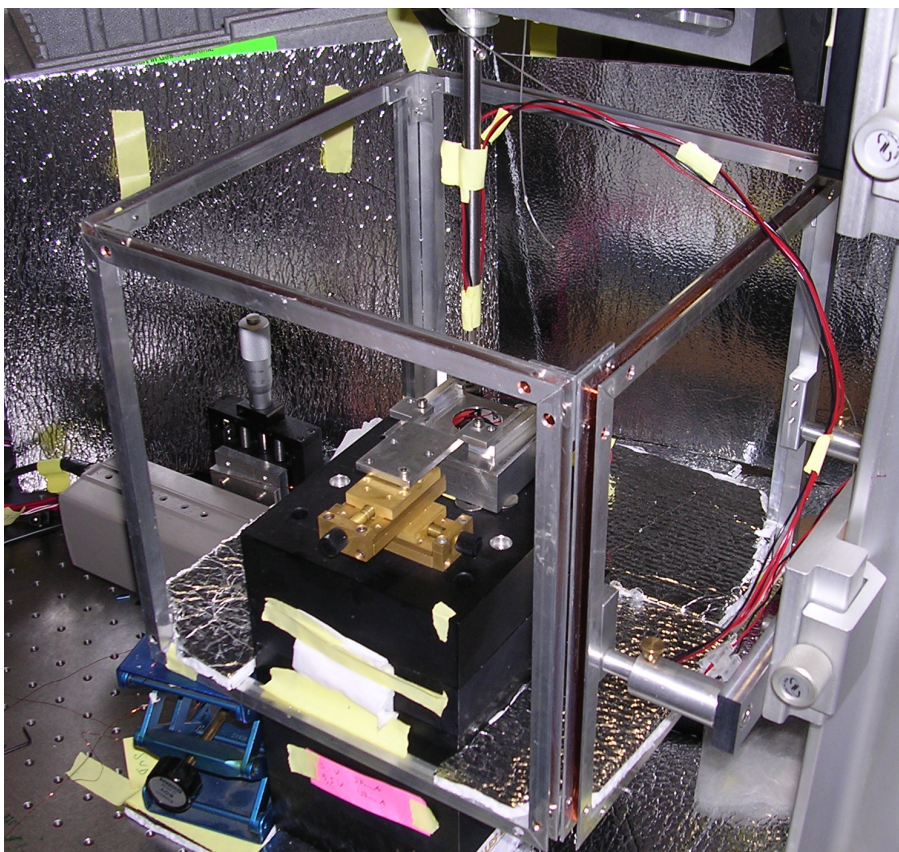


FIGURE III.12 – **Essai de bobines pour compenser le champ magnétique horizontal.** Du fil électrique est enroulé sur les quatre faces d'un cadre cubique en aluminium dont le centre correspond au point d'observation de l'expérience. Les bobines opposées sont alimentées en série, et les deux paires de bobines sont alimentées indépendamment.

3.4 Développements en cours

Dans le but d'annuler le champ horizontal résiduel et de créer un champ magnétique horizontal contrôlable pour pouvoir appliquer un couple contrôlé aux billes magnétiques, nous avons construit autour du microscope quatre bobines. Un cadre cubique en aluminium a été construit à l'atelier par Michel Petit, les arêtes, de 25 cm, de ce cadre sont rainurées afin d'y enrouler le fil conducteur (voir figure III.12). Les quatre faces verticales de ce cadre ont reçu chacune 100 tours de fil en cuivre. Les quatre bobines ainsi créées définissent deux directions appelées Nord-Sud et Est-Ouest. Les deux bobines Nord-Sud sont alimentées en série de manière à ce que les champs magnétiques qu'elles créent s'ajoutent, il en est de même pour les bobines Est-Ouest. On alimente indépendamment les deux directions ce qui permet de créer un champ magnétique dans n'importe quelle direction du plan horizontal. Le cadre est placé de manière à ce que son centre corresponde au point observé par le micro-

Chapitre III. Les pinces magnétiques sensibles au couple

spectre. Ces bobines créent un champ magnétique horizontal d'environ $200 \mu\text{T}$ pour un courant électrique de 500 mA .

Ce dispositif a été testé en plaçant une boussole au centre du cadre. La boussole « perd le Nord » pour un courant de 50 mA dans les bobines Est-Ouest et 150 mA dans les bobines Nord-Sud. En augmentant encore le courant traversant les bobines et en allumant successivement les deux directions, il est possible de faire tourner l'aiguille de la boussole très facilement. On est donc, *a priori*, capable de créer un champ suffisant pour supprimer le champ magnétique terrestre. Cependant, lorsque ce dispositif a été testé dans les conditions de l'expérience, avec des billes magnétiques liées à la lamelle de microscope via une molécule d'ADN, aucun effet des bobines n'a été observé. Il fut impossible de faire tourner les billes, ni même d'observer une différence dans leurs fluctuations angulaires. Ceci indique que le champ magnétique résiduel est largement supérieur au champ terrestre et que notre dispositif est sous-dimensionné. Il faut donc le re-dessiner afin de pouvoir créer un champ magnétique plus important capable d'annuler le champ résiduel.

Ce projet est donc toujours en cours. Il s'agit tout d'abord de construire des bobines plus puissantes en diminuant leur distance à la zone d'observation, en augmentant le nombre de tours de fil et la puissance électrique. Ceci nous permettrait à l'avenir de pouvoir manipuler la bille magnétique afin de faciliter en particulier les calibrations et d'appliquer un couple contrôlé qui pourrait être assujéti à une boucle de rétroaction.

Chapitre IV

Résultats expérimentaux

A Polymérisation

1 Réalisation de l'expérience

Le dispositif expérimental décrit dans le chapitre précédent a été utilisé pour étudier la polymérisation de la protéine recombinase humaine hRAD51. L'expérience commence par la préparation de la chambre d'observation (voir p.65) : injection des molécules d'ADN liées aux billes magnétiques puis addition des petites billes. On distingue les billes retenues par une molécule d'ADN de celles collées non-spécifiquement à la surface en positionnant la pointe magnétique de manière à ce que les billes ressentent une force les éloignant de la surface de l'ordre de 0,5 pN. Ainsi les billes liées à un ADN sont soulevées et on peut observer leur mouvement brownien alors que les autres restent fixes, collées à la surface. On peut alors commencer la véritable expérience avec la protéine d'intérêt.

1.1 Alignement de la pointe magnétique

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, il est important de bien aligner la pointe magnétique avec le microscope afin d'appliquer le couple magnétique le plus faible possible et de permettre à la protéine d'entraîner la rotation de la bille. Une première méthode pour centrer la pointe consiste à la déplacer dans les deux directions pour tirer l'ADN latéralement. Ainsi, on observe que la bille magnétique est déplacée dans la direction correspondante jusqu'à un certain point déterminé par la longueur de la molécule d'ADN. On tire ainsi la molécule selon les deux axes du plan d'observation. En prenant le milieu des positions extrêmes de la bille, on peut déterminer la position de la pointe qui permet d'obtenir la bille magnétique à la verticale du point d'ancrage de l'ADN à la surface. Cependant, dans le cas, fréquent, où l'ADN n'est pas attaché au pôle Sud de la bille magnétique, il est difficile de placer la bille au centre car, dans ce cas, elle est en position instable et tourne autour de son point d'attache à l'ADN. Dans la plupart des cas, on est donc gêné par cet effet

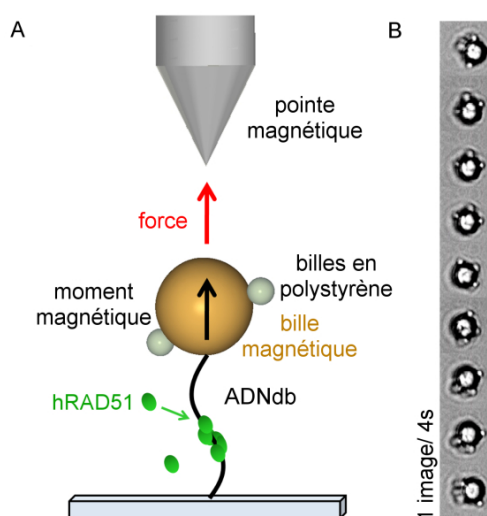


FIGURE IV.1 – **Schéma de principe du dispositif expérimental.** Une molécule d'ADN est maintenue entre une bille magnétique et une lamelle de microscope. La bille est tirée légèrement par un aimant qui impose également la position de son moment magnétique. Celui-ci est vertical laissant la bille libre de tourner autour de l'axe vertical. Lorsque la protéine hRAD51 est ajoutée en concentration suffisante, la bille magnétique se met à tourner dans le sens des aiguilles d'une montre (B).

pour centrer la pointe de manière rigoureuse et précise.

Une deuxième méthode s'est avérée plus rapide et aussi efficace. Il s'agit tout simplement de baisser la pointe au plus près de l'objectif du microscope, et de la centrer « à l'œil ». On obtient au final un réglage identique à celui obtenu par la méthode précédente.

1.2 Recherche de molécule d'ADN intacte

On sait, notamment grâce aux expériences de pinces magnétiques, qu'une molécule d'ADN doit être intacte, c'est-à-dire ne présenter aucune entaille, pour être sensible à une torsion. En effet, si la molécule peut tourner librement au site de l'entaille, toute l'énergie de torsion est donc libérée à cet endroit et la molécule est toujours à son état d'équilibre en torsion. Il en découle que l'on pourra observer une rotation de la bille magnétique dû à un changement de l'état de torsion de l'ADN uniquement si la molécule d'ADN est intacte. On compte, dans notre préparation d'ADN, en moyenne une molécule intacte sur dix. Il faut donc pouvoir les identifier.

Méthode 0 : Après l'injection de protéine Le couple magnétique résultant de la pointe est insuffisant pour faire tourner la bille magnétique à la manière des pinces magnétiques. On ne peut donc pas étudier le comportement en torsion de la molécule attachée sous la bille observée. Par ailleurs, on a vu que la raideur

en torsion d'une molécule intacte d'ADN est négligeable devant $k_B T$. On ne peut donc pas espérer discriminer les molécules en mesurant cette grandeur, celle-ci étant inaccessible dans notre expérience. Pour la majorité des expériences que je vais décrire dans ce chapitre, nous n'avons donc pas pu choisir une molécule d'ADN intacte avant de commencer la polymérisation de hRAD51.

En pratique, on se place au-dessus d'une molécule candidate puis on injecte la protéine en concentration élevée (0,5 – 1 μM). Si la bille observée ne se met pas à tourner, alors on parcourt la chambre d'observation jusqu'à trouver une bille ayant un mouvement de rotation dirigé (non brownien). Dans ce cas, la bille est manifestement sensible à l'état de torsion de l'ADN puisque l'on observe sur la bille l'effet de la polymérisation de hRAD51, preuve de principe de l'expérience.

Cette méthode pose plusieurs problèmes. Tout d'abord, la recherche de la bille qui tourne peut s'avérer très longue : en moyenne une demi-heure, mais dans certains cas largement plus d'une heure. Le deuxième, et principal, inconvénient est que l'on rate le début du processus. De plus ce temps de recherche n'est pas du tout contrôlé ni reproductible, on observe donc des polymérisations à différents stades suivant les expériences.

Méthode 1 : A l'aide de pinces magnétiques Devant ces difficultés, une amélioration du dispositif expérimental s'est avérée indispensable et une « option pinces magnétiques classiques » a été ajoutée au montage afin de chercher les molécules intactes par une étude en rotation. Une réplique de la pièce soutenant les aimants dans le montage de pinces magnétiques présent dans notre équipe a été construite. Cette pièce a été adaptée afin de la fixer à la place de notre pointe magnétique. La rotation de la paire d'aimants est obtenue manuellement mais de manière assez rapide à l'aide de deux fils. Lorsque l'un est enroulé autour de l'axe de rotation (environ 30 tours), l'autre est complètement déroulé. Ainsi en tirant sur le premier, on donne environ 30 tours dans une direction à la molécule d'ADN et on enroule le second. Lorsque l'on tire ensuite sur ce deuxième fil, on revient à 0 tours pour l'ADN et on ré-enroule le premier. On peut donc explorer une partie du comportement de la molécule d'ADN en rotation à force constante (voir figure I.13(a), p. 31).

On se place à force faible, afin que l'enroulement imposé engendre la formation de plectonèmes. Ceux-ci sont repérés, « à l'œil », par la défocalisation de la bille observée dû au raccourcissement de la molécule d'ADN. On observe donc, en imposant une trentaine de rotations, un mouvement vertical de la bille si la molécule d'ADN est intacte. Au contraire, si la molécule est entaillée, alors aucun plectonème n'est formé et la bille magnétique reste à la même hauteur. L'altitude de la bille n'est pas mesurée dans notre montage. Mais grâce à l'éclairage par les diodes (décrit au chapitre précédent), on observe une figure d'interférences autour de la bille qui rend possible de visualiser un changement de hauteur inférieur à 1 μm .

Cependant, toutes les molécules trouvées avec cette méthode n'ont pas ensuite provoqué la rotation de la bille magnétique. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette

observation. Tout d'abord, la méthode n'est certainement pas infaillible étant donné qu'il n'y a pas de mesure de la hauteur de la bille et le faible enroulement imposé. On peut également penser que la polymérisation n'a pas été initiée sur ces molécules. Mais la raison principale vient certainement du couple magnétique résiduel. En effet, on a vu page 77, que suivant les billes et l'alignement de la pointe, on peut se trouver au-dessus du couple de formation des plectonèmes et peut-être aussi au-dessus d'un couple critique pour la protéine, cela bloquant la rotation de la bille magnétique.

Il faudrait donc à l'avenir, après avoir choisi une molécule *a priori* surenroulable, mesurer le couple magnétique qu'elle subit. Ceci est pour l'instant assez difficile, car la mesure du couple nécessite d'enregistrer les fluctuations browniennes de la bille pendant environ un quart d'heure, puis de les analyser. Il faut compter pour cela environ une heure, ce qui n'est pas envisageable sur plusieurs billes. L'amélioration du programme de suivi angulaire permettant la mesure des fluctuations en temps réel, l'automatisation d'une partie du montage, la mesure de la hauteur des billes ainsi qu'un meilleur contrôle du couple magnétique devraient permettre de choisir plus facilement et sans erreur une bille susceptible de tourner sous l'action de la protéine.

2 Initiation à haute concentration

2.1 Preuve de principe

Pour initier la polymérisation de hRAD51 dans nos pinces magnétiques sensibles au couple, on injecte la protéine à une concentration minimale de 100 nM dans le tampon de polymérisation (recette en annexes, page 125). La chambre est maintenue à une température constante de 30°C et la pointe magnétique est placée de manière à créer une force de traction et un couple faibles ($F \approx 0,5$ pN). Dans ces conditions, on trouve quasiment à chaque fois une bille en rotation. La vitesse de rotation typique d'une bille magnétique dans ces conditions est de l'ordre de 1 RPM (rotation par minute) dans le sens des aiguilles d'une montre (figure IV.2). Étant donné la disposition de notre microscope, qui comprend un miroir et fait l'image de la bille vue par-dessous (du côté de l'ADN), une rotation dans le sens des aiguilles d'une montre correspond au déroulement d'une hélice droite. On observe donc, via la rotation de la bille, le déroulement de la double-hélice de la molécule d'ADN qui lui est attachée. Nous interprétons cette rotation directionnelle par la polymérisation d'au moins un filament nucléoprotéique de hRAD51 sur la molécule d'ADN attachée à la bille observée. La bille peut tourner de cette manière pendant plus d'une heure, avec une vitesse relativement constante comprise entre 1 et 1,5 RPM. Il faut noter qu'à faible concentration de Rad51 (inférieure à 100 nM), la polymérisation ne démarre pas et, par conséquent, on n'observe pas de rotation de la bille.

Il s'agit de la preuve de principe de notre technique : nous observons, en direct, via la rotation de la bille magnétique, l'état de torsion de la molécule d'ADN. En particulier, on observe ici le changement conformationnel de l'ADN induit par la

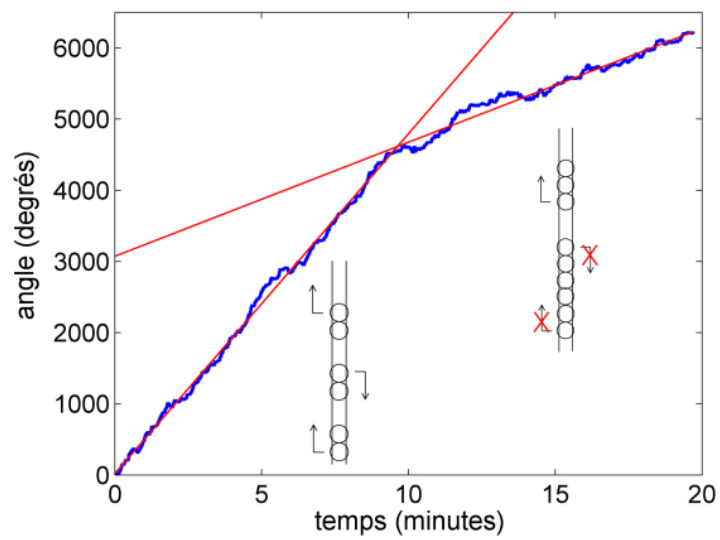


FIGURE IV.2 – **Rotation d’une bille liée à une molécule d’ADN en présence de hRAD51 à 100nM.** Position angulaire d’une bille en fonction du temps. La rotation a lieu dans le sens des aiguilles d’une montre. Cette courbe peut être divisée en deux parties : avant et après $t = 10$ minutes. Les deux parties sont chacune ajustées par une droite dont la pente donne la vitesse de rotation : $v_1 = 1.3$ RPM et $v_2 = 0.43$ RPM. Leur rapport vaut environ 3, ce qui nous permet d’interpréter cette courbe comme étant le résultat de trois fronts de polymérisation dans la partie 1, contre seulement un dans la seconde partie. Ceci pourrait correspondre à l’annihilation de deux fronts.

Chapitre IV. Résultats expérimentaux

recombinase hRAD51 lors de sa polymérisation.

Distinguer les phases de nucléation et de croissance Le suivi d'une bille tournant en présence de hRAD51 à 100 nM, et initiée à cette concentration, est montrée figure IV.2. Dans ce graphe, on a reporté l'angle de rotation de la bille en fonction du temps. La courbe peut être divisée en deux parties : avant et après $t = 10$ minutes. Les deux parties sont en apparence linéaires, et peuvent être ajustées chacune par une droite. La pente de cette droite donne la vitesse de rotation de la bille. Celle-ci vaut 1,3 RPM dans la première partie et 0,43 RPM dans la seconde. On remarque que la vitesse de la première partie vaut environ le triple de la seconde. On a vu dans le premier chapitre, qu'un modèle de nucléation-croissance explique bien les observations faites de la polymérisation de hRAD51. Basé sur ce modèle, nous interprétons ce changement brusque de vitesse de rotation de la bille par l'annihilation de deux fronts de polymérisation se propageant en sens opposé (voir le schéma dans la figure IV.2). Si aucun événement de nucléation n'intervient, alors la vitesse moyenne de rotation doit être diminuée d'un facteur 3 comme observé sur la figure IV.2. Cette observation suggère que lors de cette expérience, en l'absence de flux et pour une concentration de 100 nM, il n'y a pas eu d'évènement de nucléation pendant les vingt minutes qu'a duré l'enregistrement. Ceci, ajouté au fait qu'aucune initiation de la polymérisation n'a été observée pour des concentrations strictement inférieures à 100 nM, indique qu'une fois que la concentration est réduite à une valeur inférieure à 100 nM, la nucléation est très rare et peut être négligée par rapport à la croissance des filaments.

Le cas limite, à 100 nM, où l'initiation est possible lors de l'injection mais où la nucléation reste très rare par la suite, peut s'expliquer par la force de traction plus élevée lors de l'injection. En effet, lorsque l'on impose un flux dans le canal, les billes sont entraînées et l'ADN subit donc, en plus de la force magnétique, la force de traînée visqueuse des billes dans le flux. Cette force est apparemment bien plus grande que la force magnétique, car on observe qu'en présence du flux, les molécules d'ADN se couchent le long de la surface et les billes magnétiques sont au contact de la surface. Un rapide calcul permet d'obtenir l'ordre de grandeur de cette force visqueuse¹ : sachant que le débit volumique, D , est d'environ 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, que la section du canal, S , est de 100 $\mu\text{m} \times 2 \text{ mm}$ et que la bille a un rayon, R , de 1,4 μm ; sachant également que la force de traînée visqueuse est donnée pour une sphère de rayon R dans un liquide de viscosité η par :

$$F = 6\pi\eta Rv, \quad (\text{IV.1})$$

où v est la vitesse du flux ($v = D/S$), alors on obtient que cette force vaut environ

1. Un calcul plus complet devrait prendre en compte le profil de l'écoulement, de type Poiseuille, dans un canal de section rectangulaire. En prenant ici la vitesse moyenne dans le canal, on surestime certainement la vitesse près de la surface et donc la force visqueuse, mais il s'agit de connaître l'ordre de grandeur de cette force.

25 pN (contre environ 0,5 pN pour la force magnétique).

Or, tirer sur la molécule d'ADN favorise la nucléation et la polymérisation des filaments de RecA et Rad51 [79, 65]. En effet, on a vu dans le premier chapitre, que l'ADN est étiré dans le filament ; étirer la molécule à l'aide de pinces magnétiques, par exemple, favorise donc logiquement la polymérisation. Lors de l'injection, la force subie par l'ADN est plus élevée que lors de l'observation (20 pN contre 0,5 pN). La nucléation est donc facilitée lors de l'injection et la concentration critique pour nucléer est plus faible.

3 Etude à haute résolution de l'activité de hRAD51

Dans notre montage expérimental, le temps de réponse de la bille détermine la résolution temporelle. Ainsi, pour observer les détails de la formation du filament nucléoprotéique, il est avantageux de ralentir la polymérisation de la protéine, ce qui est obtenu en réduisant la concentration de hRAD51 en solution. Une fois que la polymérisation a été initiée, on peut changer la solution utilisée pour l'initiation en injectant une solution moins concentrée en protéine (après un éventuel rinçage sans protéines). Ce changement de solution est réalisable à condition de prendre des précautions pour éviter que la bille ne se colle à la lamelle. Ainsi, toute solution utilisée dans le canal contient de l'albumine de sérum de bovin (BSA) qui a la propriété de protéger des interactions non-spécifiques en couvrant les surfaces. On place également les aimants en position très basse pour tirer plus fort sur la bille et éviter qu'elle ne soit plaquée à la surface par le flux, qui est choisi pour permettre le compromis entre rapidité et collage de la bille. L'autre difficulté consiste à éviter l'apparition de bulle d'air dans le canal qui aurait pour effet, si une bulle est déplacée par un flux, de tout arracher sur son passage.

3.1 Observation de pauses régulières

La courbe présentée figure IV.3 a été obtenue à une concentration en hRAD51 de 10 nM. L'encart correspond à un agrandissement de la région encadrée. On peut voir dans cet encart que la rotation a lieu par pas. Entre 4 et 5 minutes, observe trois pas relativement courts dont la taille est inférieure à 150° . Ces « petits pas » ont été observés lors de différentes expériences à des concentrations de hRAD51 inférieures à 50nM. Le temps caractéristique des pauses entre ces pas est compris entre 10 et 20 secondes.

Entre 5 et 9 minutes, dans l'encart de la figure IV.3, on observe trois longs paliers espacés de 360° environ, c'est-à-dire que la bille effectue une longue pause à chaque tour dans la même position angulaire. Ces pauses à chaque tour peuvent être observées pour toutes les concentrations, mais le phénomène est plus fréquent et plus marqué pour les faibles concentrations. La durée de ces pauses à chaque tour peut aller d'une minute à quelques dizaines de minutes. Au vu de la caractérisation de ce dispositif expérimental présentée dans le chapitre précédent, on interprète les

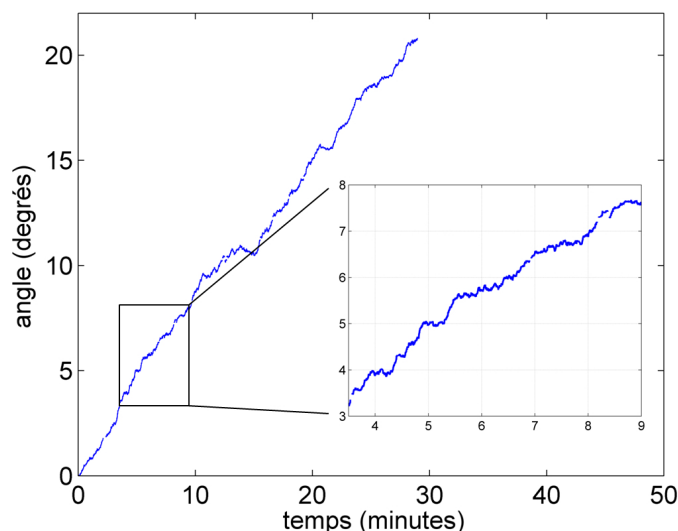


FIGURE IV.3 – **Exemple de rotation à 10nM.** Courbe obtenue pour une concentration en hRAD51 de 10 nM. La vitesse moyenne de rotation est de 0,7 RPM, mais la rotation a lieu par à-coup. On distingue dans la partie agrandie dans l’encart que la bille fait des pas séparés par des pauses plus ou moins longues.

longues pauses tous les tours comme étant l’effet du couple magnétique produit principalement par un mauvais alignement de la pointe.

3.2 Analyse globale : pairwise et transformée de Fourier

Analyse « pairwise » Une analyse statistique globale peut nous permettre de quantifier la taille des pas observés et leur cohérence à longue distance. En mesurant, pour chaque point de la courbe, la distance qui le sépare de chacun des autres points, on obtient la distribution des distances entre paires de points (figure IV.4(a)), que l’on appellera dans la suite distribution « pairwise ». Pour une courbe linéaire, la distribution pairwise devrait décroître de manière monotone depuis une valeur égale au nombre de points de la courbe moins un, pour une distance d’un point, jusqu’à une valeur de 1 pour la paire de points la plus éloignée. Par contre, si la courbe a une forme en marches d’escalier de taille D , alors la distribution pairwise doit toujours décroître mais cette fois en montrant des pics espacés de D .

L’analyse de la courbe donnée figure IV.3 par cette méthode est montrée figure IV.4(a). La distribution pairwise montre des pics très clairs et très réguliers (environ tous les 360°). On peut voir également un motif de fréquence plus élevée qui modifie la forme des grands pics.

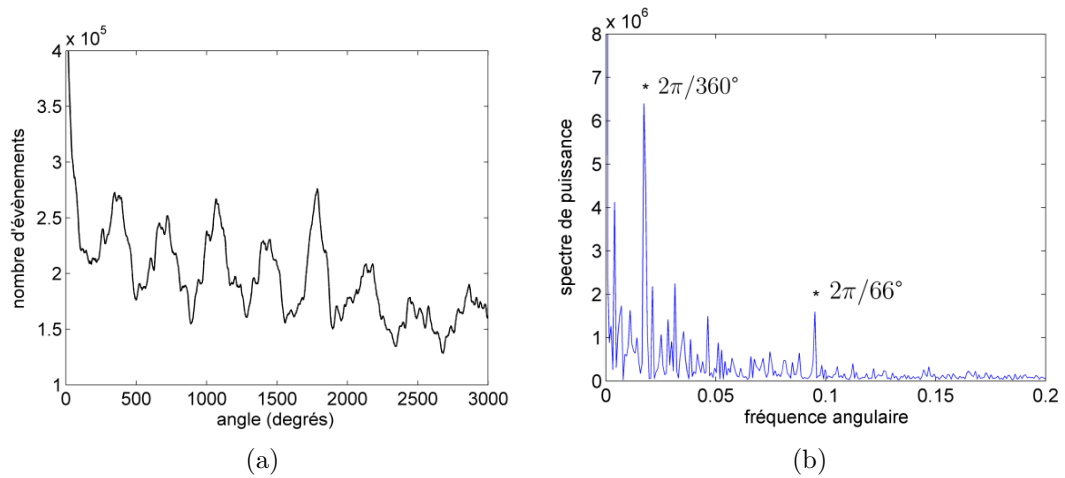


FIGURE IV.4 – **Distribution pairwise et spectre de Fourier de la courbe de la figure IV.3.** (a) La distribution montre des pics très clairs environ tous les 360° auxquels sont superposés des pics moins distincts de fréquence plus élevée. (b) Le spectre de puissance fait ressortir deux fréquences associées aux périodes : 66° et 360° . Les longues pauses tous les 360° sont interprétées comme étant le résultat du couple de rappel dû au champ magnétique horizontal résiduel.

Spectre de puissance en Fourier Pour savoir si ces pics sont répartis périodiquement, on effectue la transformée de Fourier de la distribution pairwise. Le spectre de puissance résultant est montré dans l’encart de la figure IV.4(b). Deux pics sortent du bruit assez nettement. Ces deux pics correspondent aux angles 66° et 360° . On considère que les autres pics sont indiscernables du bruit qui quant à lui augmente à mesure que la fréquence diminue. Cette analyse révèle donc que les pics de la distribution pairwise sont répartis périodiquement. Le mouvement de rotation étudié n’est donc pas un mouvement continu ou des marches aléatoires mais il doit être composé de marches régulièrement espacées de 66° et 360° en moyenne. Nous avons déjà proposé une explication pour les pas de 360° : le champ magnétique horizontal bloque la bille dans la même direction à chaque tour. Mais cette analyse révèle aussi que la rotation est composée de pas plus courts, de 66° en moyenne. On peut donc penser que la polymérisation de hRAD51, et le déroulement de l’ADN qui en découle, s’effectue par pas élémentaires de 66° environ dans les conditions expérimentales précisées plus haut.

Remarque On voit sur la figure IV.4(a) que les grands pics tous les 360° masquent un peu la périodicité à 66° . Afin d’observer les détails de la polymérisation, l’effet du champ magnétique horizontal est donc gênant, et nous avons essayé de nous placer dans des conditions où il est le plus faible possible dans la suite.

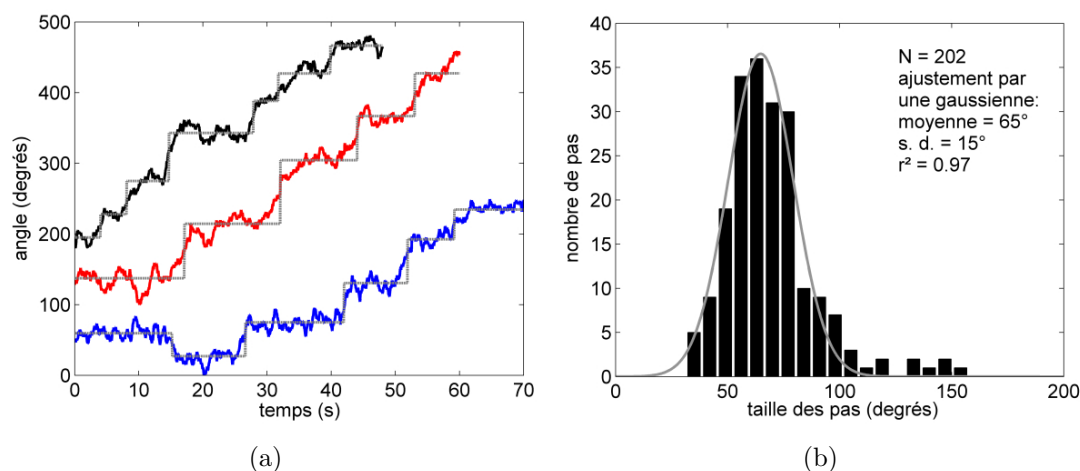


FIGURE IV.5 – **La rotation a lieu par pas de 65°.** (a) Trois exemples de rotation montrant une progression par marches d'escalier. (b) Histogramme de la taille de 202 pas obtenus de la rotation de 5 paires ADN-billes sur 26 200°. Il est ajusté par une distribution normale de moyenne 65° et d'écart-type 15°.

3.3 Caractérisation des pas

L'expérience à basse concentration en protéine ($10\text{nM} \leq C \leq 50\text{nM}$), a été reproduite sur cinq paires bille-ADN différentes. En effet, ces expériences sont délicates à réaliser : tout d'abord parce que l'on a besoin d'observer une molécule d'ADN intacte, et celles-ci sont rares ; de plus, le couple de rappel ne doit pas être trop fort pour ne pas masquer les pas de 66° ; enfin nous voulons des expériences à différentes concentrations, ce qui limite encore le nombre d'expériences réussies pour une concentration donnée. L'observation détaillée des courbes obtenues a révélé une rotation par pas. La figure IV.5(a) montre trois exemples de courbes avec des pas provenant de trois expériences différentes. Les courbes bleue, rouge et noire représentent les données brutes ; les lignes grisées pointillées représentent un ajustement par une fonction en marches d'escalier. L'ajustement est effectué par le programme Stepfinder, créé par J. Kerssemakers. Ce programme ajuste la courbe expérimentale avec une courbe en marches d'escaliers. Il n'a besoin d'aucune hypothèse sur la longueur et la taille des pas. Il propose un nombre de pas qui optimise l'ajustement, mais c'est l'utilisateur qui choisit manuellement ce nombre total de pas.

Puisque l'on est capable de visualiser directement ces pas, nous les avons donc analysés en détail. Sur une rotation totale de 26 200°, on a pu observer et mesurer 202 pas. Les pas sont repérés « à l'œil ». Le palier précédent le pas et celui suivant le pas sont déterminés manuellement en cliquant leur début et leur fin. La moyenne de la position angulaire est calculée pour ces deux paliers, et la différence entre les position moyenne du palier suivant et du palier précédant donne la hauteur du pas.

L’histogramme de la taille des 202 pas mesurés ainsi est montré figure IV.5(b). Il est ajusté par une distribution normale dont la moyenne est 65° et l’écart-type 15° , l’erreur sur la position de la moyenne est donc de 1° . On remarque que 8 pas, plus grands, sont en dehors de cette distribution. Ils représentent 4% du nombre total de pas mesurés.

La probabilité qu’au moins deux pas interviennent dans l’intervalle de temps de notre résolution temporelle, Δt , étant donné qu’il y a eu un pas, est donnée pour un processus poissonien par :

$$P(\tau) = \frac{1 - p(0) - p(1)}{1 - p(0)} = \frac{1 - e^{-\Delta t/\tau} - \Delta t/\tau e^{-\Delta t/\tau}}{1 - e^{-\Delta t/\tau}}, \quad (\text{IV.2})$$

où $p(i)$ est la probabilité poissonienne de faire i pas et τ est l’intervalle de temps moyen entre deux pas. Notre résolution temporelle est estimée à environ 5 secondes. Dans les conditions expérimentales où nous mesurons la taille des pas, la vitesse moyenne de rotation est d’environ 0,5 RPM, ce qui donne un intervalle moyen entre les pas, τ , d’environ 22 secondes. Il vient une probabilité de manquer des pas individuels, et donc de mesurer des pas multiples, $P(\tau)$, d’environ 8%. Ce résultat correspond à l’ordre de grandeur du pourcentage de pas multiples présents dans l’histogramme de la taille des pas (figure IV.5(b)), 4%, et nous permet de penser que ces pas « plus grands » peuvent être le résultat de pas successifs que notre résolution temporelle ne permet pas de résoudre.

Le couple qui entraîne des pauses plus longues tous les tours nous empêche dans certaines expériences de distinguer des pas entre ces marches de 360° . On peut observer dans ce cas-là que la vitesse de rotation entre deux longs paliers est plus élevée que la vitesse moyenne obtenue dans le cas, plus favorable, où le couple est plus faible, à concentration égale. Cette vitesse élevée est tout à fait comparable à la vitesse maximale de rotation obtenue à forte concentration. Dans le cas où l’on peut observer des pas entre des pauses tous les 360° , on peut penser que le couple a un effet sur la taille des pas observés. En effet, les premiers pas après la pause sont effectués contre un couple de rappel alors que les derniers (après un demi-tour) sont poussés par le couple pour faire un tour complet. On peut donc penser que les pas effectués entre 0° et 180° sont raccourcis alors que ceux entre 180° et 360° sont allongés. Cela aurait pour effet d’élargir l’histogramme de la taille des pas comparé au cas idéal en l’absence de couple.

3.4 Interprétation

Dans le premier chapitre (p. 18), nous avons vu que l’ADN est étiré de 50% et partiellement déroulé dans le filament nucléoprotéique. Des expériences de microscopie électronique ont en effet montré, pour RecA et Rad51, que la double hélice

Chapitre IV. Résultats expérimentaux

d'ADN est déroulée de 15° par paire de bases [7, 18]. Pour en déduire le déroulement de l'ADN imposé par une protéine, il faut connaître la stœchiométrie : nombre de bases d'ADN par protéine Rad51 ; or celle-ci est très variable suivant les conditions expérimentales (voir p. 16). En considérant une stœchiométrie de 4 ± 1 paires de bases pour une protéine, on attend donc qu'une protéine hRAD51 déroule l'ADN de $60 \pm 15^\circ$.

Nos résultats montrent la présence de pas de 65° en moyenne lors de la polymérisation. Etant donné que cette valeur est dans la fourchette attendue, nous interprétons ces pas comme étant le résultat de l'action d'une protéine hRAD51 individuelle. Nous mesurons donc directement la torsion qu'une protéine hRAD51 impose à une molécule d'ADN double-brin. A ma connaissance, ceci constitue la première mesure directe de l'état de torsion de l'ADN dans le filament nucléoprotéique formé par une recombinase.

Le choix d'observer la torsion de l'ADN plutôt que son extension pendant la formation du filament de hRAD51 est judicieux pour obtenir la résolution d'une protéine. En effet, alors qu'une protéine déroule l'ADN d'environ 60° (d'après les études précédentes), elle provoque l'allongement de la molécule d'ADN de seulement quelques Angströms (environ 6\AA). Ainsi pour détecter l'effet d'une protéine, il suffit dans un cas d'avoir une résolution angulaire de quelques dizaines de degrés alors que dans l'autre cas, cela nécessite une résolution proche de l'Angström !

Nous avons vu à la fin du premier chapitre, page 3.3, qu'il existe une discussion à propos de la croissance du filament nucléoprotéique de hRAD51. Il semble acquis que l'étape de nucléation soit coopérative, nécessitant l'ajout de pentamères de Rad51. Mais, en ce qui concerne l'élongation, la question est toujours ouverte. Il a été observé directement que la croissance d'un filament formé par RecA a lieu par ajout de monomères successifs [73]. Alors qu'à partir de données obtenues dans des pinces magnétiques classiques comparées à des simulations, T. van der Heijden et collaborateurs soutiennent que la croissance et la nucléation de hRAD51 sont le résultat de l'ajout de multimères composés d'au moins 4 protéines. Il faut noter que dans leurs conditions expérimentales, les phases de nucléation et de croissance ont des probabilités similaires de se produire et sont donc indistinguables.

Nos premiers résultats nous montrent l'effet de monomères de hRAD51 sur l'ADN lors de la croissance du filament (la nucléation est négligeable à ces concentrations), suggérant que la croissance est le résultat de l'ajout de monomères.

3.5 Analyse des fluctuations - stochasticité

L'analyse des fluctuations nous permet d'aller plus loin dans l'interprétation de ces résultats. Cette analyse permet de déduire le nombre d'événements, sans les voir. C'est-à-dire que cette analyse peut aussi être effectuée à plus haute concentration, lorsque les pas de 65° sont trop rapides pour être observés. Ainsi, afin de bien

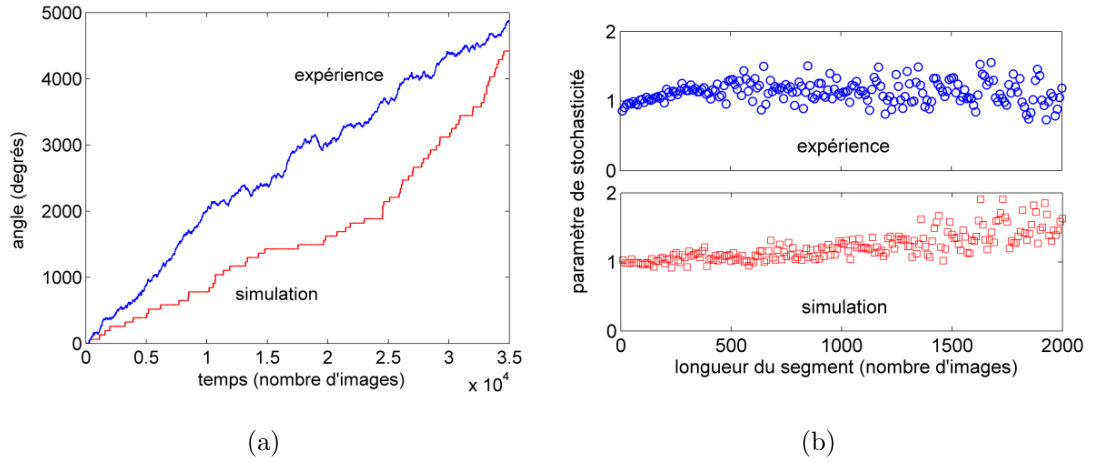


FIGURE IV.6 – **Calcul du paramètre de stochasticité.** (a) Courbe de rotation expérimentale (bleu) et courbe simulée pour un processus poissonien faisant des pas de 65° (rouge). (b) Paramètre de stochasticité calculé pour ces deux courbes en fonction de la taille des segments. La moyenne d'ensemble, permettant de calculer la variance et la moyenne de la position, est obtenue en découpant chaque courbe en segments de taille donnée et en moyennant sur ces segments. La valeur finale du paramètre de stochasticité est obtenue pour un nombre infini de segments, c'est-à-dire pour une taille de segments qui tend vers 0.

comprendre les mécanismes sous-jacents de la polymérisation, nous avons analysé les fluctuations du mouvement en rotation des billes dû à l'activité de hRAD51. Nous avons cherché à calculer le paramètre de stochasticité, défini dans le premier chapitre (page 29) pour la polymérisation et la dépolymérisation, en prenant en compte des pas de 65° .

Méthode de calcul à partir des données expérimentales Dans le cas d'un mouvement de rotation dont la position angulaire, notée $\theta(t)$, progresse par pas de taille α , le paramètre de stochasticité peut être défini par :

$$r = \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{\langle \theta^2(t) \rangle_N - \langle \theta(t) \rangle_N^2}{\alpha \langle \theta(t) \rangle_N}, \quad (\text{IV.3})$$

où les crochets représentent la moyenne sur un ensemble de taille N . Nous souhaitons analyser de cette manière les données issues de la rotation, à faible concentration, de 3 paires bille-ADN (dans le cas de la polymérisation). Il est évident qu'une moyenne sur un ensemble de taille 3 ne serait pas fiable. Pour effectuer une moyenne sur un ensemble de taille suffisante, les données sont mises bout à bout et cette courbe totale est découpée en N sous-parties. La variance et la moyenne sont donc calculées en faisant la moyenne sur ces N sous-parties. Pour vérifier la validité de cette méthode, on a simulé la rotation produite par un moteur poissonien effectuant des pas de 65° avec la même vitesse moyenne que celle de l'expérience (figure IV.6(a), en rouge).

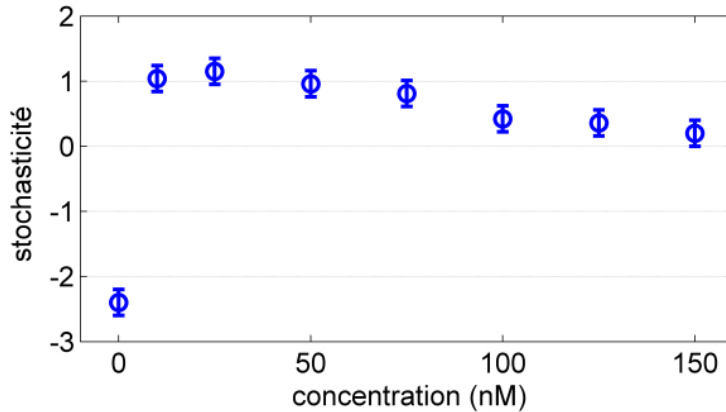


FIGURE IV.7 – **Paramètre de stochasticité obtenu pour la polymérisation et la dépolymérisation de hRAD51.** Stochasticité calculée lors de la polymérisation pour différentes concentrations en hRAD51 de 10nM à 150nM. Pour les faibles concentrations, le paramètre de stochasticité moyen vaut 1. Le paramètre de stochasticité obtenu pour la dépolymérisation est donné pour une concentration de 0nM, il vaut 2,4.

On passe la courbe simulée et la courbe expérimentale dans un programme (écrit en MATLAB) qui découpe chaque courbe en toutes les tailles possibles et calcule à chaque fois le paramètre de stochasticité correspondant. On obtient pour chaque taille une valeur pour le paramètre de stochasticité. La figure IV.6(b) montre ces valeurs en fonction de la taille des segments découpés. On connaît la valeur théorique du paramètre de stochasticité pour la courbe simulée : c'est un moteur poissonien, ce paramètre vaut donc 1. La limite quand le nombre N de sous-parties tend vers l'infini dans la formule IV.3, doit correspondre à la limite quand la taille des parties découpées est nulle. On vérifie sur la figure IV.6(b), courbe du bas, que la stochasticité calculée tend vers 1 quand la taille des segments tend vers 0. On a fait le même test pour un moteur bi-poissonien, ayant deux sous-étapes dans chaque pas, et on trouve également la valeur théorique : $1/2$. Notre méthode de calcul de ce paramètre est donc validée par ces tests sur des courbes simulées. En comparaison, on montre figure IV.6(b), courbe du haut, le résultat obtenu sur la courbe expérimentale montrée figure IV.6(a) (en bleu). Le paramètre de stochasticité tend également vers 1 pour cette courbe expérimentale obtenue pour une concentration de 25nM.

3.6 Stochasticité de la polymérisation

Nous avons calculé le paramètre de stochasticité à partir de courbes expérimentales obtenues à différentes concentrations, ceci est montré figure IV.7 pour des concentrations allant de 10 nM à 150 nM. La moyenne de ce paramètre de stochasticité pour des concentrations inférieures à 50 nM vaut 1. Puis pour des concentrations plus élevées ce paramètre décroît jusqu'à environ 0,3.

Pour les faibles concentrations ($C_{Rad51} \leq 50$ nM), la valeur du paramètre de stochasticité obtenue, 1, confirme l'hypothèse que la polymérisation de hRAD51 est le résultat d'un processus poissonien faisant des pas de 65° en moyenne. Nous avons observé et mesuré les pas de 65° , l'analyse des fluctuations nous montre que ces pas représentent la seule étape limitante du processus pour une concentration de hRAD51 faible.

La décroissance du paramètre de stochasticité aux concentrations plus élevées peut s'expliquer par l'effet de la friction visqueuse sur la rotation de la bille. Celle-ci a pour effet de « gommer » les pas et de lisser la courbe. Ainsi si la vitesse est limitée par la friction visqueuse aux hautes concentrations en protéine, la courbe devrait être linéaire et le paramètre de stochasticité devrait tendre vers 0. On verra plus loin que la saturation de la vitesse peut aussi être due à la formation de plectonèmes, qui devrait *a priori* produire le même effet sur le paramètre de stochasticité.

3.7 Conclusions

Nous venons de voir que l'analyse des fluctuations angulaires montre que les pas de 65° sont l'étape limitante lors de la polymérisation de hRAD51 à des concentrations faibles. Nous avons interprété ces pas de 65° comme l'effet chacun d'un monomère de hRAD51. L'analyse des fluctuations nous confirme dans l'idée que la polymérisation de hRAD51 est le fait de monomères et non de multimères à basse concentration. Le résultat du paramètre de stochasticité à plus haute concentration nous permet même d'étendre cette conclusion à plus haute concentration. En effet, si la polymérisation était le résultat de l'ajout de multimères de taille m , alors un pas de 65° correspondrait à $1/m$ de l'étape limitante. Comme nous calculons le paramètre de stochasticité pour des pas de taille 65° , alors celui-ci devrait donc valoir m (voir définition et interprétation de la stochasticité page 29). Or on observe le contraire, à concentration élevée (50 nM ≤ 150 nM), le paramètre de stochasticité décroît et tend vers 0. Nous pouvons donc exclure l'effet de multimères lors de la polymérisation de hRAD51 pour des concentrations allant jusqu'à 150 nM.

De plus, nous avons montré que dans les conditions expérimentales où nous observons ces pas, la nucléation peut être négligée par rapport à la croissance dans le modèle de nucléation-croissance. Notre interprétation finale de ces résultats est donc que nous observons directement l'ajout de monomères de hRAD51, chacun déroulant l'ADN de 65° en moyenne, ce mécanisme étant dominant durant la phase de croissance du filament nucléoprotéique de hRAD51.

B Dépolymérisation

Après ces expériences nous ayant permis de visualiser directement ces pas de 65° lors de la polymérisation, nous nous sommes intéressés à la dépolymérisation. Celle-ci est difficile à observer tout d'abord parce que le taux de dissociation de

Chapitre IV. Résultats expérimentaux

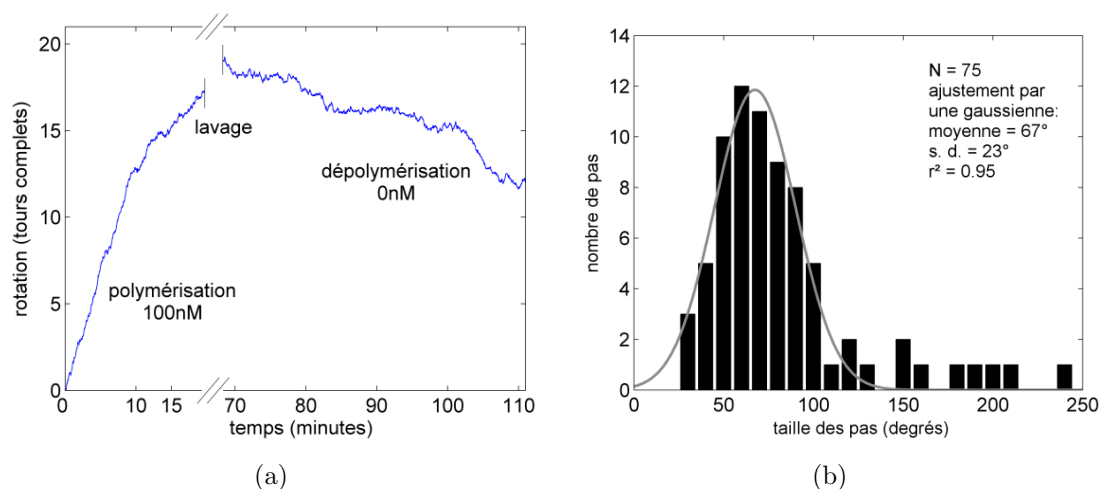


FIGURE IV.8 – **Dépolymérisation.** (a) Expérience complète : initiation et polymérisation à 100nM, suivies d'un long rinçage (après que la rotation de la bille se soit lentement stabilisée), puis dépolymérisation. La dépolymérisation est bien plus lente que la polymérisation, elle est aussi difficile à observer. (b) Histogramme de la taille de 75 pas obtenus de la rotation de 3 paires ADN-billes sur 8 550° en dépolymérisation. Il est ajusté par une distribution normale de moyenne 67° et d'écart-type 23° avec 11% des pas, plus grands, en dehors de cette distribution.

hRAD51 est très faible devant son taux d'association ; leur rapport est estimé à 10^{-6} (voir page 17). Ainsi on a pu observer la bille continuer à faire lentement quelques tours dans le sens de la polymérisation après avoir rincé avec un tampon ne contenant aucune protéine. Il faut donc rincer pendant assez longtemps le canal, mais ceci amène la deuxième difficulté : ne pas perdre la bille. Si l'on a réussi à rincer abondamment la chambre tout en préservant la bille observée, il faut ensuite se montrer patient car la dépolymérisation peut mettre du temps à démarrer et faire de longues pauses.

Sur la figure IV.8(a), on montre une expérience complète. La polymérisation est initiée à une concentration en hRAD51 de 100 nM. La bille tourne dans le sens de la polymérisation à une vitesse de 1,3 RPM pendant environ 10 minutes puis ralentit et tourne à une vitesse de 0,45 RPM pendant encore une dizaine de minutes. La bille a ensuite un mouvement de rotation assez irrégulier avec une vitesse moyenne quasiment nulle. On attend que la bille arrête de tourner et se stabilise dans une position angulaire (non montré) avant de rincer abondamment le canal. On observe ensuite la bille tourner dans le sens opposé pendant encore 40 minutes. Elle a alors une vitesse moyenne assez faible, 0,2 RPM, et peut faire des pauses de plus de dix minutes.

On arrive donc à observer le processus dans les deux sens : polymérisation et dépolymérisation. Ceci n'était pas évident a priori. On aurait pu imaginer, par exemple, que la dépolymérisation soit incapable de produire le couple nécessaire pour faire

tourner la bille.

1 Caractérisation des pas

1.1 Taille des pas

Nous avons observé les courbes de dépolymérisation à haute résolution comme nous l'avons fait pour la polymérisation. A partir des données provenant de la rotation de 3 paires billes-ADN, représentant une rotation totale de $8\ 550^\circ$, 75 pas ont été détectés et mesurés. L'histogramme de la taille de ces pas est montré figure IV.8(b). Il est ajusté par une distribution normale de moyenne 67° et d'écart-type 23° (erreur sur la moyenne : 3°). La taille des pas mesurée lors de la dépolymérisation correspond à celle mesurée lors de la polymérisation en tenant compte de l'incertitude sur la mesure.

1.2 Proportion de pas multiples

Cependant 8 grands pas sortent de cette distribution et représentent 11% du nombre total de pas. La présence de ces pas multiples dans l'histogramme et leur prise en compte dans l'ajustement peut expliquer que la moyenne trouvée soit légèrement supérieure à celle trouvée pour les pas de polymérisation (67° et 65°). La présence de ces pas multiples pourrait s'expliquer par la limite de notre résolution temporelle qui nous empêcherait d'observer des pas se succédant trop vite. Cependant, ces huit pas sont plus nombreux et plus grands que ceux observés lors de la polymérisation, alors que la vitesse moyenne est environ deux fois plus faible : 0,2 RPM contre 0,5 RPM. On reprend le calcul utilisé lors de l'analyse de la polymérisation pour estimer la probabilité qu'au moins deux pas interviennent dans l'intervalle de temps de notre résolution temporelle (voir page 93). La vitesse moyenne de rotation en dépolymérisation est de 0,2 RPM, ce qui donne pour des pas de 67° un temps moyen entre deux pas successifs de 55 secondes. Considérant toujours une résolution temporelle d'environ 5 secondes, on obtient que la probabilité d'avoir au moins deux pas successifs masqués par notre résolution temporelle et donc mesurés comme un seul et unique pas est de 4,5%. Or dans la pratique on en mesure près de trois fois plus, et le plus grand d'entre eux peut correspondre à quatre pas individuels de 65° . Il semble que la limite due à notre résolution temporelle ne soit pas suffisante pour expliquer cette proportion de pas multiples.

2 Stochasticité de la dépolymérisation

De même que pour la polymérisation, on analyse les fluctuations de la rotation lors de la dépolymérisation à partir des données de 3 paires ADN-billes pour une rotation totale de $8\ 520^\circ$. Le paramètre de stochasticité obtenu est montré figure IV.7 pour une concentration de 0 nM. Le résultat est clairement différent de celui obtenu

pour la polymérisation. En effet, ici la valeur absolue du paramètre de stochasticité tend vers 2,4 et non vers 1². Nous avons trouvé précédemment 11% de pas plus grands que ceux donnés par la distribution normale ajustant l'histogramme. La présence de ces pas peut augmenter la variance et donc augmenter le paramètre de stochasticité. Mais 11% de pas multiples ne peuvent suffire à expliquer une augmentation de la stochasticité de 1 à 2,4 [54]. Nous en déduisons donc que, bien que nous ayons observé des pas de 65° environ, la dépolymérisation n'est pas le résultat de l'enchaînement d'étapes limitantes de 65°. De plus, si l'étape limitante est un multiple de celle utilisée dans le calcul de la stochasticité, par exemple $n \times 65^\circ$, alors le paramètre de stochasticité doit être augmenté et valoir n . Comme nous avons mesuré 89% de pas de 65°, l'hypothèse que les double-pas de 130° soient la seule étape-limitante, entraînant un paramètre de stochasticité de 2, doit être rejetée. Dans le cas de la dépolymérisation, un modèle plus complexe doit donc être élaboré pour expliquer le mécanisme moléculaire.

3 Conclusions

Nous avons pu observer la dépolymérisation de filaments formés par hRAD51 dans les pinces magnétiques sensibles au couple. De même que pour la polymérisation, on observe lors de la dépolymérisation des pas d'environ 65° en moyenne. Cependant leur interprétation n'est pas triviale. En effet, le relâchement de la torsion imposée à la molécule d'ADN pourrait être le fruit de : (1) l'hydrolyse de l'ATP par une protéine ou (2) du détachement d'une protéine. Nous n'avons pas pour l'instant de preuve pouvant justifier l'une ou l'autre des explications. De plus ces deux phénomènes, hydrolyse et détachement, peuvent être couplés.

L'analyse des fluctuations lors de la dépolymérisation ne nous permet pas de bien comprendre le mécanisme moléculaire responsable des pas. Cependant, on peut en déduire que la dépolymérisation ne doit pas être exclusivement le fruit de l'action de monomères de hRAD51 ; auquel cas le paramètre de stochasticité aurait valu 1. Néanmoins sur tous les pas mesurés, on observe 89% de pas de 65° en moyenne. Il faut donc proposer un mécanisme plus complexe pour la dépolymérisation qui sera discuté dans le chapitre suivant.

C Mesures de couple

Grâce à ce dispositif expérimental, décrit dans le chapitre précédent, on a pu mesurer directement le déroulement de l'ADN imposé par une seule protéine de hRAD51. Une fois ceci connu, il reste une deuxième grandeur à mesurer afin de pouvoir évaluer l'énergie mise en jeu par protéine : il s'agit du couple. La manière, *a*

2. le signe du paramètre de stochasticité nous sert juste ici à différencier le sens de rotation : positif pour la polymérisation et négatif pour la dépolymérisation

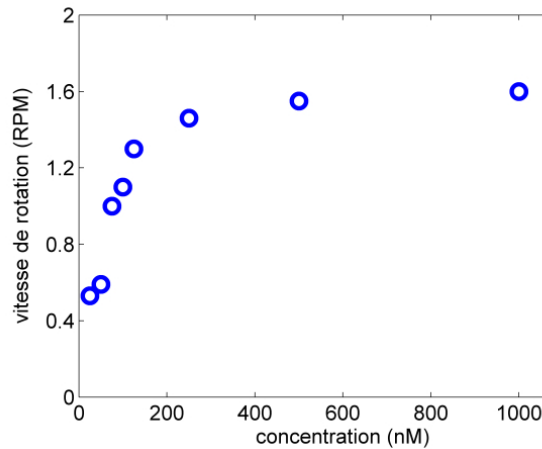


FIGURE IV.9 – Vitesse moyenne de rotation en fonction de la concentration en hRAD51

priori, la plus simple pour mesurer un tel couple est de mesurer la vitesse de rotation de la bille, et connaissant son coefficient de viscosité en rotation, d'en déduire le couple de frottements visqueux.

1 Mesure du couple visqueux à vitesse maximale

1.1 Vitesse maximale de rotation

Ainsi on a étudié la vitesse de rotation en fonction de la concentration en protéine, pour des concentrations allant de 10 nM à 1 μ M. On peut voir dans la figure IV.9, où nous avons reporté la vitesse de rotation en fonction de la concentration de hRAD51 en solution, que la vitesse croît jusqu'à environ 150 nM, puis sature à une vitesse maximale qui vaut environ 1,6 RPM. A partir de cette vitesse maximale, on peut déduire le couple correspondant, si l'on connaît le coefficient de friction visqueuse ξ de la bille. Ce couple, $\Gamma = \xi\omega$, devrait être le couple maximal que la protéine peut produire lors de la polymérisation.

1.2 Calcul du couple visqueux

Nous avons vu dans le chapitre précédent, page 75, que l'on peut mesurer le coefficient de friction visqueuse ξ à partir de l'autocorrélation des fluctuations angulaires de la bille magnétique. Cependant, il faut pour cela enregistrer les fluctuations de la bille avant de commencer l'expérience, et cela n'a pas été possible à chaque fois. A partir des mesures du coefficient de friction visqueuse sur différentes billes, on peut toutefois estimer qu'il vaut 80 pN \cdot nm \cdot s pour une bille magnétique tournant autour de son axe Nord-Sud et décorée par seulement une petite bille, et peut dépasser

Chapitre IV. Résultats expérimentaux

150 pN · nm · s pour une bille tournant autour d'un point de son équateur et pourvue de nombreuses petites billes. Au vu des vidéos montrant la rotation des billes les plus rapides (vitesse d'environ 1,6 RPM), on peut estimer leur coefficient de viscosité en rotation à $\xi = 100 \pm 20$ pN · nm · s. On obtient donc un couple visqueux de 16 ± 3 pNnm. La protéine hRAD51 est donc capable, à forte concentration, de produire un couple d'environ 16 pN · nm pour dérouler la double-hélice d'une molécule d'ADN.

1.3 Discussion

Lorsqu'il s'agit du comportement de l'ADN en torsion, on a vu dans le premier chapitre (p. 32) qu'il existe un couple critique : le couple de formation des plectonèmes. Lorsque ce couple est atteint dans une molécule d'ADN et que l'on cherche à augmenter encore la torsion, alors la contrainte supplémentaire est libérée dans la formation de boucles d'ADN appelées plectonèmes. Cette formation de boucles a lieu à couple constant, elle peut être décrite comme une transition de phase du premier ordre. Il faut donc comparer notre couple maximal à ce couple de formation des plectonèmes. Pour une force de traction d'environ 0,5 pN, ce couple critique vaut : $\Gamma_p = 14,5 \pm 1,5$ pN · nm. Nous avons mesuré que le couple visqueux à vitesse maximale est égal à 16 ± 3 pN · nm. Compte-tenu de l'erreur expérimentale, ces deux couples sont tout à fait comparables. Il est donc probable que la vitesse sature à cause de la formation de plectonèmes entraînant un couple critique qui ne peut être dépassé.

1.4 Difficultés

Calibration sur chaque bille On a vu que la première difficulté consiste à mesurer le coefficient de viscosité en rotation, ξ , avant de commencer l'expérience. Il faut pour cela reconnaître les « bonnes billes », celles capables de tourner sous l'action de la protéine. Pour l'instant il est possible de tester les billes avec l'option pinces magnétiques classiques, mais on a vu que le taux de réussite n'est pas satisfaisant. Il faudrait donc améliorer cette partie, notamment : (1) en automatisant l'enroulement de l'ADN ce qui permettrait de donner davantage de tours ; et (2) en mesurant réellement la hauteur de la bille (pour l'instant uniquement « à l'œil »), ceci nécessitant encore un travail sur l'illumination et le traitement des données. L'autre possibilité serait de mesurer le mouvement brownien de la bille après l'expérience avec hRAD51. Mais il faut pour cela être capable de dépolymériser complètement le filament et éventuellement de savoir s'il reste des protéines sur l'ADN (ceci est obtenu dans les pinces magnétiques classiques par la mesure d'une courbe force-extension qui est comparée à celle de l'ADN nu).

Champ magnétique horizontal Ces expériences ont également été rendues difficiles par la présence du champ magnétique résiduel, qui, d'une expérience à l'autre,

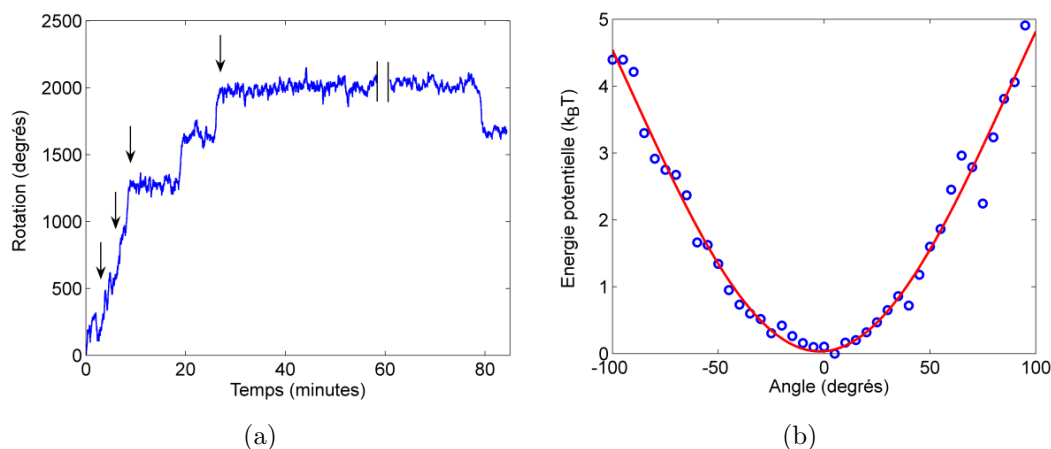


FIGURE IV.10 – **Mesure du couple d’arrêt de la polymérisation** (a) Une fois la polymérisation initiée à 250nM en protéines, la pointe magnétique est baissée par pas de 500 μm (flèches rouges). Ceci augmente le couple magnétique dû au champ magnétique horizontal. La rotation est tout d’abord ralentie par de longues pauses lorsque le moment magnétique de la bille est aligné avec le champ. Finalement la rotation est arrêtée pendant plus de 30 minutes. (b) Énergie potentielle mesurée à partir des fluctuations angulaires de la bille entre $t = 28$ et $t = 42$ minutes. La constante de rappel en torsion équivalente vaut $\Gamma_{max} = 14.8 \pm 2 \text{ pN} \cdot \text{nm}$.

pouvait varier. Ainsi même pour des concentrations élevées ($C > 100\text{nM}$), on a observé des vitesses de rotation moyennes faibles (de l’ordre de 0,4 RPM). Dans ce cas, la bille pouvait rester bloquée pendant plusieurs minutes à chaque tour. De la même manière que pour le coefficient de viscosité, une calibration sur la « bonne » bille avant l’expérience, aurait permis d’ajuster le champ magnétique.

2 Mesure du couple d’arrêt

2.1 Principe

Comme on l’a évoqué dans le premier chapitre pour les moteurs linéaires, la mesure de la force d’arrêt et du pas d’un moteur tel que la kinésine permet de calculer l’énergie mécanique maximale que peut produire ce moteur. Pour appliquer la même démarche à la protéine hRAD51 lors de l’étape de polymérisation, il faut mesurer un couple d’arrêt et un pas angulaire. Le pas a été mesuré dans la partie précédente, il vaut environ 65° , reste à mesurer le couple d’arrêt. Pour cela on utilise le champ magnétique résiduel qui impose un couple d’une dizaine de $\text{pN} \cdot \text{nm}$ et que l’on peut faire varier en changeant la hauteur de la pointe magnétique au-dessus de l’échantillon. Le déroulement de l’expérience est le suivant : on initie la polymérisation dans les conditions utilisées jusqu’à présent (force d’environ 0,5 pN, pointe relativement haute) avec une concentration en protéines de 250 nM ; lorsque

Chapitre IV. Résultats expérimentaux

la bille tourne, on descend la pointe magnétique par pas de 500 μm (marqués par les flèches sur la figure IV.10(a)) jusqu'à ce que la bille cesse de tourner.

Remarque On a vu dans le premier chapitre que Rad51 étire et déroule la molécule d'ADN lorsqu'elle polymérise pour former le filament nucléoprotéique. Il y a donc deux composantes à mesurer dans le travail mécanique : le travail en rotation et le travail en extension. Or pour mesurer celui-ci, il faut appliquer une force dans la direction opposée à celle créée par la protéine, c'est-à-dire qu'il faut comprimer la molécule d'ADN ! Dans ce cas, la force appliquée sera dissipée par la courbure de la molécule en pelote. Il paraît donc très difficile de mesurer directement ce travail linéaire. Dans notre expérience, la molécule d'ADN est tirée par une force d'environ 0,5 pN, on aide donc la protéine à étirer l'ADN. Cette contribution peut être calculée et comparée aux autres énergies mises en jeu.

2.2 Résultats

L'expérience a été réalisée une seule fois, le suivi angulaire de cette bille est montré figure IV.10(a). La polymérisation est initiée à 250 nM. La vitesse de rotation initiale est d'environ 0,4 RPM, puis l'on commence à descendre la pointe magnétique. On voit que des pauses tous les tours apparaissent. Finalement la bille ne tourne plus pendant plus de 30 minutes. Le canal d'observation est ensuite abondamment rincé avec un tampon supposé provoquer la dépolymérisation massive (tampon dépolymérisation, voir annexe A) dans le but d'éliminer le filament et de retrouver l'ADN nu. On souhaite en effet mesurer le couple magnétique sur l'ADN nu pour être sûr s'éviter un éventuel biais dû aux protéines. Après le rinçage, on observe que la bille tourne dans la direction opposée, relâchant environ 1 tour de torsion.

Mesure du couple Étant donné que la bille a encore tourné après le rinçage, il est possible qu'il reste des protéines sur la molécule d'ADN et que celles-ci continuent à dépolymériser. On a donc calculé le couple sur la partie de la courbe où les fluctuations sont les plus régulières et durent le plus longtemps, c'est-à-dire après le dernier mouvement de la pointe (entre $t = 28$ minutes et $t = 42$ minutes). Comme décrit dans le chapitre précédent (en 2.3, p. 73) à partir de l'histogramme de la position angulaire de la bille, on peut calculer l'énergie potentielle vue par la bille. Celle-ci est montrée figure IV.10(b), où les points correspondent aux données calculées à partir de l'histogramme et la ligne continue correspond à l'ajustement par une fonction sinus dont l'amplitude est $U_{max} = 3,6 \pm 0,5 \text{ k}_B\text{T}$. Comme décrit précédemment, le couple, qui est la dérivée par rapport à la position angulaire de l'énergie potentielle, est une fonction cosinus d'amplitude $\Gamma_{max} = U_{max}$. Ainsi, le couple maximal appliqué à la bille lorsque la rotation est arrêtée est $\Gamma_{max} = 14.8 \pm 2 \text{ pN} \cdot \text{nm}$.

Comme on l'a vu dans la partie précédente, à chaque fois que l'on mesure un couple sur une molécule d'ADN il faut le comparer au couple critique de for-

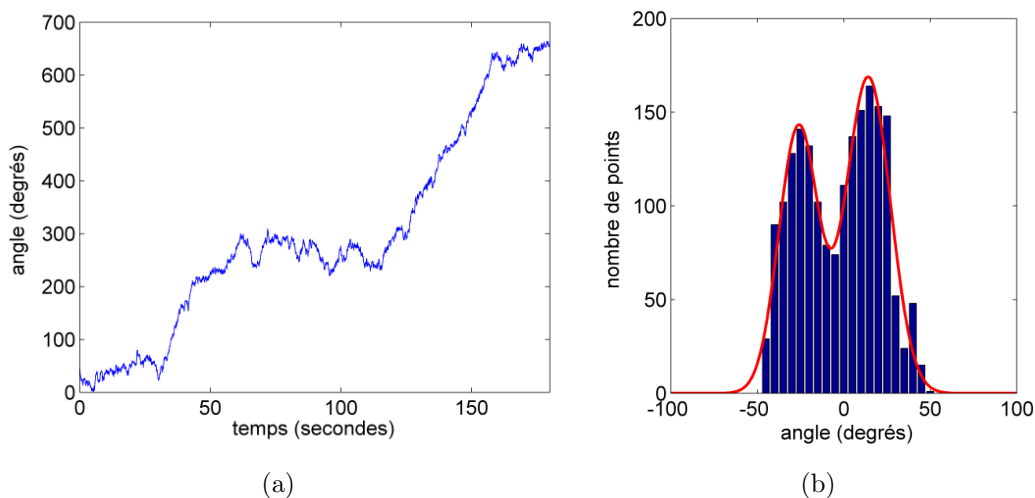


FIGURE IV.11 – **Observation détaillée des paliers tous les 360°** (a) Exemple de longue pause observée dans une courbe expérimentale montrant des pauses tous les tours environ. Des minutes 50 à 110 environ, la rotation moyenne est nulle, mais en détails on observe des pas en avant et en arrière, des aller-retours entre deux positions angulaires. (b) Histogramme de la position angulaire au cours de la pause montrée en (a). On observe deux pics, l’ajustement de chacun des deux pics par une gaussienne donne une distance entre les deux pics de 40° .

mation des plectonèmes. Ici, étant donné que l’on a baissé la pointe magnétique pour augmenter le couple magnétique, la force est légèrement plus élevée que dans les expériences précédentes. On mesure sur un palier de la courbe figure IV.10(a) $F = 0,7$ pN. Le couple critique de formation des plectonèmes vaut à cette force : $\Gamma_p = 17,3 \pm 1$ pN · nm. Il est donc légèrement supérieur au couple mesuré, mais au vu de l’erreur expérimentale on ne peut pas conclure que l’on mesure bien un couple différent de celui pour former les plectonèmes.

2.3 Observation détaillée des paliers

Nous avons observé dans beaucoup de courbes de polymérisation obtenues à faible concentration, que la rotation faisait de longues pauses à chaque tour complet. En regardant en détails ces paliers, on peut observer dans certains cas que la bille fait des sauts en avant et en arrière alternativement entre deux positions angulaires privilégiées. On montre figure IV.11(a) l’exemple d’un tel palier obtenu pour une concentration en hRAD51 de 50 nM. Lorsque la bille atteint environ 300° , elle recule ensuite jusqu’à environ 250° , puis retourne jusqu’à environ 300° , et ceci pendant environ une minute. Finalement la bille tourne de manière plus régulière de 250° à 620° environ, ce qui représente environ un tour complet. Pour quantifier ces pas aller-retour, on trace l’histogramme de la position angulaire pendant le palier. On peut voir figure IV.11(b) celui correspondant à la courbe montrée figure IV.11(a).

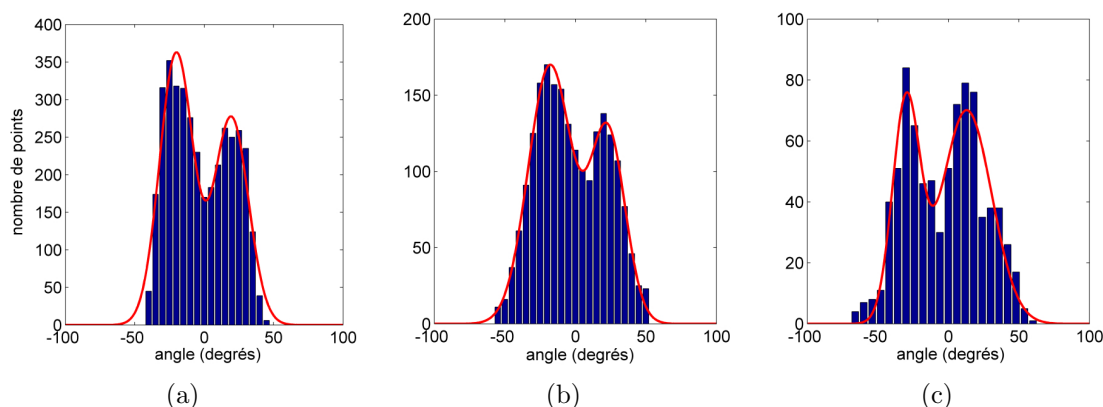


FIGURE IV.12 – **Histogramme de la position angulaire de trois autres paliers montrant des aller-retours.** Distance entre les deux pics ajusté par des gaussiennes : (a) 40° , (b) 41° et (c) 43° . Ces données proviennent d'expériences réalisées à des concentrations de 50 à 75 nM en hRAD51.

On distingue facilement deux pics séparés de 40° , la courbe rouge représente l'ajustement par la somme de deux gaussiennes. Cette analyse a été effectuée également sur trois autres paliers présentant le même comportement bimodal et obtenus à des concentrations de 50 et 75 nM (figure IV.12, $\Delta\theta = 43, 40$ et 41°). On observe toujours une distribution bimodale présentant deux positions angulaires préférentielles séparées de 41° en moyenne.

Interprétation On interprète ces pas en avant et en arrière, situés sur de longs paliers espacés de 360° en moyenne, comme l'effet du couple magnétique qui arrête momentanément la rotation de la bille. Le fait de voir ces aller-retour montre que les probabilités de faire un pas en avant et en arrière sont comparables, c'est-à-dire que l'on est au couple d'arrêt de la polymérisation. Ici, pour des concentrations de 50 à 75 nM, le couple magnétique n'a pas pu être mesuré précisément, mais on a pu mesurer la taille du pas lorsque l'on applique le couple d'arrêt. Ce pas est plus petit que celui mesuré page 92. Tous les pas observés avaient alors été mesurés : aussi bien lorsque le couple est contre la rotation que lorsqu'il l'aide. On peut penser que dans le premier cas les pas sont plus courts alors que dans le second cas ils sont plus longs. Il est alors logique de trouver des pas plus courts que la moyenne lorsque le couple est maximal et vaut le couple d'arrêt.

2.4 Conclusions

Nous avons appliqué, sans le vouloir, un couple égal au couple d'arrêt de la polymérisation de hRAD51 pour des concentrations de 50 à 75 nM. D'autre part

dans l'expérience décrite en 2.2 (effectuée à 250 nM), on a pu arrêter complètement la polymérisation en augmentant le champ magnétique horizontal. Le fait de ne voir aucun aller-retour lorsque la rotation est arrêtée dans cette expérience, et la valeur assez proche du couple critique de formation des plectonèmes nous avait incités à la prudence. Mais l'analyse de ces paliers à distribution bimodale lors d'expériences différentes, à concentration plus faible, et dans lesquelles on n'a pas cherché à augmenter le couple, suggère que l'on est toujours très proche du couple d'arrêt. Ainsi, il est très probable que l'on arrête véritablement la polymérisation en imposant un couple légèrement supérieur au couple d'arrêt dans l'expérience décrite en 2.2.

A partir de la taille des pas au couple d'arrêt, $\Delta\theta_{stop}$ (mesurée en 2.3), et du couple d'arrêt, Γ_{stop} (mesuré en 2.2), on peut estimer l'énergie mécanique maximale produite par la protéine :

$$E_{max}^{meca} = \Gamma_{stop} \times \Delta\theta_{stop} = 10,6 \text{ pN} \cdot \text{nm}. \quad (\text{IV.4})$$

On a vu dans le premier chapitre que hRAD51 hydrolyse l'ATP, cette réaction lui fournit pour une molécule d'ATP environ 80 pN · nm. Par ailleurs, dans notre expérience, la molécule d'ADN est étirée par la force de traction de l'aimant, ceci aide la recombinaise en lui fournissant de l'énergie lorsqu'elle étire l'ADN de 1,5 fois dans le filament. On estime cette énergie à 0,4 pN · nm pour une force de 0,7 pN, ce qui est négligeable devant l'énergie délivrée par l'hydrolyse de l'ATP. On a vu précédemment que hRAD51 est capable d'accomplir les trois étapes de la recombinaison homologue sans hydrolyser l'ATP, la restriction étant qu'elle n'est pas capable de dépolymériser à la fin du processus. Ainsi l'hydrolyse d'une seule molécule d'ATP par protéine doit être suffisante pour accomplir les trois étapes, la dépolymérisation permettant de revenir à l'état initial. Il est donc intéressant de comparer l'énergie mécanique mesurée à l'énergie fournie par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Ainsi nous montrons que hRAD51 n'utilise pas davantage que 13% de l'énergie totale disponible lors de l'étape de polymérisation sur une molécule d'ADN double-brin.

3 Modélisation

Afin de rendre nos expériences plus quantitatives et de les comparer à la littérature, nous en avons développé un modèle dynamique en collaboration avec Jacques Prost.

3.1 Description du modèle

On souhaite modéliser le comportement d'une molécule unique d'ADN double-brin, de longueur L , dont l'une des extrémités est fixée et l'autre est liée à une bille micrométrique, lors de la polymérisation de Rad51. Pour cela, on définit deux

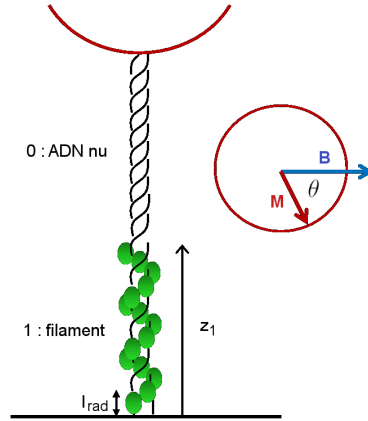


FIGURE IV.13 – **Modélisation de l'expérience** Schéma explicatif des notations utilisées dans le modèle.

régions : l'ADN nu, dont les grandeurs sont notées avec l'indice 0, et l'ADN dans le filament nucléoprotéique, noté 1, qui s'étend de l'altitude $z = 0$ à $z = z_1$. L'énergie libre de la molécule d'ADN peut s'écrire :

$$F = \frac{K_0}{2} \int_{z_1}^L dz \left(\frac{d\theta}{dz} - q_0 \right)^2 + \frac{K_1}{2} \int_0^{z_1} dz \left(\frac{d\theta}{dz} - q_1 \right)^2, \quad (\text{IV.5})$$

où K_0 et K_1 sont les modules de torsion de l'ADN nu et de l'ADN dans le filament et q_0 et q_1 sont les torsion à l'équilibre de l'ADN nu et de l'ADN dans le filament.

D'autre part on cherche à exprimer le potentiel chimique de Rad51 de manière à ce qu'il reflète l'effet de l'état de torsion de l'ADN sur la cinétique de polymérisation. Il est composé de deux termes : un terme purement chimique lié à la polymérisation, $\Delta\mu^0$; et un terme d'origine mécanique, lié à la déformation engendrée sur l'ADN, $\Delta\mu^{meca}$. On évalue $\Delta\mu^{meca}$, en calculant la variation d'énergie libre de la molécule d'ADN lors de l'ajout d'un monomère de Rad51 qui vaut :

$$\Delta\mu_{ADN}^{meca} = l_{rad} \frac{\partial F}{\partial z_1}. \quad (\text{IV.6})$$

Ainsi la variation de potentiel chimique « mécanique » de Rad51 est l'opposée de celle de l'ADN, et la variation de potentiel chimique totale est :

$$\begin{aligned} \Delta\mu &= \Delta\mu^0 - l_{rad} \left(\frac{\partial F}{\partial z_1} \right) \\ &= \Delta\mu^0 + \frac{l_{rad}}{2} \left[K_0 \left(\frac{d\theta}{dz} - q_0 \right)^2 - K_1 \left(\frac{d\theta}{dz} - q_1 \right)^2 \right]_{z_1}, \end{aligned} \quad (\text{IV.7})$$

où l_{rad} est le changement de longueur de la zone 1 lors de l'ajout d'un monomère.

La vitesse de polymérisation de Rad51 est donnée par :

$$\frac{dn}{dt} = k_b \cdot C_{Rad51} - k_u, \quad (\text{IV.8})$$

où n est le nombre de protéines dans le filament, k_b et k_u les taux d'association et de dissociation de Rad51 sur le filament en formation. On connaît seulement le rapport entre ces deux grandeurs qui est :

$$\frac{k_b}{k_u} = e^{-\Delta\mu/k_B T}, \quad (\text{IV.9})$$

avec $\Delta\mu$ donné par l'équation IV.7. Étant donné que l'on n'a qu'une seule équation pour relier k_b et k_u (eq. IV.9), on est obligé d'introduire un paramètre supplémentaire, p , compris entre 0 et 1, pour obtenir séparément les expressions de k_b et de k_u . Ainsi :

$$\begin{aligned} k_b &= k_b^0 e^{-p\Delta\mu^{mecc}/k_B T} = k_b^0 e^{-p\frac{l_{rad}}{2k_B T} \left[K_0 \left(\frac{d\theta}{dz} - q_0 \right)^2 - K_1 \left(\frac{d\theta}{dz} - q_1 \right)^2 \right]_{z_1}} \\ k_u &= k_u^0 e^{-(p-1)\Delta\mu^{mecc}/k_B T} = k_u^0 e^{-(p-1)\frac{l_{rad}}{2k_B T} \left[K_0 \left(\frac{d\theta}{dz} - q_0 \right)^2 - K_1 \left(\frac{d\theta}{dz} - q_1 \right)^2 \right]_{z_1}}. \end{aligned} \quad (\text{IV.10})$$

On peut maintenant exprimer la vitesse linéaire de polymérisation de Rad51, en fonction des paramètres intéressants, à partir des équations IV.8 et IV.10 :

$$\frac{1}{l_{rad}} \frac{dz_1}{dt} = C_{Rad51} k_b^0 e^{-p\Delta\mu^{mecc}/k_B T} - k_u^0 e^{-(p-1)\Delta\mu^{mecc}/k_B T}, \quad (\text{IV.11})$$

avec $z_1 = n \cdot l_{rad}$.

Nous avons pour l'instant couplé la polymérisation de Rad51 à l'état de torsion de l'ADN. Dans l'expérience, on mesure la rotation de la bille magnétique, il faut donc maintenant coupler l'ADN à la bille. La bille est un milieu visqueux et son coefficient de friction visqueuse en rotation est ξ . Elle subit un couple de la part de l'ADN auquel elle est liée qui tend à la faire tourner, elle subit aussi un couple magnétique dû au champ magnétique horizontal résiduel, M , comme observé expérimentalement. On peut donc écrire son équation mécanique :

$$\xi \frac{d\theta(L)}{dt} = - \left. \frac{\partial F}{\partial \theta} \right|_{z=L} - MB \sin(\theta(L)), \quad (\text{IV.12})$$

où $\theta(L)$ est la position angulaire de l'ADN au bout de la molécule d'extension L , c'est-à-dire au contact de la bille. On prend la position angulaire de la bille égale à $\theta(L)$, alors qu'expérimentalement un décalage constant peut exister. On suppose que l'on est toujours à l'équilibre mécanique dans chacune des régions 0 et 1, ce qui par Euler-Lagrange impose :

$$\frac{\partial^2 \theta}{\partial z^2} = 0. \quad (\text{IV.13})$$

Chapitre IV. Résultats expérimentaux

Ainsi, dans le domaine i , on peut écrire :

$$\theta_i(z) = a_i z + b_i, \quad (\text{IV.14})$$

avec a_i la torsion constante et b_i une constante. Ceci permet d'exprimer $\left. \frac{\partial F}{\partial \theta} \right|_{z=L}$ dans l'équation mécanique (eq. IV.12) et $\frac{d\theta}{dz}$ dans le potentiel chimique (eq. IV.7). On choisit arbitrairement la position angulaire à l'extrémité fixée de l'ADN comme $\theta_1(0) = 0$, ce qui impose $b_1 = 0$. La continuité de l'angle et du couple en $z = z_1$ nous permettent d'éliminer b_0 et a_1 en les exprimant fonction des autres paramètres. Ainsi :

$$a_0 - q_0 = \frac{\theta - q_0 L + z_1(q_0 - q_1)}{L - z_1(1 - K_0/k_1)}. \quad (\text{IV.15})$$

Finalement on a donc un système d'équation, dont l'écriture simplifiée est :

$$\xi \frac{d\theta}{dt} = -K_0(a_0 - q_0) - MB \sin(\theta) \quad (\text{IV.16a})$$

$$\frac{1}{l_{rad}} \frac{dz_1}{dt} = C_{Rad51} k_b^0 e^{-p\Delta\mu^{meca}/k_B T} - k_u^0 e^{-(p-1)\Delta\mu^{meca}/k_B T} \quad (\text{IV.16b})$$

$$\Delta\mu^{meca} = \frac{l_{rad}}{2} [K_0(a_0 - q_0)^2 - K_1(a_1 - q_1)^2] \quad (\text{IV.16c})$$

3.2 Intégration numérique et résultat

On souhaite résoudre ce système d'équations et obtenir $\theta(t)$ et $z_1(t)$. Or ces deux variables sont couplées non linéairement (via exponentielle et sinus) dans le système d'équation précédent. C'est pourquoi nous avons décidé d'intégrer numériquement ce système d'équations. Le programme d'intégration numérique a été écrit en C++ (méthode d'Euler, voir annexe E) en collaboration avec Paolo Pierobon. Les paramètres suivants sont à donner au programme :

- k_b^0 : constante d'association de Rad51 ($10^{-3} \text{ nM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, voir p.17)
- k_u^0 : constante de dissociation de Rad51 (10^{-6} s^{-1} , voir p.17)
- K_0 : constante de raideur en torsion de l'ADN nu ($300 \text{ pN} \cdot \text{nm}^2$, voir p.32)
- K_1 : constante de raideur en torsion de l'ADN dans le filament
- q_0 : la torsion à l'équilibre dans l'ADN nu ($2\pi/3,4 \text{ rad} \cdot \text{nm}^{-1}$, voir p.30)
- q_1 : la torsion à l'équilibre dans le filament ($2\pi/10 \text{ rad} \cdot \text{nm}^{-1}$, voir p.16)
- L : la longueur de la molécule d'ADN ($5 \text{ }\mu\text{m}$)
- l_{rad} : la longueur d'un monomère sur l'ADN dans le filament ($1,78 \text{ nm}$, voir p.16)
- MB : l'intensité du couplage magnétique ($4 \text{ k}_B T$, voir p.74)
- ξ : le coefficient de viscosité en rotation ($100 \text{ s} \cdot \text{pN} \cdot \text{nm}$, voir p.75)
- C_{Rad51} : la concentration en Rad51
- le paramètre p .

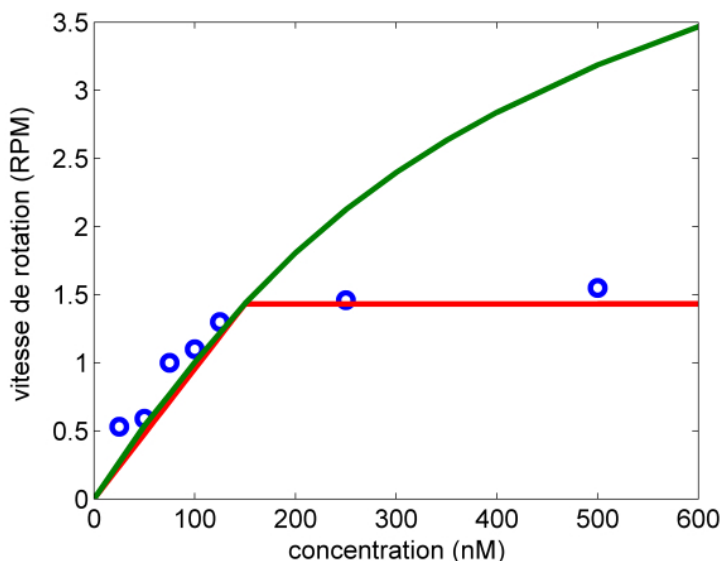


FIGURE IV.14 – **Courbes obtenues par intégration numérique à partir du modèle.** En vert : le modèle sans formation de plectonèmes; en rouge : le modèle avec la formation de plectonème au-delà d'un couple critique; les points expérimentaux sont représentés par des cercles.

On connaît au moins l'ordre de grandeur de la plupart de ces paramètres. Ainsi les constantes d'association et de dissociation de Rad51 ont été mesurées, principalement par des expériences de biochimie. La constante de raideur en torsion de l'ADN a été mesurée et évaluée principalement à partir d'expériences de molécule unique. Les torsions à l'équilibre de l'ADN nu et de l'ADN dans le filament sont connues essentiellement grâce à des expériences de microscopie électronique, tout comme l_{rad} . La longueur de l'ADN est connue, puisque nous construisons nous-même la molécule utilisée. La concentration en protéine est un paramètre contrôlé de l'expérience. L'intensité du couplage magnétique est également un paramètre de l'expérience mais pour l'instant peu contrôlé, il est néanmoins mesuré. Il en va de même pour le coefficient de viscosité en rotation ξ . Les deux seules inconnues sont le paramètre p et la constante de raideur en torsion de l'ADN dans le filament, K_1 . Ces deux valeurs ont une influence limitée sur le résultat de l'intégration limitée. Ils ne changent pas l'allure de la courbe mais jouent essentiellement sur la vitesse de polymérisation maximale. On suppose que l'ADN dans le filament est plus rigide en torsion que lorsqu'il est nu. Pour des valeurs de K_1 supérieures à $1000 \text{ pN} \cdot \text{nm}^2$, on ne voit pas de différences sur la courbe de polymérisation dans le régime stationnaire.

On souhaite se servir de ce modèle pour comprendre la courbe expérimentale de la vitesse moyenne de rotation de la bille en fonction de la concentration en hRAD51. Le résultat de l'intégration numérique, avec les paramètres donnés par la littérature

ainsi que $p = 0,1$ et $K_1 = 1000$, est montré figure IV.14, courbe verte. On peut voir sur cette figure que le début de la courbe correspond bien aux données expérimentales (cercles bleus) alors qu'au-delà d'environ 150nM, elle ne reflète plus du tout le comportement observé expérimentalement et en particulier la saturation de la vitesse. On a ensuite fait varier tous les paramètres de plusieurs ordres de grandeur, mais aucun jeu de paramètre ne permet d'obtenir le comportement expérimental. Le modèle, tel quel, n'est donc pas pertinent pour expliquer notre expérience, le problème étant que l'on ne prédit pas cette saturation en vitesse.

3.3 Ajout du couple critique de formation de plectonèmes

La figure IV.14, vitesse en fonction de la concentration, est en fait équivalente à la courbe couple en fonction de la concentration. On doit donc s'interroger sur le couple qui limite ainsi la vitesse de rotation. Dans le modèle, le seul ingrédient qui puisse provoquer une telle saturation vient du couple visqueux comparé au couple maximal que peut produire la protéine. Or manifestement cet ingrédient est insuffisant car la saturation qu'il provoque intervient pour un couple bien supérieur à celui observé.

La formation des plectonèmes a donc été rajoutée dans le modèle sous la forme d'un couple critique qui limite le couple contraignant la molécule d'ADN, Γ_0 . Dans le modèle, le couple dans le domaine i est donné par :

$$\Gamma_i = K_i(a_i - q_i). \quad (\text{IV.17})$$

Lors de l'intégration numérique, au début de chaque itération, le couple Γ_0 est calculé et comparé à Γ_p . Tant qu'il reste inférieur, le programme reste identique au programme sans plectonème. Mais dès que $\Gamma_0 \geq \Gamma_p$, alors on impose $\Gamma_0 = \Gamma_p$ et la suite du programme utilise cette valeur pour calculer les autres grandeurs.

3.4 Résultat avec plectonèmes

Le résultat de l'intégration numérique avec ce couple critique de formation des plectonèmes et les mêmes paramètres que précédemment est montré sur la figure IV.14, courbe rouge. On voit que les deux courbes issues du modèle se superposent pour une concentration inférieure à 150nM. Mais lorsque la vitesse atteint la valeur correspondant au couple critique, alors la courbe rouge (avec plectonèmes) sature en formant un angle net, et la vitesse reste constante pour les concentrations plus élevées. Ceci correspond beaucoup mieux au comportement de la courbe expérimentale (cercles bleus).

La variation des deux seuls paramètres inconnus (K_1 et p) ne modifie que très peu la partie de la courbe aux concentrations faibles. La saturation ne dépend que d'un seul paramètre : le couple critique. Ainsi ce modèle ajuste bien les données expérimentales sans aucun ajustement de paramètre libre. Cette modélisation nous permet de conclure que la saturation de la vitesse de rotation avec la concentration

est due à la formation de plectonèmes. Le modèle ajuste très bien la première partie de la courbe avec les paramètres de la littérature, sans jouer sur aucun autre paramètre libre, cela montre que notre expérience est fiable et que l'on peut en tirer des résultats quantitatifs.

Remarque La pente de la courbe simulée n'est pas continue lorsque l'on atteint le couple critique. Même si les points expérimentaux ne nous permettent pas de comparer ce point précis, il est très probable que la courbe expérimentale complète montre une transition sans discontinuité de la pente. En effet, dans notre modèle, l'agitation thermique de l'ADN n'est pas prise en compte. Ceci a pour effet qu'à une concentration donnée corresponde un couple précis, alors que dans la réalité ce couple $\Gamma(C)$ doit être bruité entraînant une transition plus douce.

4 Potentiel chimique au couple d'arrêt

A partir du modèle décrit dans la partie 3 et de la mesure du couple d'arrêt, on peut essayer de déduire la valeur du potentiel chimique de la polymérisation de hRAD51. On reprend le système d'équation qui figure page 110. Si l'on est au couple d'arrêt de la polymérisation alors :

1. la bille ne tourne plus, c'est-à-dire $d\theta/dt = 0$
2. le filament ne croît plus, c'est-à-dire $dz_1/dt = 0$.

L'affirmation 1 ci-dessus implique que l'équation IV.16a devienne :

$$MB \sin(\theta) = -K_0(a_0 - q_0). \quad (\text{IV.18})$$

De même, la deuxième affirmation implique, à partir de l'équation IV.16b :

$$\frac{k_b^0}{k_u^0} = \frac{1}{C} e^{\Delta\mu/k_B T}. \quad (\text{IV.19})$$

Les équations IV.18 et IV.16c permettent d'exprimer le potentiel chimique en fonction du couple d'arrêt :

$$\Delta\mu = \frac{l_{rad}}{2} \left[\frac{(MB \sin \theta)^2}{K_0} - K_1(a_1 - q_1)^2 \right]. \quad (\text{IV.20})$$

A ce point, on est obligé de faire une hypothèse supplémentaire puisque l'on ne connaît par la valeur du terme d'énergie en torsion dans le filament. On suppose que le filament est infiniment rigide et que, par conséquent, la torsion dans le filament est égale à celle à l'équilibre. Ainsi ce terme énergétique est nul, et on obtient

Chapitre IV. Résultats expérimentaux

une expression du potentiel chimique qui ne dépend que du couple d'arrêt et des grandeurs connues :

$$\Delta\mu = \frac{l_{rad}}{2K_0}(MB \sin \theta)^2. \quad (\text{IV.21})$$

Finalement on peut injecter cette expression du potentiel chimique dans l'équation IV.19, on obtient :

$$\frac{k_b^0}{k_u^0} = \frac{1}{C} \exp \left[\frac{l_{rad}}{2K_0 k_B T} (MB \sin \theta)^2 \right]. \quad (\text{IV.22})$$

Avec les valeurs utilisées dans l'intégration numérique pour $l_{rad}, K_0, k_B T$, avec la concentration en hRAD51 qui vaut 250nM dans cette expérience et $MB \sin \theta = \Gamma_{max} = 16 \pm 2 \text{ pN} \cdot \text{nm}$, l'application numérique donne :

$$\frac{k_b^0}{k_u^0} = 4,8 \cdot 10^6 \pm 0,5 \text{ M}^{-1}. \quad (\text{IV.23})$$

Dans le premier chapitre (tableau figure I.5, page 17), on a vu que ce rapport entre les constantes d'association et de dissociation de hRAD51 est estimé à $5,7 \cdot 10^6 \pm 1 \text{ M}^{-1}$ en présence d'ATP γ S. Nous obtenons donc une valeur tout à fait compatible avec les résultats obtenus par des expériences d'enzymologie. Ceci confirme l'hypothèse que l'on mesure effectivement le couple d'arrêt de la polymérisation de hRAD51 et non pas le couple critique de formation des plectonèmes.

D Expériences tentées

1 Polymérisation avec des analogues non-hydrolysables de l'ATP.

On souhaite étudier l'activité de la recombinaise hRAD51 et en particulier dresser le panorama énergétique de la réaction de recombinaison homologe. hRAD51 est une ATPase, elle est capable d'hydrolyser l'ATP dans une réaction qui dégage de l'énergie. Il est donc intéressant de bloquer cette source d'énergie et d'étudier le comportement de la protéine. On sait par des études en solution, qu'en présence d'analogues non-hydrolysables de l'ATP, hRAD51 est toujours capable de polymériser sur l'ADN et d'échanger les brins. Cependant, d'après des études de microscopie électronique notamment (voir chapitre 1, p.16), le filament formé avec ces analogues d'ATP ne présente pas la même structure avec un pas hélical plus court. En observant la polymérisation de hRAD51 sans hydrolyse de l'ATP dans nos pinces magnétiques sensibles au couple, nous pourrions comparer la torsion induite et l'énergie produite par la protéine par rapport aux conditions « normales ». Ces expériences ont été réalisées deux fois en présence d'ATP γ S (analogue très faiblement hydrolysable), et une fois seulement en présence d'AMP-PNP (analogue non hydrolysable).

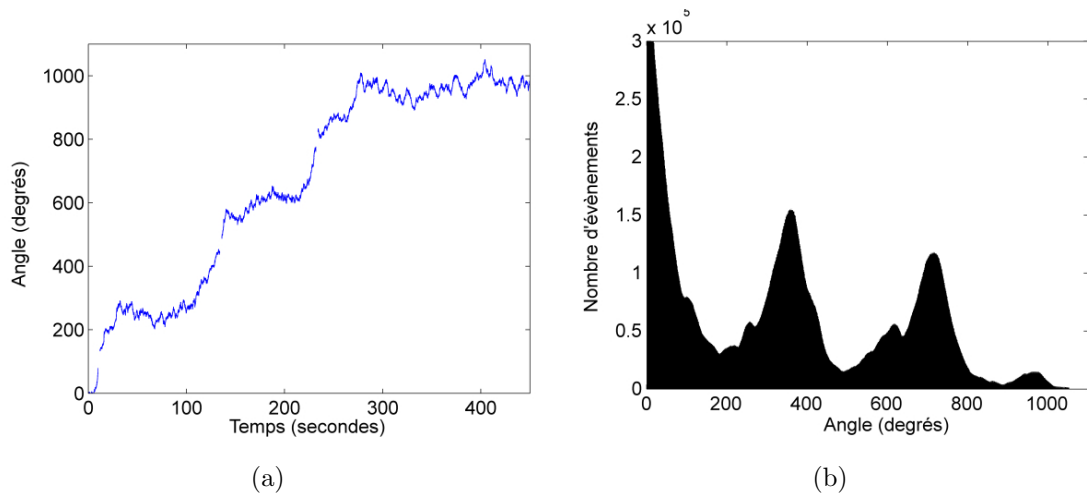


FIGURE IV.15 – Polymérisation en présence d'ATP γ S, analogue très faiblement hydrolysable de l'ATP. (a) Position angulaire de la bille en fonction du temps. (b) Analyse « pairwise » correspondante.

1.1 En présence d'ATP γ -S

On montre figure IV.15(a) une des deux expériences de polymérisation où l'ATP est remplacé par de l'ATP γ S (la seconde n'a eu un mouvement rotation global que de quelques centaines de degrés). La bille a tourné d'environ 1000° en 280 secondes, ce qui représente une vitesse moyenne de 0,6 RPM. La rotation n'a pas lieu à vitesse constante mais deux pauses d'environ une minute sont visibles à environ 250° et 600°, puis finalement la rotation est stoppée pendant plus de trois minutes à environ 950°. En résumé la bille tourne d'un peu moins de trois tours, en marquant une pause à chaque tour, pour une position angulaire particulière : lorsque l'aimantation de la bille et le champ magnétique horizontal sont alignés. On peut également distinguer sur cette courbe quelques pauses beaucoup plus courtes marquant des pas entre les longues pauses périodiques de 360° (à $t = 20, 110, 150, 250$ s). La figure IV.15(b) montre l'analyse « pairwise » de cet enregistrement, on y voit deux pics très importants pour des angles d'environ 360° et 720°. On distingue également quelques pics secondaires. Cette unique courbe ne permet pas de mesurer précisément la taille des pas en présence d'ATP γ S. Il faudrait davantage d'expériences, à concentration en recombinase faible et avec un champ magnétique horizontal moins important pour augmenter le nombre total de pas mesurables dans ces conditions.

1.2 En présence d'AMP-PNP

La courbe montrée figure IV.16(a) représente la rotation d'une bille lors de la polymérisation de hRAD51 lorsque l'ATP est remplacé par de l'AMP-PNP, analogue

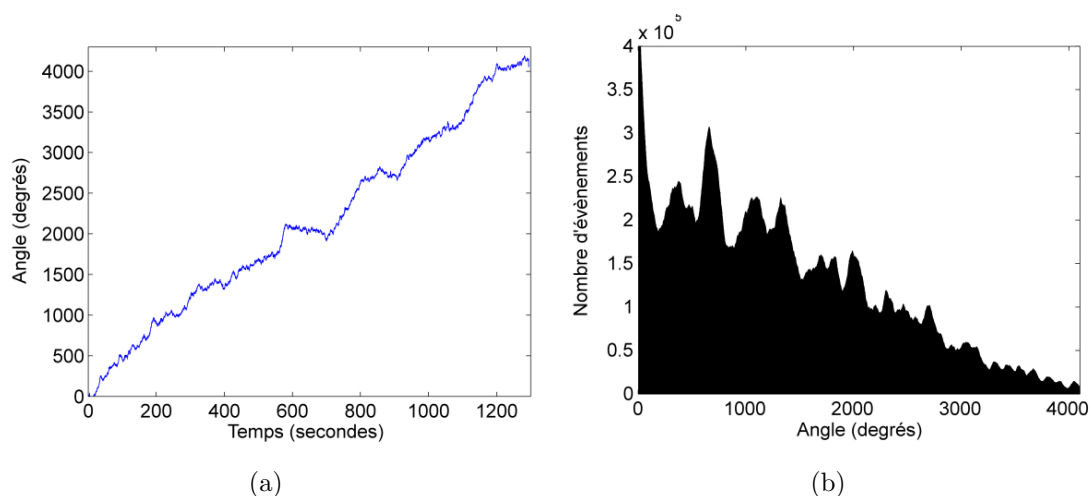


FIGURE IV.16 – **Polymérisation en présence d'AMP-PNP, analogue non-hydrolysable de l'ATP.** (a) Position angulaire de la bille en fonction du temps. (b) Analyse « pairwise » correspondante.

non-hydrolysable. L'enregistrement dure environ 1300 secondes pour une rotation globale d'environ 4100° , la vitesse moyenne de rotation est donc de 0,53 RPM. Le mouvement de rotation présente quelques irrégularités mais les pauses tous les 360° sont nettement moins marquées que dans le cas précédent (figure IV.15(a)). La figure IV.16(b) montre l'analyse « pairwise » correspondante. Sa structure est assez complexe et irrégulière, le pic le plus important étant à 660° environ. A la fin de l'histogramme, entre 3200° et 4000° , les pics apparaissent de même intensité et régulièrement espacés de 120° environ. De même que pour l'expérience en $\text{ATP}\gamma\text{S}$, une seule expérience en AMP-PNP ne peut pas nous permettre de conclure. Il faut donc la reproduire dans les meilleures conditions possibles pour mesurer la torsion induite par un monomère.

1.3 Perspectives

Il a été possible d'observer la polymérisation de hRAD51 en l'absence d'ATP (remplacé par de l' $\text{ATP}\gamma\text{S}$ ou de l'AMP-PNP). Une étude plus complète est nécessaire pour déterminer la torsion induite par une protéine et le couple d'arrêt dans ces conditions. On pourra alors discuter des différences structurales et énergétiques entre la polymérisation en ATP et en analogue non-hydrolysable.

2 Échange de brins

L'échange de brins nécessite deux molécules différentes d'ADN : une molécule double-brin et une molécule simple-brin. Ces deux partenaires doivent avoir une

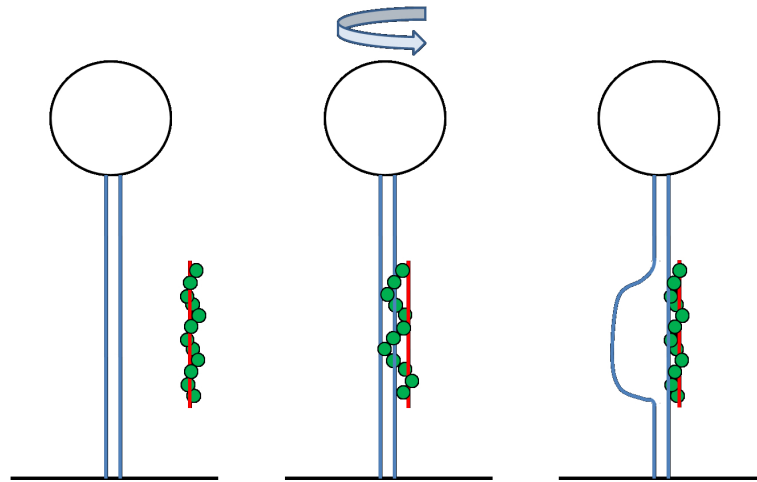


FIGURE IV.17 – **Schéma de l'expérience d'échange de brins.** Une molécule d'ADN double-brin est tenue dans les pinces magnétiques alors qu'un filament de hRAD51 est préparé sur un ADN simple-brin homologue (rouge). Le filament est injecté dans le canal. S'il interagit avec la molécule double-brin, on s'attend à observer un mouvement de la bille correspondant au déroulement de l'ADN contenu dans la synapse (zone à trois brins).

région homologue pour observer un échange de brin. Dans notre expérience, nous n'avons pas le choix de la molécule tenue dans les pinces : ce doit être la molécule double-brin. En effet, comme on l'a déjà évoqué plus haut, la molécule d'ADN simple-brin ne peut pas transmettre de torsion à la bille. Comme dans la réaction *in vivo* de recombinaison homologue, on forme le filament de Rad51 (ou RecA) sur la molécule simple-brin. C'est de cette manière que j'ai tenté l'expérience, cependant on peut aussi envisager de former le filament sur l'ADN double-brin comme lors de nos expériences de polymérisation et injecter ensuite le simple-brin homologue. Il n'est pas évident que ces deux approches nous permettent d'obtenir les mêmes informations sur l'échange de brin.

2.1 Déroulement de l'expérience

L'expérience est démarrée de la même manière que d'habitude : une molécule d'ADN double-brin est tenue dans les pinces magnétiques. Les filaments nucléo-protéiques sont formés sur des molécules d'ADN simple-brin de longueur 3,5 kb, et homologues sur toute leur longueur à la partie centrale de la molécule maintenue dans les pinces. Pour cet essai, les filaments ont été formés avec RecA, car le protocole est au point et que la recombinaison a déjà été observée avec cette protéine dans les pinces magnétiques classiques[79]. La polymérisation est effectuée en présence d'ATP γ S et non d'ATP afin d'empêcher la dépolymérisation et d'avoir des filaments stables (voir annexe D pour le protocole de préparation du filament et annexe C pour le protocole de préparation de l'ADN de 3,5 kb).

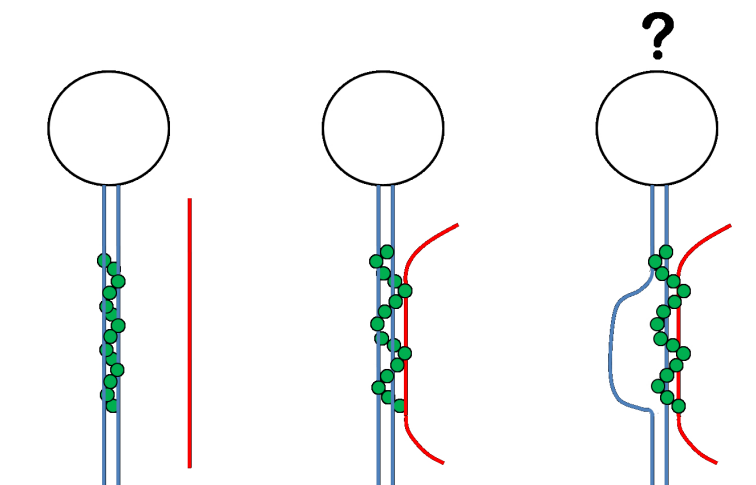


FIGURE IV.18 – **Schéma de l'autre expérience possible pour étudier l'échange de brins.** Le filament de hRAD51 est formé sur la molécule d'ADN double-brin tenue dans les pinces magnétiques. Un ADN simple-brin homologue est injecté et peut interagir avec le filament. S'il n'y a pas de dépolymérisation, il est difficile de prévoir ce que l'on peut observer via la bille magnétique.

Avant d'injecter dans le canal les filaments nucléoprotéiques, il faut s'assurer que la molécule maintenue dans les pinces est intacte et pourra faire tourner la bille magnétique. On choisit donc une « bonne » bille en utilisant notre option pinces magnétiques classiques. Une fois la bille choisie, on déroule l'ADN de 30 tours afin de favoriser la reconnaissance (sur les conseils de Ludovic Disseau qui observe la recombinaison homologue dans les pinces magnétiques classiques), puis on injecte les filaments nucléoprotéiques dans le tampon de recombinaison (tampon Rec2 avec une concentration en magnésium de 6 mM). La température de l'échantillon pendant l'expérience est maintenue à 37°C.

2.2 Résultat-Difficultés

Malheureusement, lors de cet unique essai, la bille choisie n'a pas tourné. On peut évoquer plusieurs hypothèses pour expliquer cet échec. Tout d'abord, l'expérience n'ayant été menée qu'une seule fois, il se peut que la bille choisie n'était pas liée à une molécule d'ADN intacte. D'autre part, on a donné 30 tours négatifs à la molécule d'ADN avant de démarrer, la force de traction étant assez faible, il est possible que ces tours aient été convertis en plectonèmes. Dans ce cas, il ne semble pas du tout avantageux de tenter de dérouler la molécule, et l'expérience devra être tentée sans imposer de torsion initialement. Le champ magnétique résiduel n'a pas été mesuré avant l'expérience, il se peut toujours que celui-ci ait été trop important et ait bloqué une éventuelle rotation de la bille.

2.3 Perspectives

Afin dans un premier temps d'observer un évènement de recombinaison, il faudrait certainement faire l'expérience opposée. C'est-à-dire qu'il faudrait commencer par polymériser sur une molécule d'ADN double-brin comme on sait le faire ; puis observer la rotation de la bille jusqu'à ce que celle-ci s'arrête et se stabilise. Ensuite, il faudrait injecter l'ADN simple-brin, stabilisé avec la protéine SSB, dans le tampon de recombinaison. De cette manière, on est certain que la bille observée transmet les changements de torsion de la molécule d'ADN, de même que l'on connaît la longueur du filament formé. Afin d'être sûr que la région homologue soit comprise dans le filament, il faudrait injecter de l'ADN simple-brin de 14,5 kb complètement homologue à toute la molécule d'ADN maintenue dans les pinces. Reste à deviner quelle serait la signature de la formation d'une boucle-D en termes de torsion de la molécule d'ADN double-brin. Par la suite, si l'on est capable d'effectuer l'expérience avec le filament sur l'ADN simple-brin, elle devrait nous donner des informations sur la taille de la synapse (zone d'échange de brin).

3 Polymérisation de RecA

L'expérience de polymérisation de RecA a également été tentée dans le but de comparer la torsion et le couple produits par la protéine bactérienne (RecA) à ceux mesurés pour la protéine humaine. Mais RecA a une affinité bien plus grande pour l'ADN simple-brin que pour l'ADN double-brin (voir tableau page 17). Pour la faire polymériser sur du double-brin, on lui fournit en général une amorce simple-brin. Celle-ci peut être créée, par exemple, par une bulle de dénaturation en déroulant une molécule d'ADN double-brin intacte dans les pinces magnétiques classiques.

L'expérience a été tentée de la même manière que pour hRAD51. La protéine RecA est injectée à une concentration de 500nM dans le tampon de polymérisation, puis on parcourt le canal pour trouver une bille qui tourne. La température de l'échantillon est maintenue à 30°C. Malheureusement nous n'avons observé aucune bille en rotation.

Comme on vient de l'évoquer, la polymérisation de RecA est difficile à initier sur une molécule d'ADN double-brin. Il faut donc chercher à la favoriser. On peut essayer de créer une bulle de dénaturation mais il faut pour cela tirer à une force assez élevée, ce qui implique dans la plupart des cas un champ magnétique résiduel, et donc un couple, important. On peut penser créer cette zone de dénaturation en déroulant la molécule à force élevée, puis stabiliser les régions simple-brin obtenues avec la protéine SSB (Single Strand Binding protein). Cela pourrait permettre de relâcher la force de traction (pour réduire le couple résiduel) et la torsion imposée (pour ne pas former de plectonèmes) tout en conservant des régions simple-brin. On peut aussi réaliser l'expérience à 37°C qui est la température idéale pour RecA. Que ce soit pour l'échange de brin ou pour la polymérisation de RecA, on voit bien que si l'on était capable d'imposer une force élevée (c'est-à-dire 5 – 10 pN, avec les pinces

magnétiques classiques et la pointe magnétique) tout en ayant un couple magnétique très faible, on pourrait faciliter ces réactions.

E Conclusions

Notre objectif initial était de mesurer la torsion induite par une protéine et le couple qu'elle peut produire à la manière des mesures de déplacement et de force obtenues sur les moteurs linéaires dans les pinces optiques. Nous avons effectivement pu mesurer précisément le déroulement d'une molécule d'ADN double-brin dû à la liaison d'une protéine hRAD51 sur un filament nucléoprotéique en formation. Nous obtenons qu'une recombinaison hRAD51 déroule l'ADN de 65° en moyenne, ce qui est tout à fait dans la fourchette attendue d'après la littérature ($60 \pm 15^\circ$ [7, 8, 18]).

Ce résultat nous permet également de donner une nouvelle mesure de la stœchiométrie : nombre de paires de bases par protéine. En effet, connaissant le nombre de protéine par tour d'hélice, on déduit la torsion totale de la portion d'ADN dans un tour de filament alors qu'il était nu, c'est-à-dire avant d'être déroulé ($360 + 6,2 \times 65 = 763^\circ$). Connaissant maintenant le nombre de paires de bases par tour d'hélice dans l'ADN nu, on obtient alors le nombre de paires de bases impliquées dans un tour de filament ($10,4 \times 763/360 = 22$ pb). Sachant le nombre de protéines par tour de filament, on obtient finalement une stœchiométrie de $3,6 \pm 0,3$ pb/protéine. En n'utilisant que le résultat d'une mesure directe de microscopie électronique (nombre de monomère par tour) et notre mesure directe de l'état de torsion de l'ADN dans le filament, nous pouvons donc affiner la valeur de la stœchiométrie qui pour l'instant était assez variable entre 2,5 et 5 pb/protéine. Il faut cependant noter que nous faisons l'hypothèse, comme dans toutes les précédentes évaluations de la stœchiométrie, que l'hélicité de l'ADN est la même que celle des protéines dans le filament, seulement une étude ayant essayé de répondre à cette question jusqu'à présent (sur RecA) [18].

Nous avons également mesuré le couple maximal produit par une protéine de hRAD51, c'est-à-dire le couple d'arrêt de la polymérisation. La mesure de la taille des pas avant/arrière lorsque la protéine travaille contre ce couple maximal permet de déduire l'énergie maximale produite par une protéine dans nos conditions expérimentales. Celle-ci vaut $10 \text{ pN} \cdot \text{nm}$ et doit être comparée à l'énergie disponible pour une protéine, provenant de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. On peut conclure que hRAD51 ne peut pas utiliser, lors de la première étape de la recombinaison homologue, davantage que 14% de l'énergie dont elle dispose pour accomplir le processus entièrement (polymérisation et échange de brin).

Nous avons développé un modèle dynamique qui nous a permis d'une part de mieux interpréter l'expérience de mesure du couple visqueux en fonction de la

concentration et de comparer les résultats de notre expérience à la littérature. A partir de données provenant essentiellement d'expériences en solution d'enzymologie, et sans jouer sur aucun paramètre libre, notre modèle ajuste très bien la courbe expérimentale. De plus, à partir de l'expérience de mesure du couple d'arrêt, nous avons pu évaluer le potentiel chimique de la polymérisation et celui-ci est tout à fait comparable aux données existantes. Ceci montre que notre expérience est fiable et quantitative.

Nous avons pu aller plus loin dans l'interprétation des données, notamment grâce à l'analyse des fluctuations, et apporter des éléments de réponse à une question qui fait actuellement débat. Les recombinaisons (RecA et Rad51) existent en solution sous forme de monomères et de multimères, la question est de savoir sous quelle forme elles se lient à l'ADN : monomères ou multimères ? Nous avons déjà évoqué ce débat et notamment le fait qu'il faut différencier les deux phases de la polymérisation : nucléation et croissance. Nous avons montré que dans nos conditions expérimentales, une fois que la polymérisation est initiée et que la concentration en hRAD51 est descendue à une valeur inférieure à 100 nM, la nucléation devient complètement négligeable. L'analyse des fluctuations nous a ensuite permis d'affirmer que dans ces conditions la polymérisation était le résultat de l'enchaînement d'étapes limitantes provoquant chacune un changement de torsion de 65° en moyenne dans la molécule d'ADN. Étant donné que ces pas sont attribués à la liaison d'une protéine de Rad51, nous en déduisons que l'étape de croissance de la polymérisation de hRAD51 a lieu par ajout de monomères dans nos conditions expérimentales ($C_{Rad51} \leq 100$ nM).

Dans le cas de la dépolymérisation, nous avons également mesuré des pas d'environ 65° de moyenne correspondant à une protéine mais l'analyse des fluctuations montre que le mécanisme moléculaire est différent de celui de la polymérisation. En effet, le paramètre de stochasticité est supérieur à 2, suggérant que des multimères doivent certainement rentrer en jeu également. De plus, il faut être plus prudent dans l'interprétation des pas de 65° lors de la dépolymérisation car on peut imaginer que ceux-ci résultent de l'hydrolyse de l'ATP ou de la dissociation d'une protéine. Nous n'avons pas les moyens pour l'instant d'apporter la preuve de l'une ou l'autre hypothèse. Cependant nos résultats vont dans le sens de certains modèles de dépolymérisation proposant en particulier que l'hydrolyse de l'ATP puisse avoir lieu sur toute la longueur du filament et que les protéines se détachent à l'extrémité par bloc ayant hydrolysé leur molécule d'ATP. Ainsi la taille des blocs n'est pas fixe et cela peut justifier que l'on observe des pas correspondant à des monomères et que le paramètre de stochasticité soit largement supérieur à 1.

Conclusion générale et perspectives

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés aux aspects dynamique et thermodynamique de la recombinaison homologe à l'échelle moléculaire. Pour cela, nous avons développé deux dispositifs expérimentaux originaux.

La formation du filament nucléoprotéique a été abordée grâce à une nouvelle génération de pinces magnétiques permettant de mesurer la torsion d'une molécule unique d'ADN. Cette technique fournit une résolution angulaire bien meilleure que celles obtenues par les techniques existantes. Elle permet, de plus, d'appliquer un couple contrôlé et mesuré à la molécule d'ADN indépendamment du couple de friction visqueuse utilisé jusqu'ici pour appliquer et mesurer un couple. Nous avons ainsi obtenu la première mesure directe de l'état de torsion de l'ADN dans le filament nucléoprotéique et montré que la croissance du filament a lieu par ajout de monomères de Rad51.

Nous avons également effectué des expériences préliminaires pour observer la recherche d'homologie et la formation de la synapse (région à trois brins d'ADN) en microscopie de fluorescence. Nos résultats montrent l'intérêt de visualiser ces étapes en révélant la présence de réarrangements et de formes d'ADN non triviaux lors de la recombinaison due à RecA. Ils montrent également que la proximité de la surface est un facteur gênant pour ces expériences.

Dans la suite, on imagine coupler ces deux techniques pour associer la manipulation et la mesure de torsion d'une molécule unique d'ADN à l'observation en fluorescence. Ceci nécessite un effort pour le contrôle d'un couple ajustable ainsi que pour l'observation en fluorescence d'une molécule maintenue perpendiculairement à la lamelle de microscope. A plus court terme, la technique de mesure de torsion et de couple est déjà utilisable pour étudier d'autres protéines associées ou non à l'ADN. Une autre équipe du laboratoire (Aurélien Roux et Patricia Bassereau) a ainsi le projet d'étudier dans ce dispositif la dynamine, une protéine provoquant la constriction et la scission de tubes de membranes.

Annexe A

Recettes des solutions tampons

Tampon de rinçage (TE-BSA)

- TrisHCl (pH 7,5) 10mM
- EDTA (pH 8,0) 1mM
- BSA 0,2mg/mL

Tampon d'incubation (TE NaCl-BSA)

- TrisHCl (pH 7,5) 10mM
- EDTA (pH 8,0) 1mM
- NaCl 50mM
- BSA 0,2mg/mL

Tampon Rec2 - pour la polymérisation

- TrisHCl (pH 7,5) 15mM
- MgCl₂ 2mM
- NaCl 25mM
- DTT 1mM
- Tween20 0,05%

Tampon de dépolymérisation

- TrisHCl (pH 7,5) 20mM
- EDTA (pH 8,0) 250mM
- NaCl 500mM
- BSA 0,5mg/mL

Tampon PBS-BSA

- Phosphate 10mM
- NaCl 500mM
- BSA 1X

Annexe A. Recettes des solutions tampons

Annexe B

Protocoles de préparation de l'ADN

A Protocole pour l'ADN marqué doublement biotine

Il s'agit de l'ADN utilisé dans les expériences du chapitre II.

1 Protocole pour les PCR

On fait trois PCR sur l'ADN du phage lambda (voir fig. B.1) : l'une de 14 917pb (sites 22180 et 37096) qui sera le fragment central de l'ADN final; et deux plus courtes avec des bases modifiées biotine qui serviront à attacher l'ADN à la surface (681pb entre les sites 20 281 et 20 962, 1644pb entre les sites 35 902 et 37 546).

1- Pour le fragment central de 15kb : On utilise le kit **Expand long template PCR system** de Roche. Pour un volume final de 50 μ L, mettre dans un tube de 0.2mL à parois fines (PCR tubes Eppendorf) :

- 34.25 μ L eau milliq

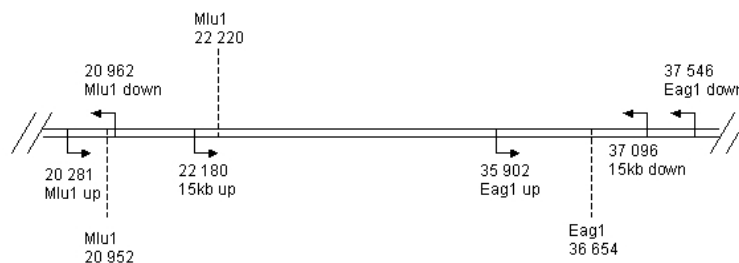


FIGURE B.1 – Carte de l'ADN du phage lambda dans la zone d'intérêt.

Annexe B. Protocoles de préparation de l'ADN

- 1 μ L d'une dilution /6 de l'amorce 15kb up (ie 0.33 μ M)
- 1 μ L d'une dilution /6 de l'amorce 15kb down (ie 0.33 μ M)
- 7 μ L du mix des nucléotides ATGC (ie 0.35mM par nucléotide)
- 1 μ L d'un aliquot d' ADN lambda à 0.2ng/ μ L (ie 4pg/ μ L)
- 5 μ L Buffer 10X tampon 3
- 0.75 μ L de la polymérase

2- Pour les deux fragments courts : On utilise le kit **Expand high fidelity system** de Roche, le protocole de PCR est le même pour les deux fragments mais bien sûr les amorces sont différentes. Pour un volume final de 50 μ L, mettre dans un tube de 0.2 μ L à parois fines (PCR tubes Eppendorf) :

- 28.5 μ L eau milliq
- 1 μ L de l'amorce up (ie 2 μ M)
- 1 μ L de l'amorce down (ie 2 μ M)
- 7 μ L du mix labeling des nucléotides ATGC (ie 0.35mM par nucléotide sauf T)
- 5.5 μ L de dUTP-biot (ref 1 093 088) (ie 0.032mM)
- 1 μ L d'un aliquot d' ADN lambda à 0.2ng/ μ L (ie 4pg/ μ L)
- 5 μ L Buffer 10X tampon 2
- 1 μ L de la polymérase

3- Recettes des stocks

- Mix simple :
1 μ L de A,T,G,C + 36 μ L d'eau milliq.
Les stocks de nucléotides sont à 100mM, les aliquots (8 μ L) du mix simple sont donc à 2.5mM par nucléotide.
- Mix labeling :
1 μ L de A,G,C + 0.65 μ L de T + 36.35 μ L d'eau milliq
Les aliquots (8 μ L) sont donc à 2.5mM pour A,G,C et 1.6mM pour T.
- Aliquots ADN lambda Le stock d'ADN lambda est à 500ng/ μ L, on prépare des aliquots à 0.2ng/ μ L (dilution /2500). Pour cela on peut faire deux dilutions par 50 dans l'eau milliq, attention ne pas vortexer.

2 Séquence des amorces et programmes des PCR

A. Protocole pour l'ADN marqué doublement biotine

Nom de l'amorce	Séquence	T_m (°C)
15kb up	GACCATCGGGGTAAAACCGTCTATGAC	57
15kb down	GCGACTTACCGCAGCAAAAATAAAGGG	55.8
Mlu1 up	CTGCAGCGTCACAACAATCAGC	
Mlu1 down	AGGTGACGCGTCGATAACATCTG	
Eag1 up	CCGATGGCGATAGTGGGTATCATGT	
Eag1 down	GGTGATGCGGAGAGATGGGTAAGC	

FIGURE B.2 – Table des amorces, température de fusion .

Cycle	Étape	Température (°C)	Temps
	1	94	2'
10x	2	94	10"
	3	65	30"
	4	68	12'
15X	5	94	10"
	6	65	30"
	7	68	12' + 20"
	8	68	7'
	9	4	∞

FIGURE B.3 – Paramètres du cycle de PCR pour le long fragment.

Cycle	Étape	Température (°C)	Temps
	1	94	1'
10x	2	94	40"
	3	62	1'
	4	72	1'
20X	5	94	40"
	6	62	1'
	7	72	1' + 20"
	8	72	5'
	9	4	∞

FIGURE B.4 – Paramètres du cycle de PCR pour les fragments courts.

3 Digestion

Purification et quantification Il faut purifier les ADN issus des PCR afin d'éliminer les amorces non-utilisées, les polymérases et les nucléotides. Pour cela on utilise les colonnes BD Chroma Spin + TE (BD Biosciences) version 1000 pour le long fragment (volume échantillon 75-100 μ L) et version 100 pour les courts fragments (volume échantillon 50 μ L à vérifier).

Les concentrations respectives des différents échantillons sont mesurées par Nanodrop (spectre d'absorbance), on obtient ainsi la masse de chaque ADN produit.

Digestion Connaissant la masse d'ADN dans chaque échantillon et sachant que l'on veut mettre 10U d'enzyme par microgramme d'ADN (enzyme stockée à 10U/ μ L), on en déduit les proportions à mettre en présence pour effectuer la digestion. Il faut avoir en solution : de l'ADN, de l'enzyme (**Eag1 ET Mlu1 pour le long fragment**) et du buffer NEB 3 1X. Les tubes sont mis à incuber à 37°C pendant plusieurs heures (minimum 1h30). Lorsque la digestion est finie : inactiver les enzymes de digestion 20 minutes à 65°C.

4 Ligation

Purification et quantification De même qu'avant la digestion il faut purifier les échantillons afin d'éliminer enzymes et petits fragments puis mesurer la concentration en ADN au Nanodrop.

Reconcentration de l'ADN On peut reconcentrer l'ADN par un facteur 10 (pour le long fragment on peut se contenter d'un facteur moins important pour les courts fragments) afin de travailler dans un volume pas trop grand pour la ligation et surtout afin de changer de tampon car l'EDTA contenu dans le TE chélate les ions Magnésium dont a besoin la ligase. Soit V_0 le volume initial de la solution 0 d'ADN dans le TE, dans le tube contenant cette solution :

- Ajouter $V_0/3$ de NaCl 4M
- Ajouter $2.5 \times V_0$ d'éthanol à 95%
- Ajouter 2 μ L de glycogène si possible, cette étape est facultative
- Incuber le tube 10 minutes à -80°C
- Centrifuger 10 minutes à 13 500 rpm à 4°C
- Enlever le surnageant, on peut renverser le tube sur du papier
- Ajouter $3V_0$ d'éthanol à 70% froid (gardé sur la glace) en faisant couler sur les parois pour récupérer éventuellement de l'ADN
- Remuer doucement pour laver le culot d'ADN
- Centrifuger 10 minutes à 13 500 rpm à 4°C
- Enlever le surnageant
- Sécher au SpeedVac (environ 5-10 minutes)

B. Préparation de l'ADN biotine-digoxygénine

- Resuspendre dans le volume voulu ($V_0/10$ par exemple) de Tris HCl 10mM pH 7.5

Ligation On a reconcentré les trois fragments d'ADN ou au moins changé le buffer pour éliminer l'EDTA, il faut donc remesurer la concentration de chaque tube. Pour que la ligation soit efficace, il est suggéré de mettre en excès les petits fragments : soit 5 molécules du petit fragment i pour 1 du long fragment.

Le nombre n_i d'une certaine molécule d'ADN de N_i paires de bases dont on connaît la masse totale en solution m_i est donnée par :

$$n_i = \frac{m_i}{N_i \cdot \sigma}$$

avec σ la masse d'une base. Connaissant la masse totale des longs fragments, M (c'est le nombre limitant ici), on obtient la masse de petits fragments à lui opposer pour la ligation :

$$m_i = 5 \times \frac{N_i}{N_{15kb}} \times M.$$

Sachant que nos deux petits fragments sont longs de 671pb (1) et 800pb (2, c'est une moyenne pour le fragment Eag1), et que le long fragment fait 14 434pb, on déduit la masse puis le volume de chaque ADN à mettre en présence. D'autre part, il faut déterminer la quantité d'enzyme (T4 DNA ligase) à mettre. On a $M_{tot}\mu g$ d'ADN au total, on peut mettre 5 unités d'enzyme par microgramme d'ADN sans dépasser 1/10 du volume total (car l'enzyme est stockée dans un milieu très visqueux). On calcule également le volume de tampon de ligation 10x à ajouter.

Le mélange des trois fragments d'ADN, de l'enzyme et du tampon de ligation est mis à incuber pendant la nuit à 16°C puis on inactive la ligase en chauffant 10 minutes à 65°C. On peut purifier l'ADN final sur colonnes chroma-spin 1000.

B Préparation de l'ADN biotine-digoxygénine

Il s'agit de l'ADN utilisé dans nos pinces magnétiques sensibles au couple (chapitre III et IV). Il résulte de la même construction que précédemment sauf qu'une des deux extrémités est préparée avec des nucléotides modifiés avec de la digoxygénine afin d'avoir au final une extrémité marquée biotine et l'autre marquée digoxygénine.

C Construction de 3,5kb

Il s'agit de l'ADN utilisé pour préparer des filaments RecA ou Rad51 sur du simple-brin. Il peut être marqué à une extrémité pour le coupler à une bille ou un quantum dot par exemple.

Annexe B. Protocoles de préparation de l'ADN

Nom de l'amorce	Séquence	T_m (°C)
3.5kb up	CGC CTC TTT CAA TAA CAC	44.8
3.5kb down	AGA ATT ACA GCG CAA CAC	44.8

FIGURE B.5 – Table des amorces, température de fusion .

Cycle	Étape	Température (°C)	Temps
	1	94	2'
10x	2	94	15"
	3	52	30"
	4	72	2'
15X	5	94	15"
	6	52	30"
	7	72	2' + 5"
	8	72	7'
	9	4	forever

FIGURE B.6 – Paramètres du cycle de PCR.

1 Préparation par PCR

On utilise le kit Expand high fidelity system de Roche. Pour un volume final de $50\mu\text{L}$, mettre dans un tube de $0.2\mu\text{L}$ à parois fines (PCR tubes Eppendorf) :

- $37\mu\text{L}$ eau milliQ
- $1\mu\text{L}$ d'une dilution /6 de l'amorce 3.5kb up (ie $0.33\mu\text{M}$)
- $1\mu\text{L}$ d'une dilution /6 de l'amorce 3.5kb down (ie $0.33\mu\text{M}$)
- $4\mu\text{L}$ du mix des nucléotides ATGC (ie 0.2mM par nucléotide)
- $1\mu\text{L}$ d'un aliquot d' ADN lambda à $0.2\text{ng}/\mu\text{L}$ (ie $4\text{pg}/\mu\text{L}$)
- $5\mu\text{L}$ Buffer 10X tampon 2
- $1\mu\text{L}$ de la polymérase

2 Séquences des amorces et programme de la PCR

On a une amorce 3,5 kb up avec une modification 5'-biotine ("cos1"), et deux amorces 3,5 kb down : l'une modifiée 5'-digoxigénine et l'autre modifiée 5'-amineC6. Suivant la technique que l'on veut utiliser pour séparer ou marquer l'ADN final on choisira l'une ou l'autre des amorces 3,5 kb down.

D Préparation des filaments nucléoprotéiques

1 Préparation de l'ADN simple-brin

Avec les billes streptavidine

- Prélever 10 μ L de billes MyOne streptavidine (10mg/mL, Dynal) ie 100 μ g.
- Ajouter 10 μ L de buffer 3, mélanger, séparer avec l'aimant et enlever le surnageant.
- Laver encore 3 fois avec 20 μ L de buffer 3.
- Suspendre dans 5 μ L de buffer 3.
- Ajouter \sim 350ng d'ADN (3.7 μ L d'ADN à 94ng/ μ L)
- Incuber 1 heure sur le rotateur à RT.

- Ajouter 10 μ L de TrisHCl 10mM, mélanger, séparer et enlever le surnageant.
- Laver encore 3 fois avec 20 μ L de TrisHCl 10mM.
- Suspendre dans 30 μ L de TrisHCl 10mM.
- Chauffer 2' à 95°C.
- Aussitôt dans la glace 2'.
- Séparation et prélèvement du surnageant. Mesurer la concentration au Nanodrop (sélectionner Other, c=33).

On peut stocker l'ADN simple-brin à -20°C.

Avec les billes antidigoxigénine

- Prélever 80 μ L de billes antidigoxigénine (ie 100 μ g)
- Rincer 3 fois avec 20 μ L de PBST.
- Resuspendre dans 5 μ L de PBST.
- Ajouter \sim 350ng d'ADN (3.7 μ L d'ADN à 94ng/ μ L)
- Incuber 1 heure sur le rotateur à RT.

- Pour le reste : idem que pour les billes streptavidine (lavage Tris, etc)

2 Polymérisation de RecA

Il faut connaître la concentration en nucléotides pour appliquer la stœchiométrie 1 RecA/4 bases. $C_{nucleotides}(\mu M) = C(ng/\mu L) \cdot 10^{-3}/308$.

Ensuite si l'on décide de travailler dans un volume de 20 μ L par exemple il faut :

- 1.1 μ L de RecA (ie 3 μ M)
- 0.8 μ L de SSB (ie 0.25 μ M)
- 0.4 μ L ATP (ie 2mM)
- $V = 240/C_{nucleotides}\mu$ L d'ADN
- 2 μ L de tampon Rec2 10x (sans DTT)
- 1 μ L de DTT 20mM (ie 1mM)

Annexe B. Protocoles de préparation de l'ADN

- qsp 20 μ L eau milliQ

Incuber 5 minutes à 37°C.

Rajouter 6.5mM d'ATP supplémentaire juste avant l'expérience. Si l'on veut faire de l'échange de brin il faut rajouter du magnésium pour atteindre 12mM.

3 Tampons

- Buffer 3 : TE (Tris 10mM, EDTA 1mM) + NaCl 0.2M
- PBST : 10mM phosphate, 150mM NaCl, 0.1% Tween20, pH 7.4

Annexe C

Protocoles de préparation des billes

A Préparation des billes anti-digoxygénine

1 Activation des billes magnétiques

- Prélever 25 μ L billes "carboxylic acid MyOne" de Dynal (0.25mg)
- Laver :
 - 2X avec 200 μ L de NaOH 0.01M
 - 2X avec 200 μ L d'eau milliQ
 - 2X avec 200 μ L de buffer 2enlever le dernier surnageant
- Peser 2.5mg d'EDC, dissoudre dans 100 μ L de buffer 2 FROID. Ajouter tout de suite 50 μ L de ça aux billes, mélanger une fois avec la pipette.
- Peser 2.5mg de S-NHS (ou NHS), dissoudre dans 100 μ L de buffer 2 FROID. Ajouter 50 μ L au mélange précédent (billes+EDC). Mélanger un peu.
- Laisser incuber 30 minutes à température ambiante avec agitation.

2 Couplage à l'anti-digoxygénine

- Enlever le surnageant. Rincer 2 fois avec 200 μ L de buffer 2. Enlever le surnageant.
- Ajouter 2 aliquots de 200 μ L d'anti-digoxygénine à 60ng/ μ L.
- Ajouter 15 μ L de NaCl 4M (pour obtenir une concentration finale de 0.15M)
- Incuber overnight à 4°C avec agitation

3 Lavage-Blocage

- Laver
 - 5X avec 200 μ L de buffer 2

Annexe C. Protocoles de préparation des billes

- 1X avec 200 μ L de buffer 2bis
 - 5X avec 200 μ L de buffer 2
- Vérifier l'absorbance du dernier surnageant à 280nm, elle doit être nulle, sinon refaire quelques lavages avec le buffer 2.
- Bloquer les groupes réactifs en lavant avec 200 μ L de TrisHCl 50mM. Incuber 15 minutes (minimum) à température ambiante.
 - Laver 5X avec 200 μ L de buffer 2.
 - Stocker à 4°C à la concentration voulue.

4 Tampons

- Buffer 2 : 10mM Phosphate, 150mM NaCl, pH 7.2
- Buffer 2bis : 10mM Phosphate, 0.4M NaCl, pH 7.2 (par ex. 31.25 μ L de NaCl 4M dans 500 μ L de Buffer 2)

B Protocole de conjugaison bille streptavidine-ADN biotine

- Vortexer fortement la solution-mère des billes latex streptavidine
- Prendre 1 μ L de billes, y ajouter 50 μ L de PBS-BSA
- Vortexer fortement et soniquer (3-4 pulses de 30")
- Centrifuger 8' à 7000G
- Enlever le surnageant et reprendre dans 5 μ L de PBS-BSA
- Vortexer
- Ajouter 5 μ L d'ADNsb à 5ng/ μ L ($N_{ADN}/N_{billes} = 100$), mélanger bien.
- Incuber 1 heure à RT sur rotateur
- Centrifuger 8' à 7000G
- Récupérer le surnageant et mesurer sa concentration en ADNsb
- Resuspendre les billes dans du PBS-BSA

Annexe D

Protocoles de préparation des surfaces

A Préparation des lamelles streptavidine et accrochage de l'ADN biotinilé

1 Silanisation

- Dans un bécher mettre 80mL d'éthanol, 8mL d'acide acétique 1N, mélanger.
- Ajouter 160 μ L de silane (APTES, sigma A3648), mélanger. ATTENTION : refermer rapidement le flacon de silane après avoir chassé l'air avec un gaz neutre.
- Nettoyer les lamelles au plasma et les mettre à incuber dans ce bain quelques heures à température ambiante ou toute la nuit à 4°C.
- Rincer les lamelles à l'éthanol, sécher, puis mettre au four 2 heures à 65°C.
- Incuber les lamelles en sandwich avec la caséine biotinilée 30 minutes environ.
- Rincer à l'eau puis à l'éthanol, sécher et stocker dans des boîtes individuelles fermées au parafilm à 4°C.

2 Préparation de la caséine biotinilée

- Peser quelques milligrammes de caséine (Blocking reagent, Roche) et dissoudre dans du PBS à 10mg/mL.
- Prélever 40 μ L de cette solution et y ajouter 160 μ L de PBS pour obtenir de la caséine à 2mg/mL.
- Ajouter un aliquot de 2 μ L de NHS-biotin (100mg/mL dans DMSO, Pierce 21338).
- Incuber 1 heure à température ambiante (ou toute la nuit à 4°C).

3 Accrochage de l'ADN biotinilé

- Rincer le canal avec 1mL de buffer 1.
- Ajouter 10 μ L de streptavidine (1mg/mL dans PBS) à \sim 40 μ L de buffer 1, incuber dans le canal 10 minutes.
- Rincer le canal avec 1mL de buffer 1.
- Ajouter 1 μ L d'ADN (\sim 10ng/ μ L) à \sim 40 μ L de buffer 1, injecter. Incuber environ 15 minutes.
- Injecter \sim 200 μ L de buffer 1 pour étirer l'ADN (100-500 μ L/min)
- Ajouter 1 μ L de SYBRgreen (1/100 : stock) à \sim 400 μ L de buffer 1 et injecter.

4 Tampons

- Buffer 1 : PIPES 20mM, NaCl 50mM, **pH \lesssim 6.8**
- PBS : 10mM de phosphate, 150mM NaCl, pH 7.2

B Préparation des lamelles antidigoxygénine

1 Silanisation

- Nettoyer les lamelles (24x40mm) en les plongeant dans un bain de soude concentrée (5 mol \cdot L⁻¹) pendant au moins 1/2 h.
- Rincer abondamment chaque lamelle à l'eau milliq, puis à l'éthanol et sécher à l'azote. Les placer dans le four à 150° pendant au moins 1/2 h pour qu'elles soient complètement sèches.
- Incuber les lamelles sèches dans un bain de Sigmacote (Sigma), sous la hotte, pendant 1/4-1/2h.
- Rincer chaque lamelle à l'éthanol, sécher à l'azote et les placer dans le four à 150° pendant 1h.

2 Préparation de la chambre et dépôt d'antidigoxygénine

- Après avoir rincé abondamment une chambre en PDMS¹ à l'isopropanol, la sécher à l'air comprimé et la déposer sur une lamelle silanisée. Mettre au four à 65° pendant toute la nuit.
- Une fois la chambre sortie du four et refroidie à température ambiante, y ajouter des connections. Faire passer dans la chambre de l'eau milliq pour s'assurer que le canal n'est pas bouché. On peut ensuite déposer un peu de colle silicone autour des connections pour éviter les fuites. Dans ce cas, laisser la chambre en surpression environ 1h, le temps que la colle sèche.

1. Pour le protocole de réalisation des chambres en PDMS, se référer à la thèse de Renaud Fulconis [79].

B. Préparation des lamelles antidigoxygénine

- Déposer la chambre sur le bain sec à 37°C, et injecter doucement la solution d'antidigoxygénine ($30 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ en tampon phosphate 100 mM à pH 7,4). La solution peut être injectée dans le canal en introduisant une différence d'altitude entre la connexion d'entrée et celle de sortie. Mais par la suite, il se forme des bulles d'air et il faut alors utiliser une seringue pour aspirer doucement le liquide. Le processus doit durer environ deux heures à 37°C.
- Remplir ensuite doucement de la BSA (albumine de sérum bovin, à $10 \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). Laisser incuber au moins une nuit à 4°C en surpression.

Annexe D. Protocoles de préparation des surfaces

Annexe E

Programme d'intégration numérique

Voici la dernière version du programme d'intégration numérique utilisé pour résoudre le modèle décrit page 107. Il est possible de rentrer plusieurs paramètres lors du lancement du programme ou de les intégrer dans le programme lui-même. Dans cette version seul K_1 est demandé pour lancer le programme. Dans une version précédente, le programme sortait l'angle de rotation θ et la longueur du filament z_1 en fonction du temps et pour une concentration donnée. Dans cette version, on sort directement la vitesse en fonction de la concentration.

```
/*
// Filename rad_turn.cpp

//numerical solution of the propagation of torque along a dsDNA where Rad51
  polymerize from the basis.

// TO BE COMPILED WITH:
// g++ -o rad_turn rad_turn.cpp -Wno-deprecated -static -lgsl -lgslcblas -lm -lc

// and called with rad_turn

//NB: GSL required

#include <iostream>
#include <fstream>
#include <time.h>
#include <cmath>
#include <string>
#include <new>
#include <stdio.h>
#include <unistd.h>
//#include <gsl/gsl_rng.h>
#include <gsl/gsl_fit.h>
#include <gsl/gsl_math.h>
//#include <gsl/gsl_randist.h>
#include <hash_set.h> //stl library
#include <hash_map.h> //stl library
#include <algo.h> //stl library
#include <vector.h>
```


Annexe E. Programme d'intégration numérique

```
#include <iomanip>

using namespace std;

/*****\
  Declaration of the functions and global variables
*****/

//global variables
int t1, t0;

int argcg;
char *argvg;
char out_log_name[75],
      out_kin_name[75],
      NAME[70];

unsigned long
i, j, h, s, k,
  dim,
  counter;
double k1;

vector < hash_set <int> > C(9);
hash_set<int>::iterator Cit;
//hash_map<int, int, hash<int> > active;

/*****\
//SIMULATIONS PARAMETERS
*****/

// allocate dynamically an array
template <class T>
void make1D(T* &array, unsigned long dimension) {
  try{
    array = new T[dimension];
  }
  catch (bad_alloc){
    cerr << "Fatal_error:_not_enough_memory!!!"<<endl;
    exit(1);
  }
  for (unsigned long i=0;i<dimension;++i) array[i]=0;
}

// cout an array
template <class T>
void vcout(T *v, int dim)
{
  for (int i=0; i<dim; i++)
    cout<<v[i]<<" ";
  cout<<endl;
}

//convert a vector to double
template <class T>
void convert(T *v1, double *v2, int size)
{
  for (int i=0; i<size; i++){
    v2[i]=double (v1[i]);
  }
  return (0);
}

/*****\
 * usage: gives the instruction of the program in case of wrong input *
*****/
```

```

\*****/

void usage(void)
{
  cout<< "Usage: _rad_turn_[1]" << endl;
  cout<< "Parameter_(insered_as_float_number):"<<endl;
  cout<< "_[1]_k1"<<endl;
  // cout<< " [2] Tp"<<endl;
  //cout<< " [3] xi"<<endl;
  //cout<< " [4] MB"<<endl;
  //cout<< " [5] p"<<endl;
  exit(1);
}

\*****\
Main
\*****/

int main(int argc, char *argv[])
{
  if (argc!=2) usage();
  else{
    k1=atof(argv[1]);
    //Tp=atof(argv[2]);
    //xi=atof(argv[3]);
    //MB=atof(argv[4]);
    //p=atof(argv[5]);
  }

  // user gives value for parameters listed above

  \*****/

  //DECLARATION VARIABLES

  int timelim=400000;
  double *th, *z, a0, a1, Delta, torque;
  double *t, tim[2000], theta[2000];

  // ofstream out_kin ("out_t");

  make1D(th, timelim);
  make1D(z, timelim);
  make1D(t, timelim);

  \*****/

  // parameters

  double lrad=1.1900;//1.19 nm
  double mrad=1.500; //increase of length due to Rad51
  double k0=300.00; // pN.nm.nm
  double q0=2*M_PI/3.4; // rad/nm
  double q1=2*M_PI/10; // rad/nm
  double p=0.1; // -0.5<p<0.5
  double kT=4; //energy scale pN*nm
  double alpha=0; //rad
  double theta0=-2.59; //rad
  double MB=4; //pN*nm
  double L=5000; //nm
  double Lp=mrad*L;

```

Annexe E. Programme d'intégration numérique

```
double k0b=1E-3; //  $s^{-1} * nM^{-1}$ 
double k0u=1E-6; //  $s^{-1}$ 
// double k1=1500;
double xi=100; // rotation viscous drag coefficient for two beads  $s * pN * nm$ 
double Tp=16.5; // critical torque to form plectonemes  $pN * nm$ 
double Tmax;

double delta_t=0.5;
double c0, c1, cov00, cov01, cov11, sumsq, cc;
int q;

// Concentration array
double conc[40];
    for (int j=0; j<25; j++)
    {
        conc[j]=(j+1)*10;
    }
    for (int j=25; j<40; j++)
    {
        conc[j]=(j-24)*50+250;
    }

// create filename with input parameters, and open file
FILE * out_kin;
sprintf(NAME, "out_%.1f", k1);
out_kin=fopen(NAME, "w");

for (int j=0; j<28; j++)
{
    double cs=conc[j];
//initial conditions
    th[0]=q0*L;
    z[0]=0;
    cc=0;
    q=1;
    a0=0;
    a1=0;
    Delta=0;
    Tmax=0;

//integration (Euler)

    for (i=1; i<timelim; i++) {
        a0=(th[i-1]-alpha-z[i-1]*(q1-q0*k0/k1))/(L+z[i-1]*(k0/k1-1./mrad));

// Torque calculation and comparison to plectoneme critical torque
        torque=k0*(a0-q0);
        if (torque>Tp){
            torque=Tp;
        }

        a0=torque/k0 + q0;
        a1=torque/k1 + q1;
        Delta=-mrad*lrad/(2*kT)*(k0*(a0-q0)*(a0-q0)-k1*(a1-q1)*(a1-q1));

        th[i]=th[i-1]-(delta_t/xi)*(k0*(a0-q0) + MB*sin(th[i-1]-theta));

        z[i]=z[i-1]+delta_t*mrad*lrad*(k0b*cs*exp((p+0.5)*Delta)-k0u*exp((p-0.5)*Delta));

// block polymerization when full DNA is covered
        if (z[i]>Lp) {
            z[i]=z[i-1];
        }
    }
}
```

```

    }

    // calculate time
    t[i]=i*delta_t;

    if (abs(torque)>Tmax){
        Tmax=abs(torque);
    }

    //figure out speed by linear fit on segments which length is 2000
    div_t divresult;
    divresult = div (i,2000);
    if (divresult.rem==0){
        q=divresult.quot;

        for (k=0; k<2000; k++){
            theta[k] = th[k+2000*(q-1)];
            tim[k] = delta_t*k;
            gsl_fit_linear (tim,1,theta,1,2000,&c0,&c1,&cov00,&cov01,&cov11,&sumsq)
                ;
        }

        // c1 is calculated speed over this segment. it is negative.
        // keep always bigger speed as cc

        if (c1<cc) cc=c1;

    }

    // print rotating speed (cc) as function of concentration (cs)
    fprintf (out_kin, "%.2f_%.2f_%.2f\n", cs, cc);

}
fclose(out_kin);
return (0);
}

//*****END OF MAIN/*****

```


Bibliographie

- [1] Shin DS, Pellegrini L, Daniels DS, Yelent B, Craig L, Bates D, Yu DS, Shivji MK, Hitomi C, Arvai AS, Volkmann N, Tsuruta H, Blundell TL, Venkitaraman AR et Tainer JA (2003). “Full-length archaeal Rad51 structure and mutants : mechanisms for RAD51 assembly and control by BRCA2.” *EMBO J* **22**(17), 4566–4576.
- [2] Clark AJ et Margulies AD (1965). “Isolation and characterization of recombination-deficient mutants of Escherichia coli K12.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **53**, 451–459.
- [3] Bianco PR, Tracy RB et Kowalczykowski SC (1998). “DNA strand exchange proteins : a biochemical and physical comparison.” *Front Biosci* **3**, D570–D603.
- [4] Lin Z, Kong H, Nei M et Ma H (2006). “Origins and evolution of the recA/-RAD51 gene family : Evidence for ancient gene duplication and endosymbiotic gene transfer.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10 328–10 333.
- [5] Wyman C et Kanaar R (2004). “Homologous recombination : down to the wire.” *Curr Biol* **14**(15), R629–R631.
- [6] Wyman C, Ristic D et Kanaar R (2004). “Homologous recombination-mediated double-strand break repair.” *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9), 827–833.
- [7] Benson FE, Stasiak A et West SC (1994). “Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of E. coli RecA.” *EMBO J* **13**(23), 5764–5771.
- [8] Zaitseva EM, Zaitsev EN et Kowalczykowski SC (1999). “The DNA Binding Properties of Saccharomyces cerevisiae Rad51 Protein”. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 2907–2915.
- [9] Tomblin G et Fishel R (2002). “Biochemical Characterization of the Human RAD51 Protein I. ATP HYDROLYSIS”. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 14 417–14 425.
- [10] West SC (2003). “Molecular views of recombination proteins and their control”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**, 1–11.
- [11] Yu X, Jacobs SA, West SC, Ogawa T, et Egelman EH (2001). “Domain structure and dynamics in the helical filaments formed by RecA and Rad51 on DNA”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 8419–8424.

Bibliographie

- [12] Conway AB, Lynch TW, Zhang Y, Fortin GS, Fung CW, Symington LS et Rice PA (2004). “Crystal structure of a Rad51 filament”. *Nature Structural & Molecular Biology* **11**, 791–796.
- [13] Baumann P et West SC (1998). “Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair.” *Trends Biochem Sci* **23**(7), 247–251.
- [14] Zutter JKD et Knight KL (1999). “The hRad51 and RecA proteins show significant differences in cooperative binding to single-stranded DNA.” *J Mol Biol* **293**(4), 769–780.
- [15] Modesti M, Ristic D, van der Heijden T, Dekker C, van Mameren J, Peterman EJG, Wuite GJL, Kanaar R et Wyman C (2007). “Fluorescent human RAD51 reveals multiple nucleation sites and filament segments tightly associated along a single DNA molecule.” *Structure* **15**(5), 599–609.
- [16] Stasiak A, Capua ED et Koller T (1981). “Elongation of duplex DNA by recA protein.” *J Mol Biol* **151**(3), 557–564.
- [17] Ogawa T, Yu X, Shinohara A et Egelman EH (1993). “Similarity of the Yeast RAD51 Filament to the Bacterial RecA Filament”. *Science* **259**, 1896–1899.
- [18] Stasiak A et di Capua E (1982). “The helicity of DNA in complexes with RecA protein”. *Nature* **299**, 185–186.
- [19] von Hippel PH et Berg OG (1989). “Facilitated target location in biological systems.” *J Biol Chem* **264**(2), 675–678.
- [20] Hu T et Shklovskii BI (2006). “How does a protein search for the specific site on DNA : The role of disorder”. *Physical Review E* **74**, 021 903.
- [21] Adzuma K (1998). “No sliding during homology search by RecA protein.” *J Biol Chem* **273**(47), 31 565–31 573.
- [22] Honigberg SM, Gonda DK, Flory J et Radding CM (1985). “The pairing activity of stable nucleoprotein filaments made from recA protein, single-stranded DNA, and adenosine 5’-(gamma-thio)triphosphate.” *J Biol Chem* **260**(21), 11 845–11 851.
- [23] Gonda DK et Radding CM (1986). “The mechanism of the search for homology promoted by recA protein. Facilitated diffusion within nucleoprotein networks.” *J Biol Chem* **261**(28), 13 087–13 096.
- [24] Radding CM (1991). “Helical interactions in homologous pairing and strand exchange driven by RecA protein.” *J Biol Chem* **266**(9), 5355–5358.
- [25] Jain SK, Cox MM et Inman RB (1995). “Occurrence of three-stranded DNA within a RecA protein filament.” *J Biol Chem* **270**(9), 4943–4949.
- [26] Bertucat G, Lavery R et Prévost C (1999). “A molecular model for RecA-promoted strand exchange via parallel triple-stranded helices.” *Biophys J* **77**(3), 1562–1576.

-
- [27] West SC, Cassuto E et Howard-Flanders P (1981). "Heteroduplex formation by recA protein : polarity of strand exchanges." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(10), 6149–6153.
- [28] Kahn R, Cunningham RP, DasGupta C et Radding CM (1981). "Polarity of heteroduplex formation promoted by Escherichia coli recA protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(8), 4786–4790.
- [29] Cox MM et Lehman IR (1981). "Directionality and polarity in recA protein-promoted branch migration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(10), 6018–6022.
- [30] Baumann P et West SC (1999). "Heteroduplex formation by human Rad51 protein : effects of DNA end-structure, hRP-A and hRad52." *J Mol Biol* **291**(2), 363–374.
- [31] Sung P et Robberson DL (1995). "DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA." *Cell* **82**(3), 453–461.
- [32] Gupta RC, Golub EI, Wold MS et Radding CM (1998). "Polarity of DNA strand exchange promoted by recombination proteins of the RecA family." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(17), 9843–9848.
- [33] Namsaraev EA et Berg P (1998). "Branch migration during Rad51-promoted strand exchange proceeds in either direction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(18), 10 477–10 481.
- [34] Holmes VF, Benjamin KR, Crisona NJ et Cozzarelli NR (2001). "Bypass of heterology during strand transfer by Saccaromyces cerevisiae Rad51 protein". *Nucleic Acids Research* **29**, 5052–5057.
- [35] Bell CE (2005). "Structure and mechanism of Escherichia coli RecA ATPase." *Mol Microbiol* **58**(2), 358–366.
- [36] Kim HK, Morimatsu K, Nordén B, Ardhammar M et Takahashi M (2002). "ADP stabilizes the human Rad51-single stranded DNA complex and promotes its DNA annealing activity". *Genes to Cells* **7**, 1125–1134.
- [37] Weinstock GM, McEntee K et Lehman IR (1981). "Hydrolysis of nucleoside triphosphates catalyzed by the recA protein of Escherichia coli. Characterization of ATP hydrolysis." *J Biol Chem* **256**(16), 8829–8834.
- [38] Sung P et Stratton SA (1996). "Yeast Rad51 Recombinase Mediates Polar DNA Strand Exchange in the Absence of ATP Hydrolysis". *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 27 983–27 986.
- [39] Rice KP, Eggler AL, Sung P et Cox MM (2001). "DNA Pairing and Strand Exchange by the Escherichia coli RecA and Yeast Rad51 Proteins without ATP Hydrolysis ON THE IMPORTANCE OF NOT GETTING STUCK". *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 38 570–38 581.

Bibliographie

- [40] Rehrauer WM et Kowalczykowski SC (1993). “Alteration of the nucleoside triphosphate (NTP) catalytic domain within *Escherichia coli* recA protein attenuates NTP hydrolysis but not joint molecule formation.” *J Biol Chem* **268**(2), 1292–1297.
- [41] Chi P, Komen SV, Sehorn MG, Sigurdsson S et Sung P (2006). “Roles of ATP binding and ATP hydrolysis in human Rad51 recombinase function.” *DNA Repair (Amst)* **5**(3), 381–391.
- [42] Cox JM, Tsodikov OV et Cox MM (2005). “Organized unidirectional waves of ATP hydrolysis within a RecA filament.” *PLoS Biol* **3**(2), e52.
- [43] MacFarland KJ, Shan Q, Inman RB et Cox MM (1997). “RecA as a motor protein. Testing models for the role of ATP hydrolysis in DNA strand exchange.” *J Biol Chem* **272**(28), 17 675–17 685.
- [44] Cox MM (2007). “Motoring along with the bacterial RecA protein.” *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(2), 127–138.
- [45] Svoboda K, Schmidt CF, Schnapp BJ et Block SM (1993). “Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry.” *Nature* **365**(6448), 721–727.
- [46] Finer JT, Simmons RM et Spudich JA (1994). “Single myosin molecule mechanics : piconewton forces and nanometre steps.” *Nature* **368**(6467), 113–119.
- [47] Rice S, Lin AW, Safer D, Hart CL, Naber N, Carragher BO, Cain SM, Pechatnikova E, Wilson-Kubalek EM, Whittaker M, Pate E, Cooke R, Taylor EW, Milligan RA et Vale RD (1999). “A structural change in the kinesin motor protein that drives motility.” *Nature* **402**(6763), 778–784.
- [48] Yildiz A, Tomishige M, Vale RD et Selvin PR (2004). “Kinesin walks hand-over-hand.” *Science* **303**(5658), 676–678.
- [49] Vale RD, Reese TS et Sheetz MP (1985). “Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility.” *Cell* **42**(1), 39–50.
- [50] Visscher K, Schnitzer MJ et Block SM (1999). “Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp.” *Nature* **400**(6740), 184–189.
- [51] Crevel I, Carter N, Schliwa M et Cross R (1999). “Coupled chemical and mechanical reaction steps in a processive *Neurospora* kinesin.” *EMBO J* **18**(21), 5863–5872.
- [52] Svoboda K et Block SM (1994). “Biological applications of optical forces.” *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **23**, 247–285.
- [53] Neuman KC et Block SM (2004). “Optical trapping.” *Rev Sci Instrum* **75**(9), 2787–2809.
- [54] Schnitzer MJ et Block SM (1997). “Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step.” *Nature* **388**(6640), 386–390.

-
- [55] Hua W, Young EC, Fleming ML et Gelles J (1997). “Coupling of kinesin steps to ATP hydrolysis.” *Nature* **388**(6640), 390–393.
- [56] Parmeggiani A (2000). *Rendement énergétique et stochasticité des moteurs moléculaires*. Thèse de doctorat, Université Paris 7.
- [57] de Gennes PG (1979). *Scaling Concepts in Polymer Physics*. Cornell University Press.
- [58] Strick T, Allemand JF, Croquette V et Bensimon D (2000). “Twisting and stretching single DNA molecules”. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **74**, 115–140.
- [59] Bouchiat C et Mézard M (1998). “Elasticity Model of a Supercoiled DNA Molecule”. *Phys. Rev. Lett.* **80**(7), 1556–1559.
- [60] Bouchiat C, Wang MD, Allemand J, Strick T, Block SM et Croquette V (1999). “Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements.” *Biophys J* **76**(1 Pt 1), 409–413.
- [61] Shivashankar GV, Feingold M, Krichevsky O et Libchaber A (1999). “RecA polymerization on double-stranded DNA by using single-molecule manipulation : the role of ATP hydrolysis.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(14), 7916–7921.
- [62] Hegner M, Smith SB et Bustamante C (1999). “Polymerization and mechanical properties of single RecA-DNA filaments.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(18), 10 109–10 114.
- [63] Bustamante C, Bryant Z et Smith S (2003). “Ten years of tension : single-molecule DNA mechanics”. *Nature* **421**, 423–427.
- [64] Strick TR, Allemand JF, Bensimon D, Bensimon A et Croquette V (1996). “The elasticity of a single supercoiled DNA molecule.” *Science* **271**(5257), 1835–1837.
- [65] Miné J, Disseau L, Takahashi M, Cappello G, Dutreix M et Viovy JL (2007). “Real-time measurements of the nucleation, growth and dissociation of single Rad51-DNA nucleoprotein filaments.” *Nucleic Acids Res* **35**(21), 7171–7187.
- [66] Fulconis R, Bancaud A, Allemand JF, Croquette V, Dutreix M et Viovy JL (2004). “Twisting and untwisting a single DNA molecule covered by RecA protein.” *Biophys J* **87**(4), 2552–2563.
- [67] van der Heijden T, van Noort J, van Leest H, Kanaar R, Wyman C, Dekker NH, Dekker N et Dekker C (2005). “Torque-limited RecA polymerization on dsDNA.” *Nucleic Acids Res* **33**(7), 2099–2105.
- [68] van der Heijden T, Seidel R, Modesti M, Kanaar R, Wyman C et Dekker C (2007). “Real-time assembly and disassembly of human RAD51 filaments on individual DNA molecules.” *Nucleic Acids Res* **35**(17), 5646–5657.
- [69] Fulconis R, Mine J, Bancaud A, Dutreix M et Viovy JL (2006). “Mechanism of RecA-mediated homologous recombination revisited by single molecule nanomanipulation.” *EMBO J* **25**(18), 4293–4304.

Bibliographie

- [70] Prasad TK, Yeykal CC et Greene EC (2006). “Visualizing the assembly of human Rad51 filaments on double-stranded DNA.” *J Mol Biol* **363**(3), 713–728.
- [71] Galletto R, Amitani I, Baskin RJ et Kowalczykowski SC (2006). “Direct observation of individual RecA filaments assembling on single DNA molecules.” *Nature* **443**(7113), 875–878.
- [72] Bennink ML, Schärer OD, Kanaar R, Sakata-Sogawa K, Schins JM, Kanger JS, de Grooth BG et Greve J (1999). “Single-molecule manipulation of double-stranded DNA using optical tweezers : interaction studies of DNA with RecA and YOYO-1.” *Cytometry* **36**(3), 200–208.
- [73] Joo C, McKinney SA, Nakamura M, Rasnik I, Myong S et Ha T (2006). “Real-time observation of RecA filament dynamics with single monomer resolution.” *Cell* **126**(3), 515–527.
- [74] Kinoshita K, Yasuda R, Noji H et Adachi K (2000). “A rotary molecular motor that can work at near 100% efficiency.” *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**(1396), 473–489.
- [75] Bryant Z, Stone MD, Gore J, Smith SB, Cozzarelli NR et Bustamante C (2003). “Structural transitions and elasticity from torque measurements on DNA”. *Nature* **424**, 338–341.
- [76] Harada Y, Ohara O, Takatsuki A, Itoh H, Shimamoto N et Kinoshita K (2001). “Direct observation of DNA rotation during transcription by Escherichia coli RNA polymerase.” *Nature* **409**(6816), 113–115.
- [77] Gore J, Bryant Z, Stone MD, Nöllmann M, Cozzarelli NR et Bustamante C (2006). “Mechanochemical analysis of DNA gyrase using rotor bead tracking”. *Nature* **439**, 100–104.
- [78] Doyle PS, Ladoux B et Viovy JL (2000). “Dynamics of a tethered polymer in shear flow.” *Phys Rev Lett* **84**(20), 4769–4772.
- [79] Fulconis R (2004). *Recombinaison homologue sur molécules d’ADN individuelles : expériences et modélisation*. Thèse de doctorat, Université Paris VI.
- [80] Strick TR, Allemand JF, Bensimon D et Croquette V (1998). “Behavior of supercoiled DNA.” *Biophys J* **74**(4), 2016–2028.
- [81] Einstein A (1956). *Investigations on the Theory of the Brownian Movement*. Courier Dover Publications.
- [82] Schäffer E, Nørrelykke SF et Howard J (2007). “Surface forces and drag coefficients of microspheres near a plane surface measured with optical tweezers.” *Langmuir* **23**(7), 3654–3665.

Résumé :

Dans cette thèse, nous avons étudié les aspects mécanique et thermodynamique de la recombinaison homologe, un processus crucial de réparation de l'ADN. Des travaux préliminaires d'observation de molécules d'ADN étirées lors de la recombinaison homologe ont mis à jour la complexité de ce processus et la difficulté de l'observer en fluorescence. Nous avons ensuite développé une nouvelle technique appelée "pinces magnétiques sensibles au couple" nous permettant de maintenir une molécule unique d'ADN avec une force et un couple connus tout en mesurant son état de torsion avec une résolution de quelques degrés. Nous avons ainsi montré de manière directe que la polymérisation de la recombinase hRad51 a lieu par ajout de monomères chacun déroulant l'ADN de 65° en moyenne. Nous avons également été capables de mesurer le couple d'arrêt de la polymérisation. Une modélisation mécano-chimique nous a finalement permis d'évaluer le potentiel chimique de la polymérisation, en bon accord avec les données biochimiques existantes.

Summary :

In this thesis, we have studied the mechanics and thermodynamics of a crucial process for repairing DNA breaks : homologous recombination. Some preliminary experiments on the observation of stretched DNA during homologous recombination have shed light on the complexity of this process and the difficulty to observe it in fluorescence. We have then developed a new technique called "torque sensitive magnetic tweezers" which allows us to hold a single DNA molecule with a known force and torque and in the meantime to measure its torsion with a resolution of a few degrees. Thus we have shown in a direct manner that the polymerization of the recombinase hRad51 occurs by the adding of monomers, each one unwinding the DNA by 65° in mean. We have also been able to measure the torque which stalls the polymerization. A mechano-chemical modelling has eventually allowed us to estimate the chemical potential of the polymerization which is in good agreement with the existing biochemical data.